



HAL
open science

Couplage de l'électrophorèse capillaire avec la spectrométrie de masse via une interface à électronébulisation : compréhension des phénomènes à l'interface et développement de nouvelles méthodologies pour des échantillons complexes et pour les séparations par focalisation isoélectrique

Meriem Mokaddem

► **To cite this version:**

Meriem Mokaddem. Couplage de l'électrophorèse capillaire avec la spectrométrie de masse via une interface à électronébulisation : compréhension des phénomènes à l'interface et développement de nouvelles méthodologies pour des échantillons complexes et pour les séparations par focalisation isoélectrique. Chemical Sciences. Chimie ParisTech, 2008. English. NNT : . pastel-00004674

HAL Id: pastel-00004674

<https://pastel.hal.science/pastel-00004674>

Submitted on 2 Feb 2009

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.

**THESE DE DOCTORAT EN CO-TUTELLE DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE
et L'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES ET DE TECHNOLOGIE
relevant de L'UNIVERSITE 7 NOVEMBRE A CARTHAGE**

Spécialité : Chimie Analytique
Ecole doctorale de Chimie Physique de Chimie Analytique de Paris-Centre

Présentée par :
Meriem MOKADDEM

Pour obtenir le grade de
**DOCTEUR de l'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE
et de l'UNIVERSITE 7 NOVEMBRE A CARTHAGE**

Couplage de l'électrophorèse capillaire avec la spectrométrie de masse *via* une interface à électronébulisation : compréhension des phénomènes à l'interface et développement de nouvelles méthodologies pour des échantillons complexes et pour les séparations par focalisation isoélectrique

Soutenue le 21 octobre 2008

Devant le jury composé de :

Pr. Claude PEPE
Pr. François COUDERC
Pr. Jean Luc VEUTHEY
Dr. Nafâa ADHOUM
Pr. Pierre GAREIL
Dr. Anne VARENNE / Dr. Jameleddine BELGAIED

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Codirecteur de thèse
Directeurs de thèse

Remerciements

Ce travail a été réalisé au Laboratoire d'Electrochimie et Chimie Analytique (CNRS-UMR 7575) à l'ENSCP, dirigé par le Dr. Daniel LINCOT. Je le remercie pour son accueil au sein de ce laboratoire.

Je tiens particulièrement à remercier le Dr. Anne VARENNE, qui m'a encadrée au cours de ces trois années de thèse, mais également dans les différents stages que j'ai précédemment effectués au laboratoire, et pour m'avoir fait aimer le monde de la science et de la recherche. Un grand merci pour sa disponibilité de tout instant, sa patience, et sa manière à elle de faire avancer les choses. Elle a surtout su me redonner confiance en moi dans les moments de doute. Sa bonne humeur constante a fait que je n'ai pas vu passer ces cinq dernières années. J'ai pour le Dr. Anne VARENNE une grande amitié, qui je l'espère sera durable.

Je tiens également à remercier le Pr. Pierre GAREIL pour m'avoir accueilli au sein de son équipe il y a cinq ans (projet de fin d'étude, stage de master et enfin thèse). Je le remercie de m'avoir fait confiance et d'avoir cru en moi, mais également pour son encadrement et sa rigueur scientifique, qui m'ont permis de grandir scientifiquement. Je lui exprime également toute ma gratitude pour m'avoir fait confiance en tant que conférencière dans des congrès scientifiques, en tant qu'encadrant de stage et en tant que monitrice dans l'enseignement de la formation continue.

Je remercie le Dr. Jameleddine BELGAIED d'avoir été un de mes directeurs de thèse dans le cadre de cette thèse en co-tutelle entre la France et la Tunisie, et surtout d'avoir su me diriger vers ce laboratoire dans lequel j'ai pu effectuer ma thèse.

Je tiens à remercier le Pr. Claude PÉPÉ pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse, le Pr. François COUDERC et le Pr. Jean-Luc VEUTHÉY pour avoir accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs auprès de l'Université Paris 6. Merci pour l'intérêt que vous avez porté à ce manuscrit et pour le temps que vous y avez consacré. Je remercie également le Dr. Nafâa ADHOUM qui a accepté de faire partie de mon jury de thèse en tant qu'examineur, mais qui n'a malheureusement pas pu être présent.

Je remercie également Cécile FACTOR, Olivier ROUSSEAU et Marc PORT de la société Guerbet pour les diverses collaborations que nous avons eues. Je tiens aussi à remercier Josseline TAHAR de la société Picométrie pour le début de collaboration que nous avons eue à la fin de la thèse, ainsi que pour le prêt d'un détecteur LIF.

Au niveau du LECA, je remercie l'ensemble des personnes du laboratoire avec qui je me suis très bien entendu, et plus particulièrement les gens du dessous.

Il y a également le LECA de l'ESPCI, qu'il ne faut pas oublier. Un grand merci aux différents membres du laboratoire qui toujours été là pour nous dépanner, et avec qui les discussions scientifiques et personnelles ont toujours été très agréables. Et plus particulièrement Stéphanie DESCROIX et Jean-Marc BUSNEL (ancien ESPCI) pour qui j'ai de l'amitié.

Un grand merci à l'ensemble du personnel de l'école avec qui j'ai eu de très bons rapports, en particulier Ali, Bruno, tous les gens du magasin, mais également, le service des Tp en particulier Sébastiana.

Passons maintenant au doctorants et stagiaires du laboratoire. La liste est longue car j'en ai vu passer au cours de ces cinq dernières années ... je voudrais tous les remercier pour leur gentillesse et leur bonne humeur quotidienne, qui ont fait, chacun à leur manière, qu'il y avait une ambiance particulièrement agréable au labo. Je voudrais commencer par remercier le couple de japonais Nazarés et Denis, Thomas, Violaine, Nicolas ... excusez moi si j'en

oublie, qui étaient déjà là au labo à mon arrivée et qui m'ont accueillie avec beaucoup de gentillesse. Je garde un excellent souvenir d'eux. Je voudrais également remercier la bande que j'appelle des « fous », mais c'est très affectueux ne vous inquiétez pas les mecs. Je veux parler de Jean notre Marseillais, Gab « mon fils » et son adorable copine Sandra, notre papi national Laurent, Marek le tchèque fou et Max. Ils ont fait que les journées, mais aussi les soirées, au laboratoire se passaient dans une excellente ambiance. On se marrait bien à cette époque, que de bons souvenirs ... Je remercie la petite dernière du labo, Marie pour sa gentillesse. Courage pour te fin de thèse je suis sur que tout se passera bien, je n'en doute pas. Je voulais remercier également Fanny, avec qui j'ai commencé la thèse, mais également la termine. Merci pour sa gentillesse et sa disponibilité de chaque instant, mais aussi pour toutes les soirées passées au labo à nous tenir compagnie « on va y arriver », et enfin c'est fait tout à un fin ... heureuse ! Ah oui j'allais oublier Yannis ! C'était de peu que tu ne te retrouvais pas dans les remerciements ☺ Pour une fois que je peux te taquiner, je prends une petite revanche. Trêve de plaisanterie, un grand merci à Yannis pour avoir été présent pour moi à des moments où j'en avais vraiment besoin, pour sa bonne humeur, son sens de l'humour « particulier » ...

Je remercie de tout mon cœur l'ensemble de ma famille pour son soutien sans faille, et en particulier à mes parents pour m'avoir soutenu et cru en moi et m'avoir aidé à arriver là où j'en suis. Merci pour tout.

Le mot de la fin sera pour l'homme de ma vie, celui qui a su être là pour moi à tout moment et qui a su me pousser vers l'avant afin que j'avance, qui a également subi tous les aléas de cette thèse, mais qui a répondu toujours présent jusqu'à la fin. Merci Raouf d'être là ...

Table de matières

Abréviations	7
Introduction générale	11
<u>Chapitre I</u> : Revue bibliographique	17
I.1- L'électrophorèse capillaire	17
I.2- Spectromètres de masse utilisés en couplage CE/MS	20
1.2.1- Types d'analyseurs MS couplés à l'électrophorèse capillaire	20
1.2.2- Principes de l'analyseur quadripolaire	21
I.3- Couplage CE/MS	24
I.3.1- Ionisation par électronébulisation (ESI)	25
I.3.1.1- Processus d'électronébulisation	26
I.3.1.2- Interfaces CE/ESI-MS	28
I.3.1.2.1- Interface à liquide additionnel coaxial	29
I.3.1.2.2- Interface à jonction liquide	34
I.3.1.2.3- Interface nanospray sans apport extérieur de liquide	35
I.3.2- Autres modes d'ionisation	38
I.4- Techniques électrophorétiques utilisées en couplage CE/ESI-MS	39
I.4.1- CZE/ESI-MS	39
I.4.2 - MEKC/ESI-MS	40
I.4.3 - cITP/ESI-MS	40
I.4.4- CEC/ESI-MS	41
I.4.5- CIEF/ESI-MS	41

I.5- Traitement de surface de la paroi interne des capillaires d'électrophorèse pour le couplage CE/ESI-MS	42
I.6- Applications du couplage CE/ESI-MS	46
- Analyse d'acides aminés, de peptides et de protéines	47
- Analyse de saccharides	49
- Bioanalyse de composés d'intérêt présents dans des matrices alimentaires	50
- Analyse de produits pharmaceutiques et de métabolites	51
- Analyses biomédicales	53
- Analyses environnementales de composés néfastes (pesticides)	54
- Autres types d'application	55
I.7- Références bibliographiques	56

CHAPITRE II : Etude approfondies sur les effets de succion et de dilution dans un couplage électrophorèse capillaire – spectrométrie de masse *via* une interface à électronébulisation

A- Introduction	72
B- Article : Partie I	76
C- Article : Partie II	95
D- Conclusion	111
E- Références	113

CHAPITRE III : Stratégie de séparation pour l'analyse simultanée de composés cationiques et polyanioniques par électrophorèse capillaire couplée à la spectrométrie de masse *via* une interface à électronébulisation

A- Introduction	116
B- Article	121
C- Conclusion	140
D- Références	142

CHAPITRE IV : Couplage en ligne de la focalisation isoélectrique capillaire avec la spectrométrie de masse *via* une interface à électronébulisation pour la caractérisation de protéines hydrophiles et hydrophobes

A- Introduction	144
B- Article	148
C- Conclusion	171
D- Références	173
Conclusion générale	177

Abréviations

Méthodes de séparation :

2D : bidimensionnelles

CE : capillary electrophoresis

CEC : capillary electrokinetic chromatography

CGE : capillary gel electrophoresis

CIEF : capillary isoelectric focusing

CZE : capillary zone electrophoresis

GC : chromatographie en phase gazeuse

HPLC : high performance liquid chromatography

IEF : isoelectric focusing

ITP : isotachopheresis

LC : liquid chromatography

MEKC : micellar electrokinetic chromatography

NACE : nonaqueous capillary electrophoresis

PACE : pressure assisted capillary electrophoresis

PACE : pressure-assisted capillary electrophoresis

RPLC : reverse phase liquid chromatography

SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SFC : chromatographie en phase supercritique

TLC : thin layer chromatography

Spectrométries de masse et interfaces

APCI : atmospheric pressure chemical ionization

APPI : atmospheric pressure photoionisation

DG : drying gas

EIC : extracted ion current

ESI : electrospray ionization

FAB : fast atom bombardment

FTICR : fourier transform ion cyclotron resonance

ICP : inductively coupled plasma

IT : ions trap
LIF : laser induced fluorescence
MALDI : matrix assisted laser desorption ionisation
MS : mass spectrometry
NG : nebulizing gas
QqQ : triple quadrupole
Q-TOF : quadrupole/time-of-flight
SIM : single ion monitoring
SL : sheath liquid
TOF : time of flight

Composés chimiques et biochimiques

APS : ((3-aminopropyl)- trimethoxysilane
BA : benzoic acid
BCQ : [(acryloylamino)propyl]-trimethylammonium chloride
BGE : background electrolyte
CA II : carbonic anhydrase II
EPyM-DMA : ethylpyrrolidine methacrylate-N,N-dimethylacrylamide
FA : formamide
Gl : glucose
H₂O : water
HPMC : hydroxypropylmethylcellulose
MAPTAC : 3-(methacryloylamino)-propyl trimethylammonium chloride
MeOH: methanol
Myo : myoglobin
NaOH : sodium hydroxide
NH₃ : ammoniac
PAA : poly(acrylic acid)
PDMS : polydimethylsiloxane
PVA : polyvinyle alcool
PVS : polyvinyle sulfonate
Rnase : ribonuclease A
SMIL : Successive Multiple Ionic-polymer Layers

TI : trypsin inhibitor

α -Tryp : α -chymotrypsinogen A type II

β -Lac : β -lactoglobulin A

Grandeurs mesurées

EOF : electroosmotic flow

F_{BGE} : background electrolyte flow rate

F_{SL} : sheath liquid flow rate

I_{MS} : peak intensity by MS detector

I_{UV} : peak intensity by UV detector

NM : neutral marker

N_{MS} : efficiency by MS detector

N_{UV} : efficiency by UV detector

pI : isoelectric point

v_{app} , U_{app} : apparent velocity

v_{eo} , U_{eo} : electroosmotic velocity

v_{ep} , U_{ep} : electrophoretic velocity

v_{hydro} , U_{hydro} : hydrodynamic velocity

$v_{suction}$, $U_{suction}$: velocity due to the suction effect

v_{AP} , U_p : velocity due to a possible additional pressure application at the inlet of the separation capillary

Introduction générale

Les méthodes séparatives analytiques voient leur intérêt s'accroître de jour en jour dans divers domaines d'applications très variés et très vastes, allant des domaines de la chimie (environnement, agroalimentaire ...) jusqu'à des applications biologiques très pointues (pharmaceutiques, biomédicales ...). Les avancées technologiques de ces méthodes séparatives sont plus particulièrement orientées vers la miniaturisation et le gain en sensibilité essentiellement. En effet, on observe un intérêt certain pour la mise au point de techniques de haute performance, peu coûteuses, automatisables, permettant de faire des analyses plus pointues, le plus rapidement possible, tout en utilisant la quantité d'échantillon la plus faible possible. On retrouve cet intérêt dans l'industrie pharmaceutique, où les méthodes de criblage rapides sont nécessaires pour caractériser de nouvelles molécules d'intérêt pharmaceutique. En chimie combinatoire, des milliers de composés peuvent être produits dans une synthèse simple et les méthodes de criblage rapides sont essentielles pour l'identification de celles-ci. Une sensibilité et une sélectivité élevées sont aussi exigées dans les études du métabolisme des médicaments, pour lesquelles l'analyse des petits volumes est un challenge. Le coût élevé de la production de certains produits chimiques, dans beaucoup d'études pharmaceutiques et biochimiques, est un autre stimulant vers la miniaturisation.

Parmi les techniques séparatives les plus populaires dans ces domaines d'application, on retrouve essentiellement la chromatographie avec ses différentes variantes : la chromatographie en phase liquide (LC), en phase supercritique (SFC), planaire (TLC) ou encore en phase gazeuse (GC), mais également et de plus en plus l'électrophorèse capillaire (CE) avec ses diverses méthodes d'analyses : classiquement l'électrophorèse capillaire de zone (CZE), l'électrophorèse en gel (CGE), mais également l'isotachophorèse (ITP), l'électrochromatographie capillaire (CEC), la chromatographie électrocinétique micellaire (MEKC) ou encore la focalisation isoélectrique capillaire (CIEF).

L'électrophorèse capillaire est une technique analytique séparative, ayant vu le jour dans les années 80, permettant la séparation de composés ionisés sous l'application d'un champ électrique. La séparation est réalisée dans un capillaire en silice vierge de faible diamètre interne (10 à 100 μm classiquement), dont la paroi peut éventuellement être

modifiée par des polymères. Le faible diamètre du capillaire permet une réduction et une meilleure dissipation de la chaleur produite par effet Joule, ainsi que la suppression quasi-totale des phénomènes de convection. Des efficacités élevées sont obtenues lors de la séparation des analytes, tout en utilisant d'infimes quantités d'échantillon (de l'ordre de quelques nanolitres) et des volumes extrêmement faibles de produits chimiques. Il existe différentes méthodes en électrophorèse capillaire, comme cité précédemment. L'électrophorèse capillaire de zone (CZE) est la méthode la plus communément utilisée, permettant la séparation d'espèces chargées. Ces dernières subissent deux forces électromotrices : celle du champ électrique d'une part et celle de l'écoulement électroosmotique, dû à la formation d'une double couche électrique sur la paroi interne du capillaire, d'autre part. Ainsi la quasi-totalité des analytes ionisés sont séparés et détectés par ce mode. Les composés neutres peuvent également être séparés entre autres par électrophorèse capillaire à l'aide de tensioactifs dans le milieu de séparation (MEKC). La focalisation isoélectrique en capillaire (CIEF) est la deuxième méthode électrophorétique la plus employée pour l'analyse et la séparation de molécules amphotères (comme les peptides ou les protéines), effectuée dans un gradient de pH au sein du capillaire d'électrophorèse. Sous l'action d'un champ électrique continu aux bornes de ce gradient, les molécules de l'échantillon à séparer se déplacent vers la zone où le pH est égal à leur point isoélectrique (pI). Aucune force électromotrice ne s'exerce sur ces molécules dans cette zone car elles sont neutres. Si elles diffusent dans une zone voisine de pH différent de leur pI , elles sont alors chargées et donc soumises au champ électrique jusqu'à ce qu'elles retournent dans leur zone de neutralité (zone de focalisation), à leur pI . Ainsi la CIEF, contrairement à l'électrophorèse de zone, lutte contre la diffusion de l'échantillon hors de sa zone de pI .

Depuis ces dernières années, un grand effort a été réalisé en termes de sensibilité avec le développement et la mise en place de méthodes de préconcentration et de détection. Différentes techniques de préconcentration ont été développées afin de permettre une meilleure sensibilité pour l'analyse d'échantillons très dilués [1-4]. Les plus couramment employées sont les méthodes d'isotachophorèse (ITP), la méthode d'amplification de champ électrique, ainsi que la méthode de balayage (« sweeping ») qui peuvent être mises en œuvre en ligne dans le capillaire. On trouve également la mise en place de nouveaux modes de détection couplés à l'électrophorèse capillaire, tels que la détection par fluorescence induite par laser (LIF) [5-7] permettant d'atteindre des limites de détection inférieures à celle de la détection par spectrométrie UV-visible, ou encore la détection par spectrométrie de masse

(MS), permettant d'obtenir des informations sur la structure et la masse des molécules à séparer, ainsi qu'un gain en sensibilité.

Dans le cadre de ce travail de thèse nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'électrophorèse capillaire couplée à une détection par spectrométrie de masse *via* une interface à électronébulisation, aux phénomènes pouvant être engendrés lors de la mise en place de ce couplage, ainsi qu'aux problématiques pour la réalisation de certains types d'analyses. En effet durant cette dernière décennie, un intérêt majeur a été porté sur l'utilisation du couplage CE/MS, pour l'analyse et la caractérisation de divers composés, car ce mode de détection est très sensible et sélectif, et apporte une information sur la structure chimique des analytes. Ce couplage a connu un développement considérable en ce qui concerne sa mise en œuvre et ses applications pour l'analyse et la caractérisation de divers composés, et ce dans des domaines variés. Ainsi un nombre croissant de fabricants propose des couplages CE/MS prêts à l'emploi, représentant un grand pas en avant pour l'application de cette méthode pour des analyses de routine. L'instrumentation de spectrométrie de masse utilisée devient de plus en plus sophistiquée, comme les analyseurs TOF (Time of flight), ou FTICR (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance), ou les instruments hybrides impliquant ces deux technologies, permettant des analyses plus complexes. Les différents types d'interfaces employés pour ce type de couplage sont l'ionisation par électronébulisation (ESI) [8], l'ionisation chimique à pression atmosphérique APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization) [9], l'ionisation photochimique à pression atmosphérique APPI (Atmospheric Pressure Photoionization) [10], la désorption/ionisation par laser assistée par une matrice MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation) [11, 12], le plasma à couplage inductif (ICP) [13], et le bombardement rapide à débit continu d'atome FAB (Fast Atom Bombardment) [14]. L'ionisation par électronébulisation (ESI) est le mode d'ionisation le plus couramment utilisé pour la mise en ligne du couplage de l'électrophorèse capillaire avec la spectrométrie de masse. Différents types d'interfaces à électronébulisation se sont largement développés et sont classés en trois types : les interfaces à liquide additionnel coaxial, à jonction liquide, et miniaturisée (nanospray) sans apport de liquide extérieur.

L'une des principales difficultés de mise en œuvre du couplage de l'électrophorèse capillaire avec la spectrométrie de masse réside dans le maintien du contact électrique aux bornes du système d'électrophorèse afin d'assurer la séparation électrophorétique d'une part, mais aussi au niveau du spectromètre de masse pour assurer l'efficacité d'ionisation/désorption dans la source et donc permettre d'obtenir une bonne sensibilité de détection. De plus, dans l'objectif de la mise au point d'une recherche de l'interface optimale

pour le couplage CE/MS, une question importante se pose : comment maintenir l'efficacité de la séparation de l'électrophorèse capillaire lorsqu'on couple celle-ci avec la spectrométrie de masse. Une autre question est également à considérer, la sensibilité de la détection des échantillons lors du couplage CE/MS, vu que la quantité injectée de ces échantillons est assez limitée en électrophorèse capillaire, et sachant également qu'il peut se produire des phénomènes de dilution et d'accélération de l'écoulement au sein du capillaire d'électrophorèse dus à la mise en place de l'interface d'électronébulisation.

Lors du travail présenté dans ce mémoire, nous nous sommes intéressés au couplage de l'électrophorèse capillaire avec la spectrométrie de masse via une interface à électronébulisation pour la compréhension des phénomènes à l'interface et le développement de nouvelles méthodologies pour des échantillons complexes et pour les séparations par focalisation isoélectrique

Dans ce contexte, une étude bibliographique a été réalisée afin de disposer des informations nécessaires à la compréhension des problématiques qui pourraient se présenter lors de la mise en place de ce couplage CE/MS. Les différents types d'analyseurs utilisés en couplage CE/MS, ainsi que les différents types d'interfaces disponibles, et les diverses applications réalisées seront décrites.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à la compréhension des phénomènes de succion et de dilution liés à l'interface triple entrées à liquide additionnel coaxial pour le couplage CE/ESI-MS. L'effet de succion est principalement engendré par les débits de liquide additionnel et de gaz nébulisant qui accélèrent l'écoulement de l'électrolyte de séparation lors de leur mélangeage à la pointe de l'aiguille d'électronébulisation. L'effet de dilution, quant à lui, est dû au mélangeage, à l'interface, entre l'électrolyte de séparation et le liquide additionnel, à des débits sensiblement différents. On s'est également intéressé aux autres paramètres qui pourraient avoir une influence sur ces phénomènes. Nous présenterons dans une première partie du chapitre, une étude approfondie sur l'effet de succion. Nous étudierons systématiquement les différents paramètres intervenant à l'interface, c'est-à-dire la position du capillaire, la température et le débit du gaz séchant, la pression du gaz nébulisant, le débit du liquide additionnel, ainsi que les débits électroosmotiques et hydrodynamiques dans le capillaire de séparation. Les résultats seront discutés en termes de débits dans les trois capillaires concentriques de l'interface d'électronébulisation à liquide additionnel coaxial. Dans la seconde partie du chapitre, l'étude se concentrera sur l'effet de dilution. Cet effet de dilution, brièvement noté, peut avoir des conséquences importantes sur la sensibilité de

détection en couplage CE/ESI-MS. Les différents paramètres intervenant à l'interface, cités précédemment, seront également étudiés afin de déterminer leur influence sur ce second effet. Les résultats seront discutés en termes d'intensité de pics, de leur rapport et de rapport de débits théoriques de dilution.

Dans une troisième partie, nous avons étudié la mise en œuvre d'une méthode permettant d'analyser simultanément un mélange complexe de composés. Comme il a été indiqué précédemment, l'une des difficultés majeures du couplage CE/MS réside dans le maintien du contact électrique aux bornes du capillaire d'électrophorèse pour la séparation électrophorétique. Le champ électrique est généré entre l'électrode d'entrée du capillaire et l'aiguille d'interface qui permet au contact électrique de se faire entre l'électrophorèse et le spectromètre de masse. Pour que ce contact électrique se fasse de manière continue, un écoulement minimum de liquide est nécessaire entre la CE et la MS. Ce contact est en général obtenu par l'écoulement électroosmotique cathodique lorsqu'un capillaire en silice vierge est employé. Ce type de configuration présente des limitations pour l'analyse de composés polyanioniques de mobilité électrophorétique supérieure, en valeur absolue, à la mobilité électroosmotique. C'est dans cette optique, que nous proposerons une méthodologie générale permettant la séparation et l'analyse simultanée, dans le cadre d'un couplage CE/MS, de tous types de composés, et notamment d'un mélange de composés cationiques et polyanioniques. Les différentes méthodologies envisageables seront étudiées, optimisées et comparées les unes aux autres.

Enfin, le couplage CE/MS se faisant essentiellement dans le cas de l'électrophorèse capillaire de zone, nous nous sommes intéressés à la mise en place d'un couplage avec un autre mode de séparation, la CIEF, méthode très importante dans le domaine biologique. On retrouve dans la littérature, différentes procédures pour la mise en place du couplage de la CIEF avec la spectrométrie de masse. Cependant quelques difficultés inhérentes à ce couplage sont rencontrées: le maintien du contact électrique requis pour les étapes de focalisation et mobilisation ; la nature et la composition de l'électrolyte arrivant du capillaire de séparation, qui devra être compatible avec les détecteurs MS ; et la nature de la paroi interne du capillaire de séparation qui devra également être compatible avec l'interface à électronébulisation. Ces difficultés ont souvent pour conséquence la mise en œuvre de méthodes à plusieurs étapes, avec intervention manuelle entre ces étapes. Dans ce contexte, nous avons mis en place un couplage en ligne CIEF/ESI-MS, pour l'analyse de tous types de protéines (hydrophiles et hydrophobes), avec un capillaire en silice vierge et surtout sans interruption du champ électrique entre les étapes de focalisation et de mobilisation.

Chapitre I : Revue bibliographique

I.1- L'électrophorèse capillaire

Pendant très longtemps et encore à ce jour, l'électrophorèse, dont les principes [15] furent énoncés bien avant ceux de la chromatographie, a été une technique largement utilisée par les biochimistes essentiellement pour leurs analyses de nature protéomique. Les séparations sont principalement réalisées en présence de gels (amidon, polyacrylamide, agarose) sur des plaques. Les espèces chargées placées dans ce milieu, sont séparées sous l'action d'un champ électrique. Mais les analyses restent relativement longues, assez peu reproductibles, difficilement automatisables et leur mise au point parfois laborieuse. Malgré ces difficultés, des séparations extrêmement fines ont été obtenues, notamment par focalisation isoélectrique (IEF) et sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) [16]. L'électrophorèse reste la méthode de choix pour la résolution des protéines et des polynucléotides [17, 18]. Des techniques bidimensionnelles (2D) en gel ont également été mises en place. La plus communément utilisée est celle qui consiste à réaliser successivement et en des directions orthogonales une IEF (séparation selon la charge) et un SDS-PAGE (séparation selon la masse moléculaire relative M_r), afin de séparer des échantillons complexes. Cette technique 2D conduit à des images de taches souvent très complexes et des temps d'analyse souvent très longs. Sa réalisation est également souvent laborieuse à mettre en place.

Des avancées technologiques ont été réalisées afin de pallier les divers inconvénients de l'électrophorèse sur plaque, et ainsi une méthode miniaturisée est apparue : l'électrophorèse capillaire (CE). Celle-ci ne connaîtra un réel développement que dans les années 80 avec la commercialisation d'instruments performants automatisables. Le principe de l'électrophorèse capillaire est basé sur la séparation d'espèces sous l'action d'un champ électrique, en fonction de leurs différences de mobilité électrophorétique, dans un capillaire en silice vierge de faible diamètre interne ($< 100 \mu\text{m}$). Les travaux de Jorgenson et de ses collaborateurs [19] ont montré que l'électrophorèse capillaire, de par son aspect de miniaturisation, présente un grand nombre d'avantages. Le premier est le faible diamètre interne du capillaire (généralement inférieur à $100 \mu\text{m}$) générant un faible effet Joule grâce à une meilleure dissipation de la chaleur, permettant ainsi d'appliquer des champs électriques plus élevés que lors de séparations par électrophorèse conventionnelle, et ainsi d'accéder à

des séparations plus rapides. La faible consommation d'échantillons et de tampon de séparation requis pour les séparations électrophorétiques, ainsi que la haute résolution et les temps d'analyse rapides obtenus, ont fait de la CE une méthode analytique de choix. De plus, l'automatisation des différentes étapes de l'analyse (conditionnement, injection, séparation) sont des avantages majeurs. Par ailleurs, les instruments commerciaux sont de plus en plus couplés à différents modes de détection permettant d'obtenir de meilleures sensibilités.

La méthodologie et ses applications ont connu un développement considérable. Les améliorations réalisées en termes de méthodes d'injection, de modification de la paroi des capillaires pour modifier la valeur du flux électroosmotique ou éviter d'éventuelles adsorptions, ainsi que l'introduction de nouveaux milieux séparatifs, ont permis le développement de cette méthode séparative pour de nombreuses applications chimiques, biologiques, et environnementales. De plus, le développement de l'électrophorèse capillaire, en tant qu'outil analytique fiable, est principalement le résultat des avancées faites en matière de détection et d'identification. Avec des diamètres de capillaires conventionnels et des volumes d'injection généralement de l'ordre de 1 à 10 nL, des concentrations d'échantillon de l'ordre de 10^{-6} M sont aisément détectables. Les limites de détection peuvent être substantiellement améliorées en utilisant des méthodes électrophorétiques de pré-concentration des échantillons durant l'étape d'injection. Ainsi, la possibilité d'injecter de très faibles volumes d'échantillons confère un avantage considérable à la CE notamment dans le domaine de la bioanalyse. En outre, différents modes séparatifs peuvent être mis en place à partir de l'appareillage de CE utilisant le principe des séparations sous champ électrique (l'électrophorèse capillaire de zone CZE, l'électrophorèse sur gel (CGE), la chromatographie électrocinétique micellaire (MEKC), l'électrochromatographie capillaire (CEC), l'isotachophorèse (ITP), la focalisation isoélectrique capillaire (CIEF)).

Par ailleurs un besoin en sensibilité est parfois requis lors d'analyses d'échantillons très dilués ou complexes par électrophorèse capillaire. C'est alors que différents modes de détection sont venus compléter la détection par spectrométrie d'absorption UV-visible. On trouve la détection par conductimétrie à partir d'une cellule électrochimique placée à l'extrémité de la sortie du capillaire d'électrophorèse [20, 21]. Des détecteurs à fluorescence induite par laser (LIF) [5, 6] ont également été utilisés pour les séparations électrophorétiques. Ces détecteurs LIF présentent l'avantage d'être beaucoup plus sensibles par rapport à la détection par UV, permettant ainsi d'obtenir de meilleures limites de détection. Le mode de détection le plus couramment couplé à l'électrophorèse capillaire est la spectrométrie de masse (MS). Les détecteurs MS présentent non seulement l'avantage d'être très sensibles en

termes de détection mais également d'accéder aux informations structurales et massiques des composés analysés. C'est ainsi que les couplages CE/MS se sont énormément développés depuis la fin des années 80. Initialement les premiers systèmes d'interface permettant d'associer l'électrophorèse capillaire et la spectrométrie de masse étaient de type « home-made ». Mais avec l'intérêt croissant qu'a connu ce couplage, des systèmes automatisés commerciaux ont vu le jour. On trouve actuellement une grande diversité dans les couplages CE/MS, avec un grand nombre d'analyseurs MS couplés à l'électrophorèse capillaire, et divers mode d'ionisation et d'interfaces adaptées aux analyses requises. C'est ainsi qu'au jour d'aujourd'hui on trouve une multitude d'applications dans divers domaines utilisant le couplage CE/MS [22-26].

I.2- Spectromètres de masse utilisés en couplage CE/MS

La spectrométrie de masse est l'un des outils clés d'élucidation de la structure de composés organiques. C'est une méthode qui permet, non seulement l'identification des molécules, mais également la détermination des abondances de certains isotopes rentrant dans la structure chimique de ces composés. Depuis 1950, les techniques d'ionisation se sont diversifiées et adaptées à la multitude des échantillons à analyser. La spectrométrie de masse peut être utilisée en guise de détecteur entre autres en chromatographie en phase gazeuse ou liquide, mais également en électrophorèse capillaire. Les progrès technologiques ont permis l'automatisation des réglages de l'appareil ainsi que la mise en œuvre de différents types d'analyseurs et le traitement de nombreuses données générées.

I.2.1 - Types d'analyseurs MS couplés à l'électrophorèse capillaire

Les développements réalisés en spectrométrie de masse ont permis la mise en place du couplage CE/MS pour un plus grand nombre d'applications. Les analyseurs quadripolaires MS sont les plus couramment utilisés depuis la mise en œuvre du couplage CE-MS, principalement en raison du fait que ces instruments étaient les plus accessibles pour un grand nombre de laboratoires de recherche [27]. Cependant, leur faible vitesse de balayage ainsi que la résolution peu élevée et la sensibilité relativement faible en mode d'acquisition « fullscan » constituent des limitations importantes de ces analyseurs [1]. Ces dernières années on a constaté un regain pour les analyseurs MS à trappe d'ions (ITs) et les systèmes à temps de vol TOF (Time-of-flight) disponibles récemment à des prix accessibles. Mais les analyseurs quadripolaires restent tout de même les plus souvent utilisés car plus faciles d'utilisation et moins onéreux. Les analyseurs à trappe d'ions (ITs) [28, 29] sont fréquemment employés pour l'analyse par couplage CE/MS de peptides, car ils possèdent des vitesses de balayage et des sensibilités adéquates à ce type d'analyses, mais surtout, ils permettent d'exécuter des expériences MSⁿ (à plusieurs dimensions) [25]. Quant aux analyseurs TOF, ils permettent d'obtenir de bonnes sensibilités et de hautes résolutions [30, 31]. Concernant les applications futures de la CZE, nécessitant de hautes fréquences d'acquisition (par exemple, chipCE/MS) où la largeur maximale des pics obtenus est de l'ordre de quelques millisecondes, seuls des analyseurs modernes ayant la possibilité d'acquérir plus de 20 spectres par seconde semblent être une alternative pour la détection MS.

Le couplage de l'électrophorèse capillaire avec d'autres analyseurs plus performants comme, l'analyseur à résonance ionique cyclotronique par transformée de Fourier FTICR (Fourier transform ion cyclotron resonance) [32], les analyseurs MS hybrides comme le Q-TOF (quadrupole/time-of-flight), ou des spectromètres de masse triples quadripôles (QqQ), ont également été reportés dans la littérature [33]. L'analyseur FTICR-MS offre une excellente sensibilité, une haute résolution et la possibilité de réaliser des expériences MS^n , nécessaires pour certains types de séparations [34]. Cependant, en raison du coût encore élevé des analyseurs MS « sophistiqués » (tel que le Q-TOF ou le FTICR) on peut à peine considérer ces instruments comme des détecteurs courants pour la CE aujourd'hui [35].

I.2.2- Principes de l'analyseur quadripolaire

Les spectromètres quadripolaires sont fréquemment utilisés pour le couplage CE/MS, car l'électrophorèse capillaire et la source peuvent être facilement interfacées, et certaines applications n'exigent pas une haute résolution. Aussi trouve-t-on des montages aux performances modestes, mais moins coûteux et peu encombrants. C'est dans cette catégorie que se situent les appareils à champ électrique basés sur les filtres quadripolaires (Figure 1), très utilisés comme détecteurs de masse dans la méthodologie du couplage CE/MS.

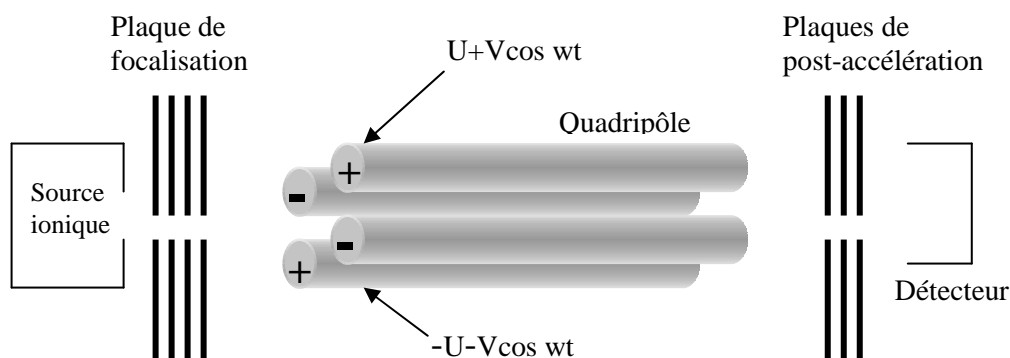


Figure 1 : Schéma de principe d'un spectromètre de masse à analyseur quadripolaire [36]

U amplitude de la tension continue ; V : amplitude de la tension haute fréquence ; w : pulsation ; t : temps

L'analyseur quadripolaire permet de filtrer les ions selon leur énergie cinétique en les soumettant à des champs électriques croisés (continu et alternatif de haute fréquence) qui

provoquent la déviation de leur trajectoire en fonction de leur rapport m/z . L'électronique du filtre fait varier la haute fréquence de façon à séparer les différents m/z .

L'analyseur quadripolaire est composé de quatre barres conductrices, de section idéalement hyperbolique et disposées symétriquement autour d'un axe (Figure 2).

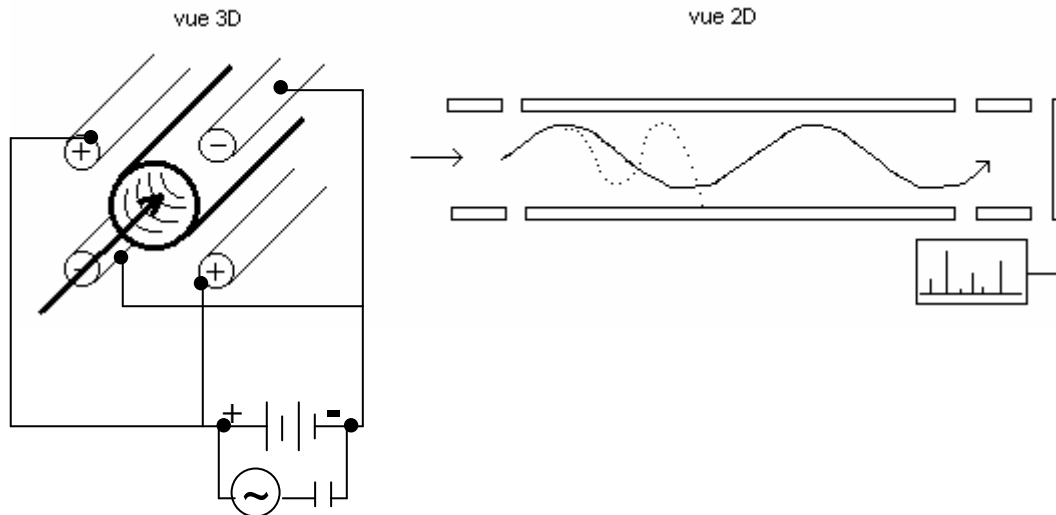


Figure 2 : Potentiels appliqués au filtre quadripolaire et trajectoire des ions [36]

Ces quatre barres sont associées électriquement deux par deux. A une paire d'électrodes est appliqué un potentiel électrique de la forme :

$$F(t) = U + V \cdot \cos(\omega \cdot t)$$

U est l'amplitude de la tension continue

V est l'amplitude de la tension haute fréquence

ω est la pulsation (fréquence de l'ordre de 2 MHz)

A l'autre paire d'électrodes est appliqué un potentiel opposé $-F(t)$.

Les ions formés dans la source sont introduits à une extrémité du filtre selon l'axe de celui-ci. Les champs continus de haute fréquence dont les directions sont perpendiculaires à l'axe du filtre communiquent un mouvement latéral oscillatoire aux ions (Figure 2). Le mouvement des ions est décrit par des équations dites de Mathieu, dont la résolution montre que seuls les ions ayant une valeur du rapport m/z comprise dans une certaine bande possèdent une trajectoire stable et sont transmis par le filtre, les autres ions étant captés par les électrodes. Ce rapport m/z dépend de la distance séparant les électrodes, de la fréquence et des

tensions U et V. En pratique puisque les deux premières valeurs sont constantes, seules varient les tensions U et V. En balayant entre 0 et les valeurs maximales (mais en maintenant leur rapport constant) des amplitudes des tensions continues et de haute fréquence appliquées aux électrodes, les ions sont transmis successivement par le filtre dans l'ordre croissant des valeurs du rapport m/z , avec une résolution constante.

Les ions ayant traversé le filtre arrivent dans le détecteur (multiplicateur) où ils provoquent une avalanche d'électrons qui donne naissance à un courant électrique.

I.3- Couplage CE/MS

La puissance de résolution élevée fournie par l'électrophorèse capillaire et l'information structurale fournie par la spectrométrie de masse ont fait du couplage CE/MS une combinaison attrayante. Ce couplage présente cependant quelques difficultés de mise en œuvre pour une analyse répétable et fiable. La première concerne le maintien du contact électrique aux bornes du capillaire d'électrophorèse, afin d'obtenir un champ électrique uniforme pour les séparations électrophorétiques. La seconde difficulté est la mise en place d'une interface de CE/MS qui permette d'augmenter la valeur du débit du fluide sortant du capillaire de séparation (quelques centaines de $\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$) afin d'atteindre des débits compatibles avec le spectromètre de masse (quelques $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$), tout en ne dégradant pas l'efficacité et la résolution de la séparation électrophorétique. La troisième est d'accéder à une bonne efficacité d'ionisation/désorption des analytes dans la source d'ionisation, c'est-à-dire une bonne adéquation de l'électrolyte de séparation et du liquide additionnel avec la séparation et la détection en masse des analytes.

De multiples configurations du couplage CE/MS sont possibles: les différents modes de séparation électrophorétique peuvent être couplés à une détection MS avec plus ou moins de contraintes ; différents modes d'ionisation sont également proposés selon la nature des composés à analyser ; un grand nombre de détecteurs sont également disponibles, selon la sensibilité et l'information requise pour les analyses. La figure 3 illustre bien les différentes combinaisons du couplage CE/MS.

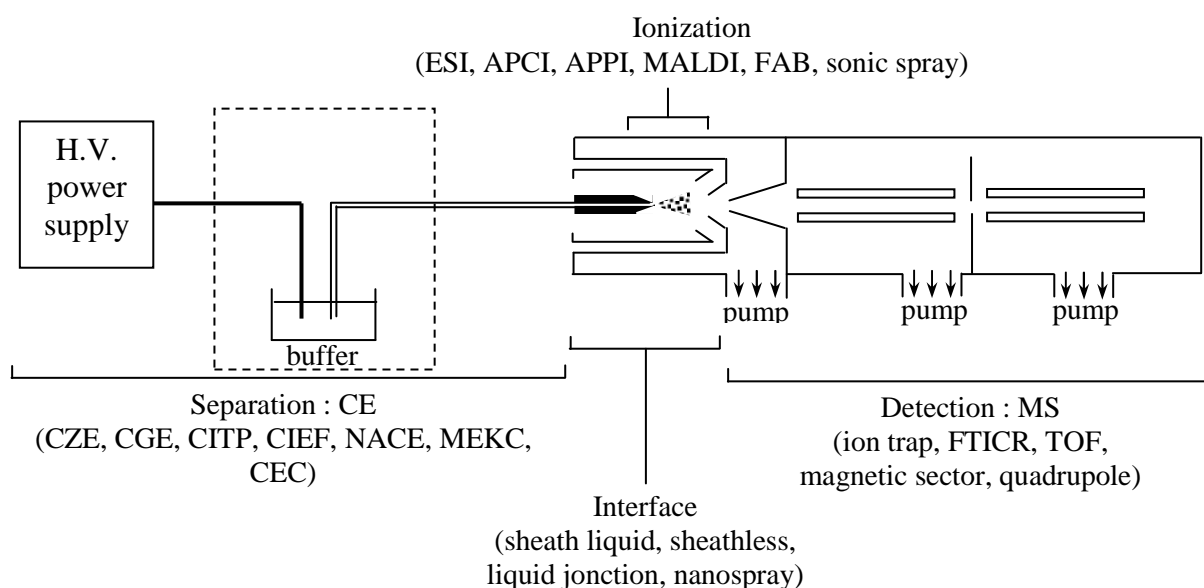


Figure 3 : Première représentation schématique de la configuration du couplage CE/MS [37]

La première interface pour le couplage CE/MS a été proposée en 1987 [37] utilisant le processus d'ionisation par électronébulisation ou « electrospray ionization » (ESI). Dès lors, des interfaces pour le couplage CE/MS ont été développées avec d'autres méthodes d'ionisation, y compris le bombardement rapide à débit continu d'atome (FAB) [38, 39], l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) [9, 40, 41], l'ionisation photochimique à pression atmosphérique (APPI) [10], l'induction par couplage plasma ICP [13], mais aussi la désorption/ionisation par laser assistée par une matrice (MALDI) [11, 12]. Parmi ces méthodes d'ionisation, l'électronebulisation (ESI) a été la plus souvent utilisée du fait de la mise en place relativement simple de son interface et de sa bonne stabilité, pour le couplage CE/MS.

Il est également important de rappeler que la mise en place d'une interface pour le couplage CE/MS, sans perte d'efficacité lors de la séparation en électrophorèse capillaire, a été une difficulté majeure. L'efficacité de la séparation peut être limitée par la possibilité réduite de types d'électrolytes de séparation en électrophorèse capillaire compatibles avec la spectrométrie de masse, ou par la construction de l'interface en elle-même. La sensibilité de la détection peut également être limitée par la faible quantité d'échantillon injectée en électrophorèse capillaire. Ainsi diverses interfaces ont été proposées afin de pallier ces contraintes.

Le couplage CE/MS a été utilisé pour diverses applications analytiques, comme des études pharmaceutiques, cliniques, environnementales, et agroalimentaires, où il est considéré comme une technique complémentaire à l'analyse par couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse (LC/MS). Cependant, son utilisation pour des analyses de routine a été limitée par la difficulté d'obtenir un système d'interfaçage robuste.

I.3.1 Ionisation par électronebulisation (ESI)

Dans le domaine des méthodes séparatives, l'ionisation par électronebulisation a été initialement utilisée pour le couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse LC/MS [42]. Le couplage en ligne de la CE/MS à l'aide d'une interface à électronebulisation a par la suite été mis au point [37].

Ainsi, divers types d'interfaces de CE/ESI-MS ont été construits, comme les interfaces à liquide additionnel coaxial, ou à jonction liquide, ainsi que les interfaces nanospray sans apport extérieur de liquide (sheathless). Plusieurs études ont été réalisées afin d'améliorer

l'efficacité de la séparation, la sensibilité de la détection, et la robustesse de la technique de couplage CE/ESI-MS.

I.3.1.1 Processus d'électronébulisation

Bien que le mécanisme de l'électronébulisation ne soit pas encore bien élucidé [43, 44], le processus peut être simplement décrit (Figure 4). Une solution d'échantillon est introduite dans un capillaire. Le champ électrique intense appliqué à la sortie de ce capillaire provoque la formation d'un nuage de gouttelettes chargées, de quelques micromètres de diamètre, qui traversent simultanément un gradient de champ électrique et un gradient de pression dans la direction de l'analyseur du spectromètre de masse. Pendant ce transport, la taille des gouttelettes diminue par évaporation du solvant et par explosions "coulombiennes" successives (divisions spontanées de la gouttelette chargée en gouttelettes plus petites, provoquées par une charge surfacique très élevée). L'application d'une pression à l'entrée du capillaire peut faciliter la nébulisation, suivant le débit utilisé et la composition du solvant. De plus, un flux de gaz nébulisant (de l'azote en général) est appliqué à l'interface pour aider à l'évaporation du solvant. Le gaz séchant, situé à l'entre de l'analyseur du spectromètre de masse, permet de parfaire le processus d'ionisation/désorption. Ce processus d'ionisation/désorption des espèces sous pression atmosphérique, encore mal défini, permet le transfert des espèces chargées d'une phase liquide en phase gazeuse, avec un très bon rendement d'ionisation [45].

Certaines interfaces sont également chauffées. Les ions formés sous pression atmosphérique sont alors canalisés par un ensemble d'échantillonneurs, c'est-à-dire un ensemble d'orifices sous pompage, vers l'analyseur où règne un vide poussé.

Afin d'augmenter la sensibilité de l'électronébulisation, la source a été peu à peu miniaturisée pour devenir le "micro électrospray" (micro ESI) ou le "nano électrospray" (nano ESI). Les débits, à la sortie de l'aiguille de nébulisation, sont dans ce cas de l'ordre de 30 à 40 nL.min⁻¹ au lieu de quelques μL.min⁻¹.

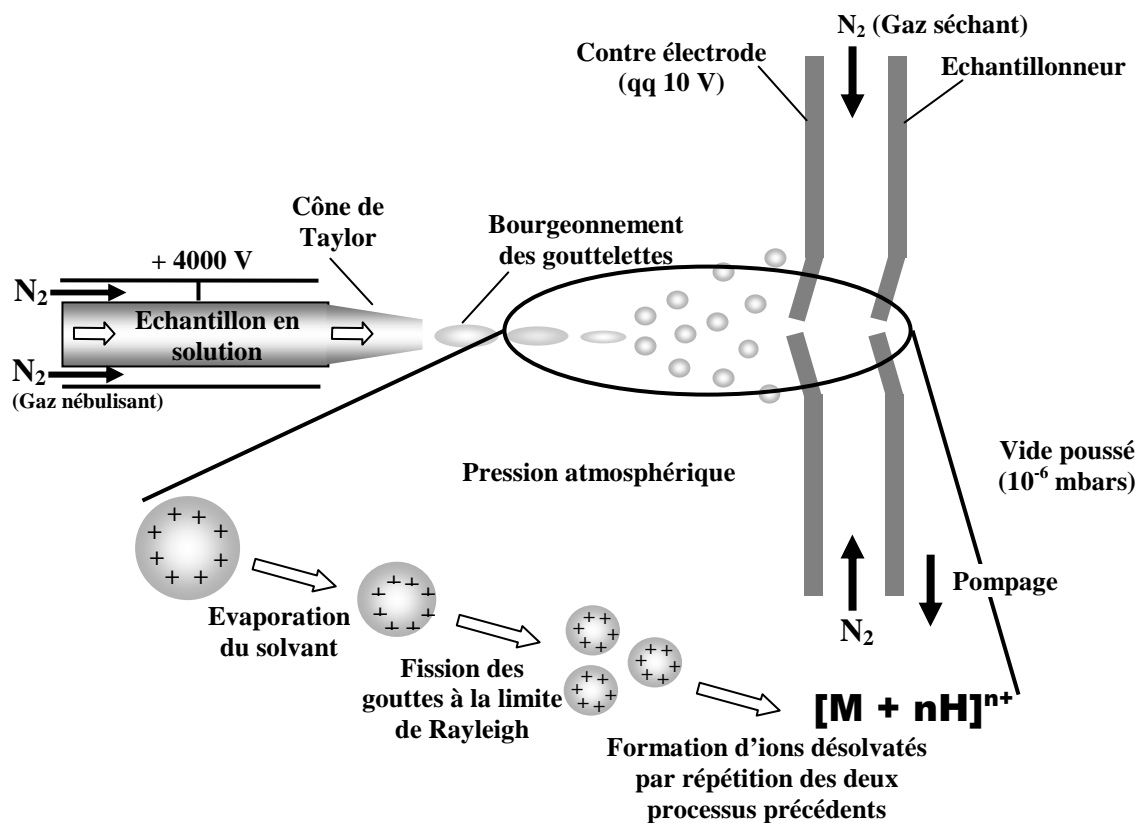


Figure 4 : Schéma de principe de l'ionisation/désorption par électronébulisation

L'un des avantages majeurs de l'électronébulisation, est son rendement d'ionisation élevé (20 - 50 %), surtout pour des espèces non-volatiles de masse moléculaire élevée [45]. Dans le milieu des années 80, Fenn et ses collaborateurs [42] ont montré, que l'électronébulisation de grosses molécules produisait des ions ayant une charge nette (z) qui augmentait avec la taille des molécules. Ainsi les instruments conventionnels de spectrométrie de masse peuvent être utilisés pour la détection d'espèces présentant des masses moléculaires supérieures à la limite supérieure m/z de l'instrument. L'année suivante ils ont également montré, que la masse moléculaire précise des protéines pouvait également être déterminée à partir de la distribution des différents états de charge (m/z) sur les spectres MS [52].

Depuis, l'étendue des applications de l'ESI-MS s'est largement développée de manière rapide et la disponibilité de l'instrumentation s'est largement accrue.

I.3.1.2 Interface CE/ESI-MS

La source d'ionisation par électronébulisation (ESI) permet l'ionisation en phase gazeuse de composés polaires ou chargés initialement présents en solution (cf. partie 3.1.1). Cette technique d'ionisation est donc particulièrement bien adaptée pour un couplage avec l'électrophorèse capillaire et constitue la source d'ionisation la plus largement employée en couplage CE/MS. Le transfert des analytes du capillaire d'électrophorèse jusqu'à la source d'électronébulisation est assuré par l'interface. Cette interface doit également permettre d'établir le contact électrique, nécessaire à la fois à l'application du champ électrique dans le capillaire de séparation et à l'application du champ électrique requis pour le processus d'électronébulisation dans la source d'ionisation. L'interface joue donc un rôle primordial dans la mise en œuvre du couplage CE/MS.

La première interface mise en place pour le couplage CE/MS a été proposée, en 1987, par Olivares et coll. [37], utilisant le processus d'ionisation par électronébulisation. Cette première interface a été réalisée en déposant une couche d'acier inoxydable (dépôt d'une couche d'argent) à l'extrémité de sortie du capillaire d'électrophorèse [46], afin de permettre le contact électrique aux bornes du capillaire et de réaliser le processus d'électronébulisation. L'ionisation par électronébulisation a été réalisée sous pression atmosphérique et l'interface chauffée à 60°C. Un flux de gaz (N_2 à 2,5 L/min) a également été introduit au niveau de l'interface afin de faciliter le processus de nébulisation. Cette première interface a donné de bons résultats du point de vue de la sensibilité de détection, mais a tout de même présenté certaines limitations, comme le faible débit d'électrophorèse inférieur au débit optimal requis pour l'électronébulisation, engendrant une instabilité du spray. Elle a présenté également des limitations du point de vue du choix de la nature de l'électrolyte de séparation. Les tampons aqueux et de conductivité élevée ne pouvaient pas être utilisés avec ce type d'interfaçage, du fait d'une part que la phase liquide devait être facilement évaporée durant le processus de nébulisation et d'autre part le risque d'avoir une compétition lors de l'ionisation, entre les espèces chargées de l'échantillon et de l'électrolyte. De plus, la durée de vie des capillaires était limitée à quelques jours : des réactions électrochimiques se produisaient au niveau du dépôt d'acier inoxydable à l'extrémité du capillaire en provoquant son décollement, engendrant ainsi une perte du contact électrique. Une solution a été proposée afin de pallier ce dernier inconvénient [46], en déposant une couche plus épaisse d'acier inoxydable, générant un écoulement électroosmotique plus élevé et assurant ainsi une durée de vie plus longue des

capillaires. L'utilisation de capillaires préalablement traités reste tout de même un facteur contraignant pour ce type d'interfaçage.

Afin de pallier tous ces inconvénients, d'autres types d'interfaces plus robustes, mais également plus performantes ont été développées.

1.3.1.2.1 Interface à liquide additionnel coaxial

Une amélioration de l'interface CE/ESI-MS a été proposée en 1988 par les mêmes auteurs [47, 48], mettant en place une jonction à liquide additionnel coaxial. Cette approche est actuellement la plus couramment employée pour coupler l'électrophorèse capillaire avec la spectrométrie de masse avec source à électronébulisation (ESI-MS) [49]. Par la suite, plusieurs améliorations ont été introduites permettant une meilleure stabilité ainsi qu'une meilleure répétabilité des analyses [35, 50-55].

Construction de l'interface

L'interface à liquide additionnel coaxial (Figure 5) se présente sous la forme de trois capillaires concentriques coaxiaux. Le capillaire le plus fin est un capillaire en silice vierge utilisé pour la séparation électrophorétique. Celui-ci est entouré par un capillaire central, habituellement fait d'acier inoxydable, assurant l'écoulement du liquide additionnel. Le capillaire externe, également fait d'acier inoxydable, assure l'écoulement du gaz nébulisant (air ou azote), favorisant le processus d'évaporation des ions lors de l'électronébulisation [48, 53, 56]. La tension d'électronébulisation généralement ± 3 à 8 kilovolt, est appliquée soit à l'extrémité de l'aiguille de nébulisation [52, 53], soit à l'entrée de l'analyseur MS [29].

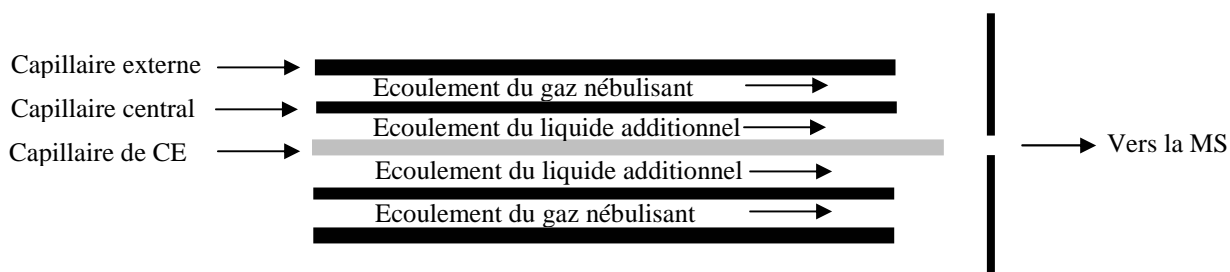


Figure 5 : Schéma de l'interface à liquide additionnel coaxial pour le couplage CE/ESI-MS

A l'extrémité de l'interface, la jonction entre les liquides et le gaz, se présente sous forme d'un cône dynamique, appelé « cône de Taylor » (Figure 4), à la pointe duquel sont émises les gouttelettes chargées, formant le spray de nébulisation. La jonction entre le liquide provenant du capillaire de séparation et le liquide additionnel permet de réaliser le contact électrique aux bornes du capillaire d'électrophorèse. Cette forme permet la réduction des volumes morts au niveau de la jonction entre le liquide additionnel et l'électrolyte de séparation, ainsi qu'une amélioration de la stabilité du processus d'électronébulisation [46].

- **Influence du liquide additionnel sur les performances du couplage CE/ESI-MS**

Principalement le liquide additionnel joue trois rôles importants dans le processus d'électronébulisation. Il permet de créer le contact électrique pour la séparation, de pallier les faibles débits d'électrophorèse et de favoriser également le phénomène d'ionisation/désorption de par sa composition chimique.

Durant l'analyse par couplage CE/ESI-MS, le liquide additionnel se mélange à la solution d'électrolyte de séparation à la sortie du capillaire d'électrophorèse et permet le contact électrique aux bornes du capillaire de séparation. Une tension est également appliquée au niveau de l'aiguille d'interface permettant le processus d'électronébulisation. Le liquide additionnel permet également d'augmenter le débit sortant du capillaire de séparation afin d'être compatible avec le débit nécessaire au processus d'électronébulisation [47, 52]. Le débit d'électrophorèse est généralement faible, inférieur à $300 \text{ nL}\cdot\text{min}^{-1}$ [30], lorsqu'on utilise des capillaires conventionnels en silice vierge de 50 à 75 μm de diamètre interne, par rapport aux débits requis en ESI-MS de l'ordre du $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ [47]. Généralement pour ce type d'interfaçage, le liquide additionnel est délivré à un débit de l'ordre de 1 à 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ [29, 52-54, 56-59]. Par ailleurs il a également été observé que le liquide additionnel, de par son débit élevé par rapport à celui de l'électrophorèse capillaire, pouvait engendrer une dilution de l'échantillon lors du mélangeage des deux fluides. Il a été constaté que l'abondance des pics diminuait lorsque le débit du liquide additionnel augmentait. [60, 61].

L'électrolyte de séparation et le liquide additionnel jouent un rôle important dans le processus de transfert des ions de l'analyte de la phase liquide en phase gazeuse, lors du phénomène d'ionisation/désorption. L'efficacité d'ionisation/désorption dépend en premier lieu des propriétés physico-chimiques de l'analyte (par exemple la valeur du pKa, de l'hydrophobie, de l'énergie de solvation des ions...) [62, 63]. De plus, vu que le liquide

additionnel représente une majeure partie de la phase liquide dans le processus d'électronébulisation, il doit être choisi de manière à faciliter l'ionisation des analytes. Le potentiel de début d'électronébulisation (tension minimale pour former le cône de Taylor, provoquant la formation d'une légère vapeur de gouttelettes chargées) augmente avec la tension superficielle de la solution [64].

Une faible tension de surface facilite la diminution de la taille des gouttelettes dans le processus d'évaporation et diminue la tendance à produire des décharges électriques non désirées. La conductivité de la solution est un autre paramètre critique. Le rayon des gouttelettes chargées produites dans le processus d'électronébulisation diminue lorsque la conductivité augmente [64, 65].

L'utilisation d'électrolytes de conductivité élevée conduit donc à des gouttelettes de petites tailles ce qui est favorable à la formation d'ions multichargés et par conséquent permet l'analyse d'un plus grand nombre de molécules pouvant avoir des masses moléculaires élevées, avec des analyseurs MS ayant des gammes de m/z restreintes [66]. En même temps, avec des électrolytes de conductivité élevée, la concurrence entre les charges de l'analyte et des ions de l'électrolyte peut diminuer la sensibilité de la détection, phénomène appelé suppression d'ionisation [62, 65]. Par ailleurs, le courant du spray augmentant avec la conductivité de la solution [65], le risque de former des décharges électriques augmente également. Il faudra donc trouver un compromis pour la conductivité de l'électrolyte afin d'obtenir une ionisation optimale des analytes et le minimum de suppression d'ionisation et minimiser également la formation de décharge électrique.

La viscosité de la solution est également un paramètre influant sur le processus d'électronébulisation. En effet, la faible viscosité de la solution permet la formation de plus petites gouttelettes initiales [64] améliorant l'efficacité du transfert des ions en phase gazeuse.

Le liquide additionnel se mélangeant à l'électrolyte de séparation à la sortie du capillaire d'électrophorèse peut également affecter l'efficacité et la sélectivité de la séparation électrophorétique [3, 28, 67]. La migration des contre-ions du liquide additionnel vers l'électrode d'entrée dans le capillaire de séparation a été observée dans certains cas, engendrant un déplacement des frontières ioniques à l'intérieur du capillaire. Ceci pourrait engendrer un retard et des inversions de l'ordre de migration ainsi qu'une diminution de la résolution de séparation [28]. Afin de pallier ce phénomène néfaste, plusieurs suggestions ont été faites incluant l'utilisation d'un contre-ion commun ou de pK_a ou de mobilité électrophorétique similaires, ou encore une augmentation du débit de l'électrolyte de séparation [3, 28].

Pour les raisons évoquées ci-dessus, le choix de la composition du liquide additionnel est primordial. Il devra fournir une faible tension superficielle, être volatil, peu visqueux, mais également être suffisamment conducteur pour maintenir le contact électrique aux bornes du capillaire d'électrophorèse et favoriser le processus d'électronébulisation. Cependant, il ne devra pas avoir une forte concentration ionique afin de minimiser les décharges électriques, et éviter la suppression d'ionisation des analytes en concurrence dans la gouttelette. Généralement, le liquide additionnel est choisi de manière à avoir une teneur élevée en solvant non aqueux avec une faible tension superficielle (tels que les alcools, l'acétonitrile, l'acétone) et un électrolyte volatil (tel que l'acétate ou le formiate d'ammonium, l'acide acétique, l'acide formique, l'hydroxyde d'ammonium) à faible concentration (< 25 mM) [28, 51, 58, 67-72].

- Optimisation des autres paramètres instrumentaux en CE/ESI-MS

La mise au point d'un couplage CE/ESI-MS stable avec une efficacité de séparation et une sensibilité de détection maximales comporte l'ajustement de divers autres paramètres instrumentaux tels que ceux de l'étape d'injection, la tension de séparation, la taille du capillaire de séparation, le positionnement du capillaire au niveau de l'interface et sa distance par rapport à l'analyseur de la MS [51, 52, 52, 73-75], ainsi que l'ajustement des paramètres de l'interface (les potentiels d'électronébulisation et de fragmentation, la pression de gaz nébulisant, le débit de liquide additionnel, ainsi que le débit et la température de gaz séchant). Beaucoup d'auteurs ont noté l'importance majeure du positionnement de l'extrémité du capillaire d'électrophorèse au niveau de l'interface par rapport à l'arrivée du liquide additionnel. Généralement, la réponse du signal et la stabilité optimale du système ont été obtenus lorsque le capillaire de séparation dépassait de 0,05-0,3 mm par rapport au capillaire d'introduction du liquide additionnel [56, 58, 68, 72, 74, 76]. Par ailleurs, afin de tenter d'améliorer la stabilité de l'électronébulisation, quelques auteurs proposent de retirer une petite partie de la gaine extérieure de polyimide à l'extrémité du capillaire en silice vierge, afin d'améliorer la mouillabilité par le liquide additionnel [68, 72]. On rapporte également que la mouillabilité est améliorée lorsque les parois de capillaires sont plus minces [57]. Il a également été noté que les dimensions des capillaires coaxiaux, tels que leurs diamètres internes et extérieurs et, par conséquent, l'épaisseur de la paroi, influençaient la sensibilité de la détection et la stabilité du courant ionique [53].

De même, les débits de gaz jouent un rôle important dans le couplage CE/ESI-MS. Il a été montré que le débit du gaz nébulisant affectait la réponse du signal [72, 77]. Ce dernier a pour rôle principal de former un spray de gouttelettes stable et continu à l'extrémité de l'aiguille d'interface, favorisant ainsi le processus d'électronébulisation. On a rapporté que ce dernier n'affectait que légèrement l'écoulement au sein du capillaire d'électrophorèse, pour des diamètres internes inférieurs à 50 μm , mais accélère nettement l'écoulement pour des diamètres plus élevés jusqu'à 100 μm [76, 78]. Le gaz nébulisant produirait donc un écoulement hydrodynamique supplémentaire au sein du capillaire de séparation (effet d'aspiration ou de succion), ayant donc une influence significative sur les temps de migration des analytes, la sensibilité de détection et la résolution de la séparation [60, 78-81]. Du fait de cet effet d'aspiration, quelques auteurs [58] proposent de couper les arrivées de gaz nébulisant et séchant durant l'injection hydrodynamique de l'échantillon, afin de minimiser l'erreur sur la quantité injectée, si l'écoulement le permet.

Le gaz séchant, situé à l'entrée de la source du spectromètre de masse, permet de compléter l'évaporation du solvant, avant l'introduction des ions dans le capillaire de transfert de la MS. Ce paramètre est important à optimiser, afin d'obtenir la meilleure sensibilité, car sans une évaporation complète du solvant, la sensibilité de détection ne sera pas optimale. Des recherches ont été réalisées afin de voir l'influence de la température et du débit de gaz séchant sur l'efficacité de séparation [77], mais aucune influence du gaz séchant n'a été constatée sur les performances de la séparation électrophorétique lors de cette étude.

Les tensions d'électronébulisation et de fragmentation, sont également des paramètres à optimiser, afin d'obtenir respectivement les meilleurs rendements d'ionisation et la fragmentation adéquate.

En conclusion, l'inconvénient principal de l'interface à liquide additionnel coaxial est l'optimisation préalable des paramètres d'électrophorèse et des paramètres d'interface, afin d'obtenir les meilleures efficacités de séparation et la meilleure sensibilité de détection en MS. Un autre inconvénient à cette interface reste la faible sensibilité de détection en MS, due à la dilution de l'échantillon par le liquide additionnel [35] et au phénomène de suppression d'ionisation par les ions du liquide additionnel [52, 62]. Mais cette interface présente plusieurs avantages [52], dont la possibilité de changer facilement les capillaires d'électrophorèse, sans aucun traitement préalable. Elle permet également une grande flexibilité dans le choix de la nature de l'électrolyte de séparation et du liquide additionnel,

afin d'améliorer l'efficacité de l'ionisation. Elle présente aussi l'avantage de minimiser les volumes morts au niveau de l'interface [46].

1.3.1.2.2 Interface à jonction liquide

Un second type d'interface à électronébulisation pour le couplage CE/ESI-MS a été mis en place vers la fin des années 80 [82], l'interface à jonction liquide. Cette interface utilise l'approche de l'interface à liquide additionnel coaxial, mais diffère dans la jonction entre le liquide additionnel et l'électrolyte de séparation. Le capillaire de séparation est connecté à un capillaire de transfert utilisé pour l'électronébulisation, proche de la source du spectromètre de masse [82], par jonction liquide, à l'aide d'un réservoir de liquide, permettant entre autres le contact électrique aux bornes du capillaire d'électrophorèse (Figure 6). L'espace est généralement ajusté sur une distance de 10-25 μm afin de permettre à une quantité suffisante de liquide d'être introduit dans le capillaire de transfert tout en évitant la perte des analytes [1, 83, 84].

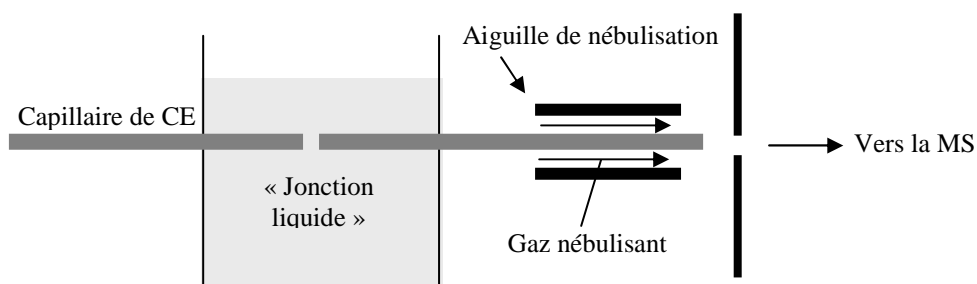


Figure 6 : Schéma de l'interface à jonction liquide

L'avantage de cette interface est la déconnexion physique entre le capillaire de séparation et l'aiguille d'électronébulisation, permettant un plus grand choix pour la nature du liquide de jonction, afin d'améliorer et d'optimiser le processus d'électronébulisation [2]. Mais l'interface à jonction liquide n'est pas aussi largement utilisée que l'interface à liquide additionnel coaxial en couplage CE/ESI-MS. L'inconvénient principal de cette interface est qu'elle exige une grande précision lors de l'alignement des capillaires de séparation et de transfert [50,85]. L'élargissement des pics, ainsi que la perte d'efficacité de la séparation et le bruit de fond plus élevé qu'avec une interface à liquide additionnel coaxial ont été également

constatés [50]. L'interface à jonction liquide est également assez laborieuse à mettre en place et peu robuste [50, 52-55].

1.3.1.2.3 Interface nanospray sans apport extérieur de liquide (sheathless)

La première interface de CE/MS, décrite en 1987, a utilisé le principe « sheathless » pour le couplage CE/ESI-MS, signifiant qu'aucun liquide additionnel n'est rajouté [Erreur ! Signet non défini.]. C'est en raison des problèmes de stabilité du spray, avec cette première interface, que des interfaces à jonction liquide ont été par la suite proposées [47, 48, 82]. Plus tard, diverses interfaces sans apport extérieur de liquide pour le couplage CE/ESI-MS, avec une approche nanospray, ont été développées afin de surmonter l'inconvénient de la faible sensibilité rencontrée avec les interfaces à jonction liquide. Dans une interface nanospray sans apport de liquide extérieur, l'électronébulisation est effectuée au bout d'un capillaire étroit de nébulisation [35]. La construction d'une interface nanospray sans apport de liquide extérieur stable et robuste pour un usage à long terme semble être difficile, cependant beaucoup de groupes de recherches y ont œuvré.

L'amélioration de la sensibilité de l'ionisation par électronébulisation exige souvent de diminuer le débit de l'électrolyte et de miniaturiser l'interface d'électronébulisation. Au début du processus d'électronébulisation, les ions fortement chargés s'accumulent près de l'extrémité du capillaire d'électronébulisation et sont électriquement attirés par la contre électrode, permettant ainsi à l'écoulement du liquide naissant de se diriger dans la direction de la contre électrode. Le liquide forme un cône de Taylor, lié à la tension superficielle des gouttelettes. Le diamètre du spray du liquide, émergeant du cône de Taylor et, par conséquent, le diamètre initial des gouttelettes formées, diminue proportionnellement avec le débit de l'écoulement [64]. Plus la gouttelette est petite, plus sa densité de charge volumique est élevée, ce qui permet qu'une plus grande proportion de molécules d'analyte soit disponible lors du processus d'ionisation/désorption [66]. Ainsi, l'augmentation de la proportion des petites gouttelettes transférées améliore la sensibilité. En outre, les interfaces avec une plus petite ouverture permettent une dispersion plus étroite des gouttelettes, assurant un meilleur transfert de l'échantillon vers l'analyseur du spectromètre de masse [64]. Les volumes des gouttelettes sont environ 100 à 1000 fois plus petits avec les interfaces nanospray, à faible débit (20 nL/min), comparé aux volumes des gouttelettes produites par les interfaces à

électronébulisation, utilisant un liquide additionnel [66]. Ainsi, les gouttelettes s'évaporent plus rapidement et les interfaces nanospray peuvent ainsi être placées à 1 ou 2 mm de l'orifice du système sous vide, afin améliorer l'efficacité du transfert des ions.

Le diamètre interne de l'interface à électronébulisation, ainsi que le débit sortant du capillaire, sont donc deux paramètres à prendre en considération lors de la construction d'une interface pour le couplage CE/ESI-MS, afin d'obtenir un spray d'électronébulisation stable. Généralement, les faibles débits sont obtenus avec de petits diamètres internes de capillaires [86]. C'est donc en allant dans cette optique que les interfaces nanospray ont été mises au point.

Il existe une grande variété d'interfaces nanospray sans apport de liquide extérieur (sheathless), classables en trois catégories selon leur configuration. L'interface la plus commune, utilise un capillaire d'électrophorèse en silice vierge sur lequel est déposé un matériau conducteur à l'extrémité de sortie de celui-ci, afin de réaliser le contact électrique (Figure 7a) [87-89]. Le deuxième type d'interface inclut les interfaces dans lesquelles une aiguille nanospray ou un capillaire conique sont rattachés au capillaire de séparation par l'intermédiaire d'une jonction, engendrant de faibles volumes morts, et sur laquelle se trouve directement l'électrode (Figure 7b). Les jonctions peuvent être faites à partir d'un tube en téflon, en silice vierge, de connecteurs [90] ou de douilles en téflon avec un fritté de laines de verre [91]. Une autre interface a été proposée dans cette même catégorie de jonction, mettant en place une interface présentant une géométrie en forme de T, reliant le capillaire d'électrophorèse au capillaire de nébulisation par l'intermédiaire d'une pièce en élastomère, à travers de laquelle un fil d'or est placé orthogonalement aux deux capillaires permettant le contact électrique [86]. Dans la troisième catégorie, les interfaces se composent d'un capillaire d'électrophorèse en silice vierge à bout conique, et d'un fil conducteur inséré à l'intérieur du capillaire de séparation (Figure 7c). Le fil, généralement en platine, est inséré à l'extrémité du capillaire de séparation ou est vissé par un petit orifice dans le capillaire à proximité de sa sortie [92]. Une autre configuration d'interface a été proposée dans le même esprit, où l'électrolyte de séparation entre en contact avec un tube environnant en métal, par l'intermédiaire d'un orifice réalisé sur le capillaire d'électrophorèse, servant de sortie de la CE et d'électrode d'électronébulisation [49].

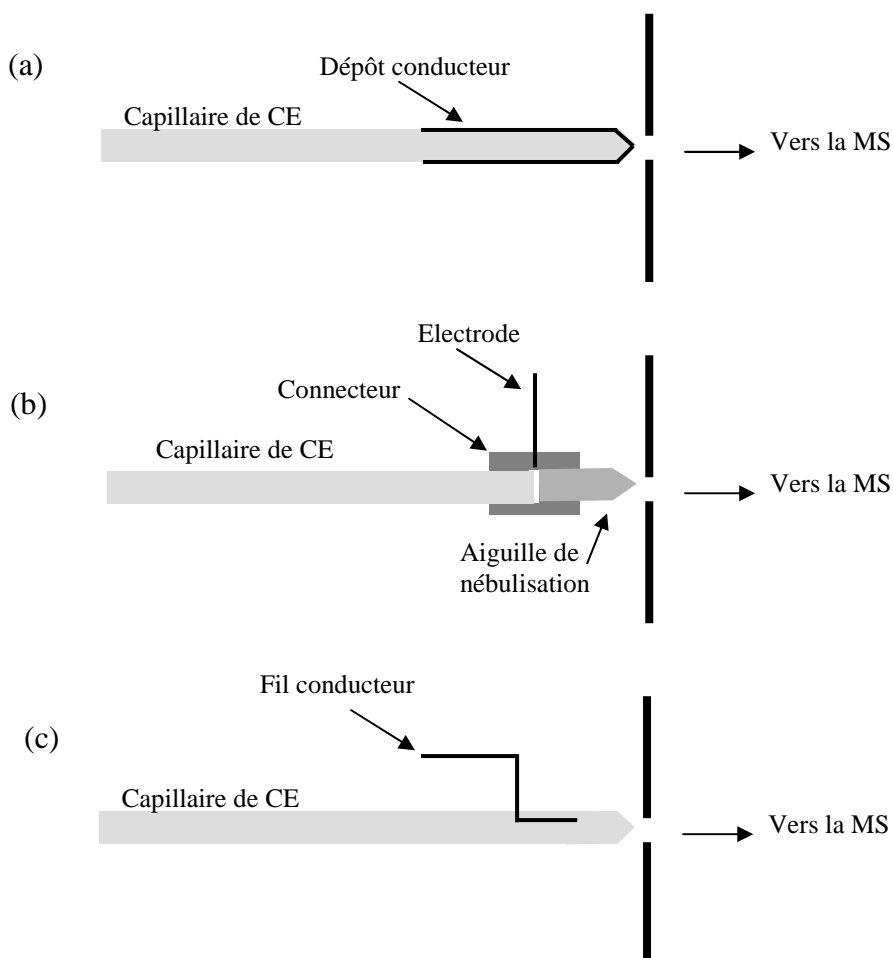


Figure 7 : Schémas d'interfaces nanospray sans apport de liquide extérieur (a) avec dépôt conducteur à l'extrémité du capillaire, (b) avec jonction liquide entre le capillaire de séparation et le capillaire de nébulisation (c) avec fil conducteur inséré à l'intérieur du capillaire

L'inconvénient de ce type d'interfaces est qu'elles sont assez fragiles et nécessitent l'utilisation de capillaires préalablement traités, ce qui représente une contrainte importante et freine parfois leur utilisation pour certaines applications.

En conclusion, on peut dire que différents types d'interfaces, pour le couplage CE/ESI-MS, ont été proposés, présentant chacune leurs avantages et leurs inconvénients. Ainsi, suivant la nature des analytes et la sensibilité requise, on pourrait envisager l'utilisation de l'une ou l'autre de ces interfaces.

I.3.2 Autres modes d'ionisation

L'interface ICP (Inductively Coupled Plasma) est la seconde interface la plus utilisée pour le couplage CE/MS. Son principal champ d'application est l'analyse des métaux ou des composés métalliques [13, 93, 94]. La popularité de l'électrophorèse capillaire, en tant que technique séparative pour « des analyses de spéciation », a entraîné un engouement accru de l'utilisation du couplage CE/ICP-MS pour un grand nombre d'applications [94]. Un autre domaine dans lequel le couplage CE/ICP-MS joue également un rôle prépondérant est la détermination des constantes d'affinité protéines-métaux (MPBs).

Comme l'interface à électronébulisation ne fournit pas de rendement d'ionisation optimum pour tous les types d'analytes séparés par électrophorèse capillaire. D'autres types d'interfaces comme l'interface à ionisation photochimique sous pression atmosphérique (APPI) [95, 96] ou l'interface à ionisation chimique sous pression atmosphérique (APCI) [41] ont été développées dans le but d'améliorer l'efficacité d'ionisation/désorption.

Bien que l'interface APCI permette d'obtenir de meilleures sensibilités, comparée à l'interface à électronébulisation pour les composés peu polaires, actuellement il y a peu d'applications utilisant ce type d'interface. Ceci s'explique par le fait que les interfaces APCI, initialement conçues pour le couplage LC/MS, nécessitent des débits élevés. Ainsi en augmentant le débit de liquide additionnel, lors du couplage CE/MS, un faible rapport signal/bruit (S/N) a été observé [105]. Une interface APCI simple et permettant d'utiliser de faibles débits (entre 1-10 $\mu\text{L}/\text{min}$), pour les séparations électrophorétiques, a été développée [41], par contre aucune amélioration de la sensibilité de détection n'a été démontrée comparée à l'ESI-MS.

Plus récemment, l'interface à ionisation photochimique sous pression atmosphérique (APPI) a été développée pour les séparations électrophorétiques [10, 97]. Cette interface présente l'avantage majeur de permettre l'utilisation d'électrolytes de séparation volatils et non volatils, contrairement à l'interface à électronébulisation, d'améliorer la sensibilité de détection du couplage CE/MS, mais également permet de travailler à de faibles débits.

I.4- Techniques électrophorétiques utilisées en couplage CE/ESI-MS

I.4.1 CZE/ESI-MS

La technique électrophorétique la plus répandue et la plus utilisée est l'électrophorèse capillaire de zone (CZE), technique selon laquelle les analytes sont séparés selon leur différence de mobilité électrophorétique, sous l'action d'un champ électrique. Lors du couplage de la détection par spectrométrie de masse avec en amont une technique électrophorétique, la CZE rencontre une plus grande popularité, comparée aux autres techniques électrophorétiques, car ces dernières peuvent parfois présenter certaines incompatibilités avec ce type de détection (voir plus loin) [25]. Un grand nombre d'applications, citées dans la littérature prouvent la popularité de cette technique analytique séparative (cf partie I.6). Par contre, on rencontre certaines limitations lors d'analyses par couplage CZE-MS, telles que la restriction d'emploi des électrolytes de séparation non volatils (tel que les tampons phosphate ou borate), pouvant affecter le processus d'électronébulisation, provoquer un encrassement de la source MS, empêcher ainsi le transfert des ions et diminuer le signal de détection en MS [1, 31]. Lors de l'analyse de protéines ou de peptides, en capillaire en silice vierge, des problèmes d'interactions analyte/paroi peuvent parfois être rencontrés, affectant considérablement les séparations. Des traitements de la paroi interne des capillaires sont alors nécessaires (cf. partie I.5). La CZE ne permet pas de séparer tous les types d'analytes, tels que les espèces neutres. D'autres techniques électrophorétiques couplées à la spectrométrie de masse sont alors proposées.

L'électrophorèse capillaire en milieu non aqueux (NACE) offre plusieurs avantages par rapport aux séparations électrophorétiques en milieu aqueux, particulièrement lors du couplage avec la détection par spectrométrie de masse. Les séparations en milieu organique utilisés en NACE génèrent de faibles courants électriques et permettent d'obtenir de meilleures sensibilités de détection, ainsi qu'un spray d'électronébulisation stable, en raison de leur faible viscosité et de leur volatilité élevée [98-100]. Les séparations de peptides et de protéines par couplage NACE/ESI-MS restent très limitées et ne sont réalisées que pour des analyses de mélanges de peptides et de protéines de nature hydrophobe [99, 101-103]. Les milieux organiques tels que le méthanol (MeOH), l'acétonitrile (ACN) ou encore l'isopropanol (2-propanol) ont été le plus fréquemment utilisés. L'acétonitrile a été plus particulièrement utilisé, afin d'améliorer la forme des pics des peptides et d'accélérer le flux

électroosmotique [99]. L'effet favorable de ce milieu organique est probablement qu'il minimise l'adsorption des peptides et des protéines sur la paroi interne du capillaire [101].

I.4.2 MEKC/ESI-MS

Afin de réaliser des séparations de composés énantiomères ou encore d'espèces neutres, des méthodes utilisant le principe des interactions chromatographiques peuvent être utilisées. Malheureusement, de tels systèmes utilisent souvent des additifs non volatils dans l'électrolyte de séparation, risquant d'encrasser la source du spectromètre de masse, ayant ainsi pour conséquence un bruit de fond élevé sur la ligne de base et réduisant considérablement la sensibilité. Néanmoins, on trouve dans la littérature actuelle différentes approches proposant le couplage de séparations électrophorétiques chirales MEKC (Micellar Electrokinetic Chromatography), généralement utilisé pour la séparation d'espèces énantiomères ou la séparation de composés neutres, avec la détection MS [104, 105]. Pour le couplage MEKC avec la détection MS, deux approches différentes peuvent être trouvées, à savoir, l'utilisation de surfactants volatils [106] ou des techniques empêchant la migration des ingrédients non volatils de l'électrolyte de séparation vers la source MS, avec la méthode de remplissage partiel [107, 108].

I.4.3 cITP/ESI-MS

L'isotachophorèse en capillaire (cITP) est considérée comme étant une technique électrophorétique préparative, permettant la préconcentration d'échantillons à partir de grand volumes injectés (de l'ordre du μL , comparée à la CZE classique de l'ordre du nL). L'ITP est le plus souvent utilisée en tant qu'étape de préconcentration en ligne, avant la séparation par CZE. La mise en couplage de la cITP avec une détection ESI-MS semble être une technique très attrayante pour l'analyse d'échantillons dilués. Des travaux publiés sur ce couplage [109] ont montré que pour des échantillons de faibles concentrations, les zones préconcentrées généralement bien définies se trouvaient dégradées (chevauchement des zones) lors du couplage, engendrant une baisse significative du signal de détection MS. Afin de résoudre ce problème, un système de couplage ITP-CZE/MS a été mis en place [109].

I.4.4 CEC/ESI-MS

L'électrochromatographie (CEC) est considérée comme une technique hybride de l'électrophorèse capillaire et de la chromatographie en phase liquide (HPLC), combinant la haute efficacité avec la haute sélectivité de la première technique [110, 111] et la grande variété des phases stationnaires disponibles de la deuxième technique [112]. La séparation est basée sur le principe de la distribution de l'analyte entre la « phase mobile » et la « phase stationnaire » en chromatographique, ainsi que sur la différence de mobilités électrophorétiques des espèces chargées [113]. Les solutés sont ainsi séparés suivant leur mobilité électrophorétique et leur coefficient de distribution entre la phase mobile et la phase stationnaire. Différents types d'interface ont été utilisés pour le couplage CEC/ESI-MS tels que les interfaces à liquide additionnel coaxial, les interfaces nanospray et les interfaces à jonction liquide [113]. On trouve comme applications au couplage CEC/ESI-MS, principalement l'analyse de peptides modèles [112-115], ainsi que l'analyse de Myoglobine digérée [115], d'Hémoglobine, de β -Lactoglobuline A [111] et d'Albumine de sérum de bœuf (BSA) [116].

I.4.5 CIEF/ESI-MS

L'analyse séparative par focalisation isoélectrique en capillaire (CIEF) fournit les efficacités les plus élevées pour les séparations de protéines. De ce fait la mise en couplage de la CIEF avec une détection ESI-MS offrirait un outil puissant pour l'analyse d'échantillons très complexes [3]. Le couplage CIEF/ESI-MS présente tout de même certaines limitations, telles que l'introduction des ampholytes non-volatils vers l'analyseur MS et le transfert des zones focalisées vers le spectromètre de masse sans provoquer leur élargissement. Afin de pallier ce dernier inconvénient, une mobilisation cathodique combinée à un système gravimétrique a été proposée [117, 118]. Et afin de résoudre le problème concernant l'influence des ampholytes sur l'efficacité d'ionisation, une interface de dialyse, placée en amont de l'aiguille d'électronébulisation a été développée [119]. En outre, l'introduction d'une seconde dimension, telle que la CZE ou la chromatographie liquide en phase inverse (RPLC) permet également l'élimination des ampholytes avant leur introduction dans la source du spectromètre de masse [120]. Certaines des applications reportées dans la littérature, utilisant le couplage CIEF/ESI-MS, ont été réalisées pour la séparation de mélanges de protéine très complexes, avec un spectromètre de masse de résonance cyclotronique à Transformée de Fourier (FTICR) [117, 118, 121, 122] (cf. chapitre IV).

I.5- Traitement de surface de la paroi interne des capillaires d'électrophorèse pour le couplage CE/ESI-MS

La paroi interne des capillaires d'électrophorèse, initialement en silice vierge, est chargée négativement. Il est parfois nécessaire de la modifier à l'aide entre autres de polymères, en changeant ainsi son état de charge. En effet, la mobilité électroosmotique intervient dans la sélectivité apparente (définie comme le rapport des mobilités apparentes) de la séparation et joue donc un rôle primordial. Par ailleurs, l'inversion ou la suppression de l'écoulement électroosmotique par un changement de l'état de surface du capillaire, permet entre autres de limiter les interactions soluté/capillaire, particulièrement dans le cas de l'adsorption des peptides ou des protéines [123]. L'adsorption des protéines sur la paroi interne du capillaire semble être la principale raison d'une perte d'efficacité notée [124] et de la faible répétabilité des temps d'analyse [125]. Lors d'analyses par couplage CE/ESI-MS, on rencontre évidemment les mêmes soucis d'adsorption. De plus, un flux électroosmotique constant est requis dans la configuration d'un couplage CZE/ESI-MS, afin de maintenir un contact électrique stable aux bornes du capillaire de séparation. Le contrôle de l'amplitude et de la direction de l'écoulement électroosmotique représente, par conséquent, un des enjeux majeurs dans les séparations électrocinétiques capillaires couplées à la spectrométrie de masse. Il existe actuellement un nombre de traitements de surface assez important, permettant une diminution, une suppression voire une inversion du flux électroosmotique, quel que soit le pH de l'électrolyte de séparation [1, 3 24, 126]. Malheureusement tous ne sont pas compatibles avec le couplage CE/ESI-MS, à cause d'un éventuel relargage des polymères adsorbés sur la paroi du capillaire vers la source du spectromètre de masse, pouvant l'encrasser et engendrer une détérioration de la sensibilité de détection [127, 128]. Une température élevée au sein de l'aiguille d'interface apportée par le gaz nébulisation, pourrait également détériorer ce traitement de surface. Par conséquent, différentes stratégies ont été mises au point pour le couplage CE/ESI-MS, afin de surmonter cette limitation [1, 83].

Une des approches consiste à utiliser des capillaires dont la paroi interne a été greffée de manière covalente par des polymères cationiques tels que le ((3-aminopropyl)-triméthoxysilane (APS) [129-131], le chlorure de 3-(méthacryloylamino)-propyl triméthylammonium (MAPTAC) [90, 132], ou le chlorure d'[(acryloylamino)propyl]-triméthylammonium (BCQ) [133]; des polymères anioniques tels que l'acide poly(2-acrylamido-2-méthyl-1-propanesulfonique) [134] ou des polymères neutres tels que l'hydroxypropylméthylcellulose (HPMC) [135], l'alcool polyvinylique (PVA) [136, 137], ou

le polyacrylamide [177, 138]. Cependant, les principales limitations de ces types de greffages covalents sont qu'ils nécessitent de longues étapes de traitement du capillaire, qu'ils n'ont malheureusement que des durées de vie relativement limitées (1-2 jours), et qu'ils présentent une instabilité aux pH extrêmes. Le prix élevé des capillaires greffés, disponibles dans le commerce, est également un inconvénient important à prendre en considération [3].

D'autres approches de traitement de la paroi interne du capillaire pour le couplage CE/ESI-MS, afin de réduire l'adsorption des protéines, consistent en la modification dynamique de la paroi par une mono-couche [139] ou des multi-couches [140] de polymères.

Des modifications dynamiques de la paroi interne de capillaires avec du polybrène (bromure d'héxadimétrine), polymère polycationique, ont souvent été utilisées pour des analyses par couplage CZE/ESI-MS [141, 142]. Grâce à ces capillaires, de meilleures résolutions ont été obtenues en limitant l'adsorption des composés sur la paroi interne des capillaires [143]. Il a également été montré que la réalisation de la modification dynamique avec le polybrène était reproductible, durable et facile à mettre en œuvre. L'inconvénient de cette modification est qu'elle est instable en milieux organiques (méthanol), sachant que ceux-ci sont souvent rajoutés à l'électrolyte de séparation lorsque des interfaces à électronebulisation « sheathless » sont utilisées [126]. Une régénération du polymère est parfois nécessaire entre chaque analyse [144], ce qui peut être un inconvénient majeur pour le couplage CE/ESI-MS. Le capillaire devra alors être retiré de l'aiguille d'interface, entre chaque analyse pendant l'étape de régénération, afin de minimiser la contamination de la source MS par le polymère. Afin de pallier certains de ces inconvénients et de « renforcer » le maintien de la modification dynamique, une alternative a été proposée, la modification dynamique multicouches (SMIL : Successive Multiple Ionic-polymer Layers) [145]. Ce traitement consiste en un dépôt successif multiple de polymères ioniques, avec un état de charge global de la paroi interne positif. Les polymères utilisés sont le polybrène, en tant que polymère polycationique, et le sulfate de dextran ou l'acide hyaluronique, en tant que polymères polyanioniques, compatibles avec la source MS. Il a été démontré que la modification était très stable avec une résistance élevée. Des séparations de protéines et de peptides ont montré des analyses rapides et reproductibles [146]. Ce type de traitement a également été utilisé pour l'analyse d'autre type de composés tel que les phospholypase [147] ou l'analyse d'espèces anioniques comme les métabolites intracellulaires [148].

Une modification de la paroi interne du capillaire pour le couplage CE/ESI-MS a été proposée utilisant un polymère, l'éthylpyrrolidine méthacrylate-N,N-diméthylacrylamide

(EPyM-DMA). Ce type de modification est assez simple et facile à mettre en œuvre, n'exigeant qu'une étape de pré-conditionnement du capillaire avec la solution de polymère aqueux pendant 2 min. Il a été démontré que l'utilisation de ce type de capillaire modifié réduisait significativement l'adsorption électrostatique des protéines basiques sur la paroi interne du capillaire, et était compatible avec l'ESI-MS, permettant d'obtenir des séparations reproductibles de ces protéines basiques [149]. L'inconvénient majeur de cette technique est qu'elle nécessite une régénération de la paroi avant chaque analyse avec la solution de polymères.

On trouve également dans la littérature l'utilisation d'autres polymères polycationiques polyaminés pour la modification de la paroi interne du capillaire : le poly E-323 [150] et le poly-LA 313 [151], permettant d'obtenir des séparations relativement rapides de protéines basiques. Ces polymères ont l'avantage d'être compatibles avec le méthanol et l'acétonitrile, et présentent également une bonne stabilité de la modification sur la gamme de pH de 2 à 10. La mise en œuvre de cette modification dynamique est aisée et rapide à réaliser, mais nécessite une régénération fréquente.

Des modifications de la paroi interne du capillaire par adsorption d'une double-couche de polymères sont aussi proposées. La formation de cette double-couche est réalisée par des rinçages successifs de la paroi interne du capillaire avec une solution de polymères positivement chargés et une solution de polymères négativement chargés. La paroi interne du capillaire est alors chargée négativement, permettant de réaliser des séparations en polarité positive, tout en minimisant l'interaction analyte/paroi. On trouve comme exemple de modification par double-couche, compatible pour des analyses par couplage CE/ESI-MS, le polybrène (polymère polycationique) et le sulfonate de polyvinyle (PVS) (polymère polyanionique) [152]. Les résultats obtenus avec ce type de capillaires modifiés, ont montré des séparations rapides d'un mélange de peptides, ainsi qu'une bonne efficacité de séparation. De plus, la présence de la double-couche de polymère n'a pas engendré de bruit de fond supplémentaire, et les séparations obtenues étaient stables et reproductibles [153]. D'autres polymères anioniques, associés au polybrène, ont été utilisés pour la modification double-couche de la paroi interne du capillaire, pour les analyses par couplage CE/ESI-MS, tel que l'éthylène glycol [154]. Les inconvénients liés à ces polymères sont leur instabilité en milieu organique, et la nécessité d'une régénération quotidienne de la paroi avec la solution de polymères.

Des modifications de la paroi interne du capillaire par des polymères neutres hydrophiles, sont également réalisées. Le traitement du capillaire est soit réalisé par une

modification de la paroi interne du capillaire par le polymère ou bien le polymère est rajouté à l'électrolyte de séparation. Des polymères hydrophiles neutres tel que le Dextran [155], ont été utilisés pour des greffages covalents ou des modifications dynamiques. Ces polymères forment une couche épaisse de viscosité très élevée contre la paroi interne du capillaire, permettant ainsi d'éliminer efficacement le flux électroosmotique.

Des kits pour la modification dynamique de la paroi interne du capillaire pour des analyses par couplage CE/ESI-MS sont également proposés dans le commerce. Les polymères utilisés sont déclarés compatibles avec la source du spectromètre de masse et ne provoquent pas son encrassement. Cette modification permet d'obtenir un écoulement électroosmotique cathodique rapide et constant dans le domaine des faibles pH. [156, 157]. Le protocole consiste à faire percoler successivement deux solutions de polymères, l'un cationique (l'initiateur) et l'autre anionique (l'accélérateur).

Ainsi, plusieurs procédés de traitement de la paroi interne du capillaire ont été proposés, permettant d'aboutir à des résultats satisfaisants. Cependant, il serait très intéressant de comparer toutes ces approches. C'est dans cette optique qu'une étude a par ailleurs été effectuée afin d'optimiser la stabilité et la performance de différent type de modifications de la paroi interne des capillaires d'électrophorèse, en termes de nature et de concentration des polyélectrolytes [158].

On dispose donc de différentes approches de traitement de la paroi interne du capillaire d'électrophorèse, pour les analyses en couplage CE/ESI-MS. Ces techniques peuvent parfois être laborieuses à mettre en œuvre, et risquer d'encrasser la source du spectromètre de masse. Il serait alors souhaitable, lorsque cela est permis, de trouver d'autres alternatives permettant d'utiliser des capillaires en silice vierge.

I.6- Applications du couplage CE/ESI-MS

L'électrophorèse capillaire est une technique séparative intrinsèquement adaptée à l'analyse de composés chargés ou très polaires, voire neutres avec un phénomène d'affinité avec une phase chargée. Les principes de séparation caractéristiques de l'électrophorèse capillaire apportent des informations complémentaires à celles qui peuvent être obtenues en chromatographie liquide entre autres. Cette technique séparative miniaturisée permet par ailleurs de bénéficier d'une très faible consommation d'échantillon et de solvants, et d'une grande efficacité de séparation. Le couplage CE/ESI-MS permet de bénéficier des avantages de l'électrophorèse capillaire alliés à la sensibilité et aux grandes capacités d'identification de la spectrométrie de masse.

Un intérêt majeur s'est donc porté sur l'utilisation du couplage CE/ESI-MS pour l'analyse et la caractérisation de divers composés. Ce couplage a connu un développement considérable en ce qui concerne sa mise en place et son application pour l'analyse et la caractérisation de divers composés, avec l'utilisation de divers mode de CE, et ce dans de multiples domaines. On a constaté également l'apparition d'un nombre croissant de fabricants proposant des instruments de couplage CE/ESI-MS prêts à l'emploi, représentant un grand pas en avant pour l'application de cette technique pour des analyses de routine. Les différents types d'interfaces utilisées pour la mise en ligne du couplage CE/ESI-MS se sont aussi largement développés, et on retrouve une large gamme d'interfaces spécifiques aux analyses requises. La diversité des instrumentations de spectrométrie de masse permet également de réaliser des analyses plus complexes et d'accéder à des informations essentielles.

Ce grand nombre d'applications a été reporté dans différentes revues de la littérature relatant de l'engouement accru du couplage CE/ESI-MS pour l'analyse de différents types de molécules, dont les biomolécules, les composés pharmaceutiques et les polluants environnementaux, ainsi que de la complexité de la mise au point de ce types d'analyses, et les problèmes pouvant parfois être rencontrés [3, 4, 22, 24, 126, 159, 160].

Une description non exhaustive de certaines applications sera reportée dans les tableaux qui suivent, selon les divers domaines d'application [, 126].

- **Analyse d'acides aminés, de peptides et de protéines**

Plusieurs approches sont proposées pour l'analyse et la séparation des peptides et des protéines par couplage CE/ESI-MS, utilisant différentes technologies, suivant la nature et la complexité des échantillons, mais également suivant les résultats escomptés.

Un certain nombre de travaux, traitant de l'analyse des acides aminés par électrophorèse capillaire peut être trouvé dans la littérature [161]. Ces espèces présentent une faible absorbance en UV, et des procédures de dérivation sont ainsi nécessaires afin de faciliter leur détection lors d'analyses par électrophorèse capillaire. Pour cette raison, une attention particulière a été prêtée à l'élaboration de méthodes alternatives de détection pour ces analytes telles que la détection par conductimétrie [162] ou la détection par spectrométrie de masse [163, 164]. En raison des avantages que confère la détection MS (l'information structurale, la sélectivité et la sensibilité) ce mode de détection a été employé pour l'identification de ces composés.

Analytes et mécanismes	CE mode	Type d'analyseur MS	Type d'interface ESI*	Réf.
Métalloprotéines	CZE	Triple quadripôle	Jonction liquide	[165]
Peptides β -amyloïdes	CZE	Simple quadripôle	Jonction liquide	[166]
Mélange de peptides	CZE	TOF	Jonction liquide	[167]
Apolipoprotéines	NACE	TOF	Jonction liquide	[102]
Aspartyltripeptide	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[168]
Mélange de peptides par digestion tryptique	CZE	Trappe d'ions	Sheathless	[169]
Acides aminés et vitamine B6	CZE	Simple quadripôle	Jonction liquide	[170]
Peptides bioactifs par digestion tryptique	CZE	Trappe d'ions	Sheathless	[171]
Peptides et protéines de l'urine	CZE	TOF	Jonction liquide	[172]
Acides aminés de l'urine	CZE	Triple quadripôle	Jonction liquide	[173]
Protéines digérées	CZE	Simple quadripôle	Jonction liquide	[174]
Polypeptides de fluides corporels	CZE	TOF	Jonction liquide	[175]
Mélange de peptides et de protéines	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[176]
Constantes d'affinité protéine/métal (MBPs)	tCITP	Trappe d'ions	Jonction liquide	[177]
Mélange de protéines	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[178]
Mélange de protéines	CIEF	Trappe d'ions	Jonction liquide	[179]
Marqueurs peptidique pour l'identification	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[180]

bactérienne				
Acides aminés d'origine végétale	CZE	Simple quadripôle	Jonction liquide	[181]
Glycopeptides	CZE	Quadripôle/ Trappe d'ions	Jonction liquide	[182]
Métallothionéine (foie de lapin)	CZE	TOF	Jonction liquide	[183]
Protéines ribosomales d' <i>E. coli</i>	CZE	TOF	Jonction liquide	[184]
Gélatine, caséine, jaune d'oeuf	CZE	Simple quadripôle	Jonction liquide	[185]
Protéines de bactérie pathogène	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[186]
Séquence d'acides aminés de l'alaméthicine F30	NACE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[187]
Sidérophores	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[188]
rhEPO	CZE	TOF	Jonction liquide	[189]
Conjugués d'oestriol dans le fluide amniotique	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[190]
Protéome de salive humaine	CIEF	Trappe d'ions	Jonction liquide	[191]
Peptides synthétisés	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[192]
Peptides opioïdes, neuropeptides	CZE	TOF	Jonction liquide	[193]
N-glycanes relargués de façon enzymatique de rHUEPO	CZE	TOF	Jonction liquide	[194]
Eydomorphone, opioïde semi-synthétique	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[195]
Protéines extraites de micro-algues	CZE	TOF	Jonction liquide	[196]
γ -Glutamyl-S-éthényl-cystéine (GEC)	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[197]
Peptides d'urine humaine	CZE	QTOF	Jonction liquide	[198]
Protéines de cellules cancéreuses humaines	prepIEF	TOF	Jonction liquide	[199]
« cross linker » avec fonctions acryliques	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[200]
Empreinte protéique	CIEF	QTOF	Jonction liquide	[201]
Protéines standards	pCEC	Trappe d'ions	Jonction liquide	[202]

* le terme « jonction liquide » correspond essentiellement à l'interface à liquide additionnel coaxial

le terme « sheathless » correspond à interface sans apport extérieur de liquide

Tableau 1 : Liste non exhaustive d'applications du couplage CE/ESI-MS pour l'analyse d'acides aminés, de peptides et de protéines

- **Analyse de saccharides**

Les difficultés majeures rencontrées lors de l'analyse des saccharides sont liées à la sensibilité de la détection, et peuvent être vues comme un problème important dans l'analyse de ces composés [203]. En raison de l'absence d'un groupement chromophore dans la structure des saccharides, le mode de détection UV-direct est difficilement envisageable pour la détection de ces espèces, à moins qu'une étape préliminaire de dérivation soit incluse dans le processus analytique. De multiples applications, utilisant le couplage CE/ESI-MS, dans le domaine de l'analyse de saccharides peuvent être trouvées dans la littérature [25]. En voici quelques exemples récents dans le tableau qui suit.

Analytes et mécanismes	CE mode	Type d'analyseur MS	Type d'interface ESI*	Réf.
Oligosaccharides de l'héparine	CZE	Simple quadripôle/trappe d'ions	Jonction liquide	[59, 204]
Glycanes dérivatisés et non dérivatisés	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[205]
Oligosaccharides d'acide hyaluronique	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[206]
Oligosaccharides glycosamineglycane	CZE	TOF	Sheathless	[207]
Lipopolysaccharides	CZE	Triple quadripôle	Jonction liquide	[208]
Régioisomères de glucooligosaccharides	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[209]
Glycoconjugates	CZE	TOF	Sheathless	[210]
Polysaccharides	CZE	Triple quadripôle	Jonction liquide	[211]
Polysaccharide (O-Chain)	CZE	Triple quadripôle	Jonction liquide	[212]
Lipopolysaccharides de souches pathogènes	CZE	QTOF	Jonction liquide	[213]
Lipopolysaccharides glycoformes (bacteries)	CZE	Triple quadripôle	Jonction liquide	[214]
Isomères du fucoidane de fucose mono sulfaté	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[215]
Complexes pentasaccharide d'héparine/antithrombine	FACE**	Trappe d'ions	Jonction liquide	[216]

* le terme « jonction liquide » correspond essentiellement à l'interface à liquide additionnel coaxial

le terme « sheathless » correspond à interface sans apport extérieur de liquide

** détermination des paramètres d'interactions et identification du ligand ayant effectivement réagi

Tableau 2 : Liste non exhaustive d'applications du couplage CE/ESI-MS pour l'analyse de saccharides

- **Bioanalyse de composés d'intérêt présents dans les matrices alimentaires**

Le couplage CE/ESI-MS joue également un rôle de plus en plus important dans l'analyse de produits naturels et alimentaires. Un champ d'application important dans l'analyse de produits alimentaires est le contrôle des échantillons alimentaires, mais également la détection des résidus de « drogues » provenant des produits alimentaires utilisés pour l'élevage du bétail. Le tableau suivant recense certaines applications utilisant le couplage CE/ESI-MS pour l'analyse de ce type d'analytes.

Analytes et mécanismes	CE mode	Type d'analyseur MS	Type d'interface ESI*	Réf.
Thiabendazole dans les fruits et les végétaux	CZE dans 5% MeOH	Simple quadripôle	Jonction liquide	[217]
Glycoalkaloides dans des extraits de pomme de terre	NACE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[218, 219]
Amines biogéniques dans le vin	CZE	Simple quadripôle	Jonction liquide	[220]
Acides alfa et bêta oxidés du houblon	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[221]
Cytokinines de noix de coco	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[222]
Acide hyaluronique	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[223]
Gangliosides/phénols	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[224]
Lactones <i>de N</i> -Acylohomosérine	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[225]
N-hydroxide-L-arginine	CZE	Tandem quadripôle	Jonction liquide	[226]
Atropine, choline	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[227]
Nucléotides cytokinine de noix de coco de mer	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[228]
Antocyanines du vin	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[229]
Acides aminés dans les aliments	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[230]
Extraits méthanoliques de houblon	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[231]
Extraits phénoliques d'huile d'olive	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[232]
Résidus de quinolone de poulet et de poisson	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[233]
Antioxydants de Rosemary	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[234]

*le terme « jonction liquide » correspond essentiellement à l'interface à liquide additionnel coaxial

Tableau 3 : Liste non exhaustive d'applications du couplage CE/ESI-MS pour la bioanalyse de composés d'intérêt présents dans les matrices alimentaires

- **Analyses de produits pharmaceutiques et de métabolites**

En faisant la revue des applications utilisant le couplage CE/ESI-MS, on constate que cette méthodologie est devenue une méthode analytique de choix dans le domaine pharmaceutique.

Son utilisation s'est largement répandue pour l'analyse et la détection de molécules d'intérêt pharmaceutique et de leurs sous-produits dans les préparations pharmaceutiques, ainsi que des principes actifs et de leurs métabolites dans les fluides biologiques [235]. Pour répondre aux exigences requises en ce qui concerne les facteurs de sensibilité, de sélectivité, et de certitude maximale, le couplage CE/ESI-MS a connu une grande avancée et un large développement dans ce champ d'application [236, 237]. Quelques exemples de l'application du couplage CE/ESI-MS pour les analyses de produits pharmaceutiques, sont proposés dans le tableau qui suit.

Analytes et mécanismes	CE mode	Type d'analyseur MS	Type d'interface ESI*	Réf.
Oxydone et métabolites dans l'urine	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[238]
Flurosémide dans l'urine	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[239]
Sildénafil dans le sérum	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[240]
Fluoxétine et composés dérivés	NACE	Simple quadripôle	Jonction liquide	[61]
Mélange de médicaments basiques	NACE	Simple quadripôle	Jonction liquide	[241]
Médicaments énantiomères	CZE dans 25% MeOH	Triple quadripôle	Jonction liquide	[242]
Préparations médicinales chinoises	CZE dans 60% MeOH	Triple quadripôle	Jonction liquide	[243]
Criblage de médicaments selon leur pKa	CZE	Trappe d'ions, TOF	Jonction liquide	[244]
Ibuprofène, codéine et leurs produits de dégradation	Remplissage partiel MEKC	Simple quadripôle	Jonction liquide	[107]
Bupivacaine d'urine de rat	CZE dans 20% MeOH	TOF	Jonction liquide	[245]
Lidocaïne et métabolites dans le plasma	NACE	Simple quadripôle	Jonction liquide	[246]
Métabolites de l'oxycodone dans l'urine	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[247]
Médicaments basiques dans l'urine	CZE	Trappe d'ions, TOF	Jonction liquide	[157]
Glucosinolates	CZE	Trappe d'ions, TOF	Jonction liquide	[248]
Marqueurs de maladies rénales	CZE	TOF	Jonction liquide	[249]

Lectines	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[250]
Adénosine de venin de serpent	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[251]
Virus humain immunodéficient	CZE	Quadripôle	Jonction liquide	[252]
Protéines d'urine de patients diabétiques	CZE	TOF	Jonction liquide	[253]
Glycoformes de l'érythropoïétine humaine	CZE	TOF	Jonction liquide	[254]
Caféine et ses métabolites	CZE	Simple quadripôle	Jonction liquide	[255]
Alaméthicine F30	NACE	Trappe d'ions, TOF	Jonction liquide	[256]
Biomarqueurs de sérum humain	CZE	TOF	Sheathless	[257]
Enzymes recombinantes humaines	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[258]
Biomarqueurs de cancer de la prostate	CZE	TOF	Jonction liquide	[259]
Analyse protéomique de l'urine	CZE	TOF	Jonction liquide	[260]
Biomarqueurs (urine humaine, fluides cérébrospinaux)	CZE	TOF	Jonction liquide	[261]
Alkaloïdes d'isoquinoline	NACE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[262]
Galantamine	MEKC	Trappe d'ions	Jonction liquide	[263]
Halides d'alkyltriméthylammonium	CEC	Trappe d'ions	Jonction liquide	[264]
β-agonistes du salbutamol	NACE	TOF	Jonction liquide	[265]
Antidépresseurs	CZE	QTOF	Jonction liquide	[266]
Agent de contraste de diméglumine de gadobénate	CZE	ESI	Jonction liquide	[267]
Candidats de médicament	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[268]
Métabolites	CZE	Simple quadripôle	Jonction liquide	[269]
Métabolites secondaires de la plante <i>Genista tenera</i>	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[270]
Métabolites de prokaryotes	CZE	Quadripôle/ Trappe d'ions	Sheathless	[271]
Urine humaine	CZE	Triple quadripôle	Jonction liquide	[272]
β-Bloquants	MEKC/CZE	Simple quadripôle	Jonction liquide	[273]
Galantamine	CZE	QTOF	Jonction liquide	[274]
Trans-Ketokonazole	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[275]
Acide arylpropionique, acide abscisique, acides aminés	CZE	Simple quadripôle	Jonction liquide	[276]
Amphétamine dérivée	CZE	Simple quadripôle	Jonction liquide	[277]
Enantiomères de salbutamol	NACE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[278]
β-Bloquants	CEC	Simple quadripôle	Jonction liquide	[279]

Extasy et méthadone dans le plasma	Chiral CE	Simple quadripôle	Jonction liquide	[280]
------------------------------------	-----------	-------------------	------------------	-------

* le terme « jonction liquide » correspond essentiellement à l'interface à liquide additionnel coaxial

le terme « sheathless » correspond à interface sans apport extérieur de liquide

Tableau 4 : Liste non exhaustive d'applications du couplage CE/ESI-MS pour la l'analyse de produits pharmaceutiques et de métabolites

- **Analyses biomédicales**

On retrouve l'utilisation du couplage CE/ESI-MS en chimie analytique bio-médicale moderne. Le champ d'application de ces études s'est porté sur la recherche médicale et plus particulièrement sur l'analyse de nucléosides d'origine virale de lignées de cellules humaines. En voici quelques exemples dans le tableau suivant.

Analytes et mécanismes	CE mode	Type d'analyseur MS	Type d'interface ESI*	Réf.
Nucléosides du virus du SIDA	CZE	Simple quadripôle	Jonction liquide	[281]
Adduits platine de nucléotides d'ADN	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[282]
Adduits benzo[a]pyrène époxyde d'ADN	CZE	Triple quadripôle TOF	Jonction liquide	[283, 284]
Sérotonine en milieu plasma	CZE	TOF	Jonction liquide	[285]
Acide γ -hydroxybutyrique(GHB) dans l'urine	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[286]
Amines aromatiques hétérocycliques dans l'urine	CZE dans 60% MeOH	Trappe d'ions	Jonction liquide	[287]
Etudes <i>In vitro</i> de glycolysation	CZE	Simple Quadripôle	Jonction liquide	[288]
Nicotine et métabolites dans l'urine	CZE dans 10% ACN	Triple quadripôle	Jonction liquide	[289]
Dopamine et méthoxycatécholamines de l'urine	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[290]
Catécholamines et métanéphrines dans l'urine	CZE	TOF	Jonction liquide	[291]
Catécholamines	NACE	Triple quadripôle	Sheathless	[292]
Adduits oxyplatine 5'-GMP	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[293]
Adduits platine 5'-GMP	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[294]

* le terme « jonction liquide » correspond essentiellement à l'interface à liquide additionnel coaxial

le terme « sheathless » correspond à interface sans apport extérieur de liquide

Tableau 5 : Liste non exhaustive d'applications du couplage CE/ESI-MS pour des analyses biomédicales

- **Analyses environnementales de composés néfastes (pesticides)**

Une condition principale, lors d'analyses environnementales, est la capacité de détecter des traces de composés néfastes, tels que les pesticides, dans des matrices complexes, tels que les extraits de sol, extraits aqueux, fluides biologiques et végétaux. Pour cette raison, la combinaison de l'électrophorèse capillaire et de la détection par spectrométrie de masse pour l'information structurale additionnelle est un bon choix pour ce type d'analyses. Le tableau suivant propose quelques exemples.

Analytes et mécanismes	CE mode	Type d'analyseur MS	Type d'interface ESI*	Réf.
Pesticides dans des extraits de blé	CZE dans 50% MeOH	Trappe d'ions	Sheathless	[295]
Pesticides dans les fruits	CZE	Simple quadripôle	Jonction liquide	[296, 297]
Matériaux énergétiques à base de nitramine (TNT)	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[298]
Herbicides : sulfoanilide de triazolopyrimidine	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[299]
Ammonium de méthyl triéthanol	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[300]
Glyphosate	CZE	Simple quadripôle	Jonction liquide	[301]
Produits de biodégradation de teinture sulfonatée	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[302]
Amines hétérocycliques	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[303]
Herbicides (triazine)	CEC	Trappe d'ions	Jonction liquide	[304]
Amines	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[305]
Agents libérateurs d' amino alcools, et de formaldéhyde	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[306]
Antidépresseurs dans des eaux usées superficielles	CZE	TOF	Jonction liquide	[307]
Arsenic	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[308]
Antibiotiques à base de quinolone dans le lait brut bovin	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[309]
N-titrosamines spécifiques du tabac	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[310]
Biocide à base de chlorure de benzalkonium	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[311]
Sulfonamides	CZE	Simple quadripôle	Jonction liquide	[312]

* le terme « jonction liquide » correspond essentiellement à l'interface à liquide additionnel coaxial

le terme « sheathless » correspond à interface sans apport extérieur de liquide

Tableau 6 : Liste non exhaustive d'applications du couplage CE/ESI-MS pour des analyses environnementales de composés néfastes (pesticides)

- **Autres types d'application.**

Bien que le couplage CE/ESI-MS puisse également fournir des avantages dans l'analyse des polymères ou des oligomères synthétiques, peu d'études ont été réalisées traitant de l'analyse de ces composés, utilisant cette technique de couplage. En voici quelques exemples, entre autres applications, dans le tableau qui suit.

Analytes et mécanismes	CE mode	Type d'analyseur MS	Type d'interface ESI*	Réf.
Polymères synthétiques	NACE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[313]
Oligomères diastéréomérique d'ammonium quaternaire	MEKC	Simple quadripôle	Jonction liquide	[314]
Produit d'hydrolyse du 3-Methacryloxypropyltriméthoxysilane	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[315]
Fluorosurfactants polydisperses	NACE	MALDI-TOF	MALDI	[316]
Nucléotides intracellulaires	CZE	Trappe d'ions	Jonction liquide	[317]
Résines de mélanine	CZE	Simple quad./TOF	Jonction liquide	[318]
Oligonucléotides	CZE	QTOF	Jonction liquide	[319]
Produits de dégradation d'agents chimiques de guerre	CZE **	Trappe d'ions	Jonction liquide	[320, 321]

* le terme « jonction liquide » correspond essentiellement à l'interface à liquide additionnel coaxial

** Préconcentration par ITP transitoire en ligne

Tableau 7 : Liste non exhaustive d'autres types d'applications du couplage CE/ESI-MS

Les tableaux précédents, relatant une liste non exhaustive d'un grand nombre d'applications décrites dans différentes revues de la littérature, nous montrent l'intérêt accru du couplage CE/ESI-MS pour l'analyse d'un grand nombre de composés et ce dans divers domaines d'application.

I.7- Références bibliographiques

- ¹ Cai, J. and Henion, J., *J. Chromatogr. A* **1995**, 703, 667-692
- ² von Brocke, A., Nicholson, G., Bayer, E., *Electrophoresis* **2001**, 22, 1251–1266
- ³ Hernández-Borges, J., Neusüß, C., Cifuentes, A. Pelzing, M., *Electrophoresis* **2004**, 25, 2257–2281
- ⁴ Stutz, H., *Electrophoresis* **2005**, 26, 1254–1290.
- ⁵ Bayle, C., Siri, N., Poinso, V., Treilhou, M., Causse, E., Couderc, F., *J. Chromatogr. A*, **2003**, 1013, 123-130.
- ⁶ Yang, C., Shimelis, O., Zhou, X., Li, G., Bayle, C., Nertz, M., Lee, H., Streckowski, L., Patonay, G., Couderc, F., Giese R. W., *J. Chromatogr. A*, **2002**, 979, 307-314.
- ⁷ Wu, S. and Dovichi, N. J., *J. Chromatogr.* **1989**, 480, 141-155
- ⁸ Smith, R. D., Barinaga, C. J. and Udseth, H. R. *Anal. Chem.* **1998**, 60, 1948.
- ⁹ Takada, Y., Sakairi, M. and Koizumi, H. *Anal. Chem.* **1995**, 67, 1474.
- ¹⁰ Nilsson, S. L., Andersson, C., Sjöberg, P. J. R., Bylund, D., Petersson, P., Jornten-Karlsson, M., Markides, K. E., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**, 17, 2267-2272 .
- ¹¹ Huck, C. W., Bakry, R., Huber, L. A., Bonn, G. K., *Electrophoresis* 2006, 27, 2063–2074.
- ¹² Chang, S.Y. and Yeung, E.S., *Anal. Chem.* **1997**, 69, 2251-2257
- ¹³ Alvarez-Llamas, G., Fernandez de la Campa, M. R., Sanz-Medel, A., *Trends Anal. Chem.* 2005, 24, 28–36.
- ¹⁴ Moseley, M. A., Deterding, L. J., de Wit, J. S. M., Tomer, K. B. *et al.*, *Anal. Chem.* 1989, 61, 1577–1584.
- ¹⁵ Kohlraush, F., *Ann. Phy. Chem.* **1897**, 62, 209
- ¹⁶ Gareil, P., *Analisis* **1990**, 18, 221-241
- ¹⁷ Jorgenson, J. W, *Anal. Chem.* **1986**, 58, 743 A
- ¹⁸ Hjerten, S., *J. Chromatogr.* **1983**, 270, 1
- ¹⁹ Jorgenson, J. W, Lukacs, K. D., *Science* **1983**, 222, 266-272
- ²⁰ Maier, V., Petr, J., Knob, R., Horakova, J., Sevcik, J., *Electrophoresis*, **2007**, 28, 1815-1822
- ²¹ Tuma, P., Samcova, E., Duska, F., *J. Sep. Sci.*, **2008**, 31, 2260-2264
- ²² Schmitt-Kopplin, P., Frommberger, M., *Electrophoresis* **2003**, 24, 3837–3867
- ²³ Schmitt-Kopplin, P., Englmann, M., *Electrophoresis* **2005**, 26, 1209–1220
- ²⁴ Simpson, D. C., Smith, R. D., *Electrophoresis* **2005**, 26, 1291–1305.
- ²⁵ Klampfl, C. W., *Electrophoresis* **2006**, 27, 3–34

- ²⁶ García-Cañas, V., Cifuentes, A., *Electrophoresis* **2008**, *29*, 294–309
- ²⁷ Schmitt-Kopplin, P., Englmann, M., *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1209-1220
- ²⁸ Foret, F., Thompson, T.J., Vouros, P., Karger, B.L, Gebauer, P., and Bocek, P., *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 4450- 4458.
- ²⁹ Ingendoh, A., Kiehne, A., and Greiner, M., *Chromatographia* **1999**, *49*, 1-5.
- ³⁰ Muddiman, D.C., Rockwood, A.L., Gao, Q., Severs J.C., Udseth, H.R., Smith, R.D., and Proctor, A., *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 4371-4375
- ³¹ Lazar, I.M., Lee, E.D., Rockwood, A.L., and Lee, M.L., *J. Chromatogr. A* **1998**, *829*, 279-288.
- ³² Hofstadler, S.A., Wahl, J.H., Bruce, J.E., and Smith, R.D., *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 6983-6984.
- ³³ Tomer, K. B., *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 297–328.
- ³⁴ Wetterhall, M., Palmblad, M., Hkansson, P., Markides, K. E., Bergquist, J., *J. Proteome Res.* **2002**, *1*, 361–366.
- ³⁵ Mioni, M., *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, *373*, 466–480
- ³⁶ IUT de lannion www.iut-lannion.fr/.../SPECMAS/specmas3.htm ; le 05/09/2008
- ³⁷ Olivares, J.A., Nguyen, N.T., Yonker, C.R., and Smith, R.D., *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 1230-1232.
- ³⁸ Moseley, M.A., Deterding, L.J., Tomer, K.B., and Jorgenson, J.W., *J. Chromatogr.* **1990**, *516*, 167- 173.
- ³⁹ Suter, M.J.F. and Caprioli, R.M., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1992**, *3*, 198-206.
- ⁴⁰ Isoo, K., Otsuka, K., and Terabe, S., *Electrophoresis* **2001**, *22*, 3426-3432.
- ⁴¹ Tanaka, Y., Otsuka, K., and Terabe, S., *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, *30*, 1889-1895.
- ⁴² Withehouse, C M., Dreyer, R.N., Yamashita, M., Fenn, J.B., *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 675-679.
- ⁴³ Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. W, Wong, S. F., *Mass Spectrom. Rev.* **1990**, *9*, 37-70
- ⁴⁴ Wilm, M.S., and Mann, M., *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1994**, *136*, 167-180.
- ⁴⁵ Smith, R. D., Loo, J. A., Ogorzalek Loo, R. R., Busman, M., Udseth, H. R., *Mass Spectrom. Rev.* **1991**, *10*, 359-451.
- ⁴⁶ Smith, R. D., Olivares, J. A., Nguyen, N. T., Udseth, H. R., *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 436–441.
- ⁴⁷ Smith, R.D. and Udseth, H.R., *Nature* **1988**, *331*, 639-640.
- ⁴⁸ Smith, R.D., Barinaga, C.J., and Udseth, H.R., *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 1948-1952.
- ⁴⁹ Moini, M., *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 3497-3501.

- ⁵⁰ Pleasance, S., Thibault, P., and Kelly, J., *J. Chromatogr.* **1992**, 591, 325-339.
- ⁵¹ Smith, R.D., Udseth, H.R., Barinaga, C.J., and Edmonds, C.G., *J. Chromatogr.* **1991**, 559, 197-208.
- ⁵² Smith, R.D., Wahl, J.H., Goodlett, D.R., and Hofstadler, S.A., *Anal. Chem.* **1993**, 65, 574-584.
- ⁵³ Tetler, L.W., Cooper, P.A., and Powell, B., *J. Chromatogr. A* **1995**, 700, 21-26.
- ⁵⁴ Palmer, M.E., Tetler, L.W., and Wilson, I.D., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**, 14, 808-817.
- ⁵⁵ Neususs, C., Pelzing, M., and Macht, M., *Electrophoresis* **2002**, 23, 3149-3159.
- ⁵⁶ Banks, J.F., Jr., *J. Chromatogr. A* **1995**, 712, 245-252.
- ⁵⁷ Siethoff, C., Nigge, W., and Linscheid, M., *Anal. Chem.* **1998**, 70, 1357-1361.
- ⁵⁸ Martin-Girardeau, A. and Renou-Gonnord, M.F., *J. Chromatogr. B* **2000**, 742, 163-171
- ⁵⁹ Duteil, S., Gareil, P., Girault, S., Mallet, A., Feve, C., Siret, L., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1999**, 13, 1889-1898
- ⁶⁰ Zheng, J., Jann, M. W., Hon, Y. Y., Shamsi, S. A., *Electrophoresis* **2004**, 25, 2033-2043.
- ⁶¹ Cherkaoui, S., Veuthey, J.L., *Electrophoresis* **2002**, 23, 442-448
- ⁶² Wang, G. and Cole, R.B., Cole, R.B (Ed.), John Wiley and Sons, Inc., New York, U.S.A., **1997**, p. 138-172.
- ⁶³ Kebarle, P. and Ho, Y., Cole, R.B (Ed.), John Wiley and Sons, Inc., New York, U.S.A., **1997**, p. 13-19
- ⁶⁴ Cole, R.B., *J. Mass Spectrom.* **2000**, 35, 763- 772.
- ⁶⁵ Kebarle, P., *J. Mass Spectrom.* **2000**, 35, 804-817
- ⁶⁶ Wilm, M. and Mann, M., *Anal. Chem.* **1996**, 68, 1-8.
- ⁶⁷ Wheat, T.E., Lilley, K.A., and Banks, J.F., *J. Chromatogr. A* **1997**, 781, 99-105.
- ⁶⁸ Hau, J. and Roberts, M., *Anal. Chem.* **1999**, 71, 3977-3984.
- ⁶⁹ Huber, C.G., Premstaller, A., and Kleindienst, G., *J. Chromatogr. A* **1999**, 849, 175-189.
- ⁷⁰ Schramel, O., Michalke, B., and Kettrup, A., Fresenius J., *Anal. Chem.* **1999**, 363, 452-455.
- ⁷¹ Larsson, M., Sundberg, R., and Folestad, S., *J. Chromatogr. A* **2001**, 934, 75-85
- ⁷² Núñez, O., Moyano, E., and Galceran, M.T., *J. Chromatogr. A*, **2002**, 974, 243-255.
- ⁷³ Kirby, D.B., Thorne, J.M., Götzinger, W.K., and Karger, B.L. A., *Anal. Chem.* **1996**, 68, 4451-4457.
- ⁷⁴ Lu, W., Poon, G.K., Carmichael, P.L., and Cole, R.B., *Anal. Chem.* **1996**, 68, 668-674.
- ⁷⁵ Lazar, I.M., Ramsey, R.S., Sundberg, S., and Ramsey, J.M., *Anal. Chem.* **1999**, 71, 3627-3631.

- ⁷⁶ Jáuregui, O., Moyano, E., and Galceran, M.T., *J. Chromatogr. A* **2000**, 896, 125-133.
- ⁷⁷ Huikko, K., Kotiaho, T., Kostianen, R., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2002**, 16, 1562–1568.
- ⁷⁸ Henion, J.D., Mordehai, A.V., and Cai, J. *Anal. Chem.* **1994**, 66, 2103-2109.
- ⁷⁹ Varesio, E., Cherkaoui, S., Veuthey, J. L., *J. High Resolut. Chromatogr.* **1998**, 21, 653–657.
- ⁸⁰ Nielen, M., *J. Chromatogr. A* **1995**, 712, 269–284.
- ⁸¹ Shamsi, S. A., *Anal. Chem.* **2001**, 73, 5103-5108
- ⁸² Lee, E.D., Mück, W., Henion, J.D., and Covey, T.R., *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **1989**, 18, 844-850.
- ⁸³ Severs, J.C. and Smith, R.D., Cole, R.B. (Ed.), John Wiley and Sons, Inc., New York, U.S.A., **1997**, p. 354.
- ⁸⁴ Sheppard, R.L. and Henion, J., *Anal. Chem.* **1997**, 69, 2901-2907.
- ⁸⁵ Wachs, T., Sheppard, R.L., and Henion, J., *J. Chromatogr. B* **1996**, 685, 335-342.
- ⁸⁶ Waterwal, J.C.M., Bestebreurtje, P., Lingeman, H., Versluis, C., Heck, A.J.R., Bult, A., and Underberg, W.J.M., *Electrophoresis* **2001**, 22, 2701-2708.
- ⁸⁷ Wahl, J.H., Gale, D.C., and Smith, R.D., *J. Chromatogr. A* **1994**, 659, 217-222.
- ⁸⁸ Kriger, M.S., Cook, K.D., and Ramsey, R.S, *Anal. Chem.* **1995**, 67, 385-389.
- ⁸⁹ Chang, Y.Z. and Her G. R., *Anal. Chem.* **2000**, 23, 626
- ⁹⁰ Bateman, K.P., White, R.L., and Thibault, P., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1997**, 11, 307-315.
- ⁹¹ Alexander, J.N., Schultz, G.A., and Poli J.B., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1998**, 12, 1187-1191.
- ⁹² Cao, P. and Moini, M., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1997**, 8, 561-564
- ⁹³ Michalke, B., *Electrophoresis* **2005**, 26, 1584–1597.
- ⁹⁴ Kannamkumarath, S. S., Wrobel, K., Wrobel, K., B’Hymer,C., Caruso, J. A., *J. Chromatogr. A* **2002**, 975, 245–266.
- ⁹⁵ Mol, R., de Jong, G. J., Somsen, G. W., *Electrophoresis* **2005**, 26, 146–154.
- ⁹⁶ Raffaelli, A., Saba, A., *Mass Spectrom. Rev.* **2003**, 22, 318–331.
- ⁹⁷ Schappler, J., Guillarme, D.; Prat, J., Veuthey, J.L., Rudaz ,S., *Electrophoresis* 2007, 28, 3078-3087.
- ⁹⁸ Riekkola, M.-L., *Electrophoresis* **2002**, 23, 3865–3883.
- ⁹⁹ Yang, Q., Benson, L. M., Johnson, K. L., Naylor, S., *J. Biochem. Biophys. Methods* **1999**, 38, 103–121.

- ¹⁰⁰ Czerwenka, C., Lämmerhofer, M., Lindner, W., *Electrophoresis* **2002**, *23*, 1887–1899.
- ¹⁰¹ Lazar, I. M., Xin, B., Lee, M. L., Lee, E. D., Rockwood, A. L., Fabbi, J. C., Lee, H. G., *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 3205–3211.
- ¹⁰² Deterding, L. J., Cutalo, J. M., Khaledi, M., Tomer, K. B., *Electrophoresis* **2002**, *23*, 2296–2305.
- ¹⁰³ Guo, X., Chan, H. M., Guevremont, R., Siu, K.W. M., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1999**, *13*, 500–507.
- ¹⁰⁴ Shamsi, S. A., *Electrophoresis* **2002**, *23*, 4036–4051.
- ¹⁰⁵ Shamsi, S. A., Miller, B. E., *Electrophoresis* **2004**, *25*, 3927–3961.
- ¹⁰⁶ Petersson, P., Jörntén-Karlsson, M., Stalebro, M., *Electrophoresis* **2003**, *24*, 999–1007.
- ¹⁰⁷ Stubberud, K., Callmer, K., Westerlund, D., *Electrophoresis* **2003**, *24*, 1008–1016
- ¹⁰⁸ Stubberud, K., Callmer, K., Westerlund, D., *Electrophoresis* **2002**, *23*, 572–577.
- ¹⁰⁹ Peterson, Z. D., Bowerbank, C. R., Collins, D. C., Graves, S. W., Lee, M. L., *J. Chromatogr. A* **2003**, *992*, 169–179.
- ¹¹⁰ Barceló-Barrachina, E., Moyano, E., Galceran, M. T., *Electrophoresis* **2004**, *25*, 1927–1948.
- ¹¹¹ Huang, P., Wu, J.-T., Lubman, D. M., *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 3003–3008.
- ¹¹² Gucek, M., Gaspari, M., Walhagen, K., Vreeken, R. J., Verheij, E. R., van der Greef, J., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**, *14*, 1448–1454.
- ¹¹³ Choudhary, G., Apffel, A., Yin, H., Hancock, W., *J. Chromatogr. A* **2000**, *887*, 85–101.
- ¹¹⁴ Gaspari, M., Gucek, M., Walhagen, K., Vreeken, R. J., Verheij, E. R., Tjaden, U. R., van der Greef, J., *J. Microcol. Sep.* **2001**, *13*, 243–249.
- ¹¹⁵ Wu, J.-T., Huang, P., Li, M. X., Qian, M. G., Lubman, D. M., *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 320–326.
- ¹¹⁶ Ivanov, A. R., Horváth, C., Karger, B. L., *Electrophoresis* **2003**, *24*, 3663–3673.
- ¹¹⁷ Tang, Q., Harrata, K. A., Lee, C. S., *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 3177–3182.
- ¹¹⁸ Yang, L., Lee, C. S., Hofstadler, S. A., Pasa-Tolic, L., Smith, R. D., *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 3235–3241
- ¹¹⁹ Lamoree, M. H., Tjaden, U. R., Van der Greef, J., *J. Chromatogr. A* **1997**, *777*, 31–39.
- ¹²⁰ Zhou, F., and Johnston, M. V. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 2734–2740.
- ¹²¹ Jensen, P. K., Pasa-Toli, L., Anderson, G. A., Horner, J. A., Lipton, M. S., Bruce, J. E., Smith, R. D., *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 2076–2084.
- ¹²² Jensen, P. K., Pasa-Tolic, L., Peden, K. K., Martinovic, S., Lipton, M. S., Anderson, G. A., Tolic, N., Wong, K.-K., Smith, R. D., *Electrophoresis* **2000**, *21*, 1372–1380.

- ¹²³ Hjertén, S., *J. Chromatogr.* **1985**, *347*, 191–198.
- ¹²⁴ Cifuentes, A., Santos, J. M., de Frutos, M., Díez-Masa, J. C., *J. Chromatogr. A* **1993**, *652*, 161–170.
- ¹²⁵ Towns, J. K., Regnier, F. E., *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 1126–1132.
- ¹²⁶ Gaspar, A., Englmann, M., Fekete, A., Harir, M., Schmitt-Kopplin, P., *Electrophoresis* **2008**, *29*, 66–79.
- ¹²⁷ Varghese, J., Cole, R.B., *J. Chromatogr. A* **1993**, *652*, 369–376
- ¹²⁸ Lu, W., Yang, G., Cole, R.B., *Electrophoresis* **1995**, *16*, 487–492
- ¹²⁹ Moseley, M. A., Deterding, L. J., Tomer, K. B., Jorgenson, J. W., *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 109–114.
- ¹³⁰ Katayama, H., Ishihama, Y., Asakawa, N., *Anal. Sci.* **1998**, *14*, 407–408.
- ¹³¹ Moini, M., Demars, S. M., Huang, H., *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 3772–3776.
- ¹³² Samskog, J., Wetterhall, M., Jacobsson, S., Markides, K., *J. Mass Spectrom.* **2000**, *35*, 919–924.
- ¹³³ Li J., Thibault, P., Bings, N. H., Skinner, C. D., Wang, C., Colyer, C., Harrison, J., *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 3036–3045.
- ¹³⁴ Wang, Z., Prange, A., *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 626–631.
- ¹³⁵ Aguilar, C., Hofte, A. J. P., Tjaden, U. R., Van der Greef, J., *J. Chromatogr. A* **2001**, *926*, 57–67.
- ¹³⁶ Lynen, F., Zhao, Y., Becu, C., Borremans, F., Sandra, P., *Electrophoresis* **1999**, *20*, 2462–2474.
- ¹³⁷ Foret, F., Zhou, H., Gangl, E., Karger, B., *Electrophoresis* **2000**, *21*, 1363–1371.
- ¹³⁸ Thompson, T. J., Foret, F., Vouros, P., Karger, B. L., *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 900–906.
- ¹³⁹ Banks, J. F., Dresch, T., *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 1480–1485.
- ¹⁴⁰ Bendahl, L., Hansen, S. H., Gammelgaard, B., *Electrophoresis* **2001**, *22*, 2565–2573.
- ¹⁴¹ Tomlinson, A. J., Naylor, S., *J. Liq. Chromatogr.* **1995**, *18*, 3591–3615.
- ¹⁴² Tomlinson, A. J., Naylor, S. J., *J. Capil. Electrophor.* **1995**, *2*, 225–233.
- ¹⁴³ Li, M. X., Liu, L., Wu, J. T., Lubman, D. M., *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2451–2456.
- ¹⁴⁴ Dong, M., Oda, R. P., Strausbauch, M. A., Wettstein, P. J. *et al.*, *Electrophoresis* **1997**, *18*, 1767–1774.
- ¹⁴⁵ Katayama, H., Ishihama, Y., Asakawa, N., *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 5272–5277.
- ¹⁴⁶ Katayama, H., Ishihama, Y., Oda, Y., Asakawa, N., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**, *14*, 1167–1178.
- ¹⁴⁷ Lai, C., Her, G., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**, *14*, 2012–2018.

- ¹⁴⁸ Soga, T., Ueno, Y., Naraoka, H., Ohashi, Y., Tomita, M., and Nishioka, T., *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 2233-2239.
- ¹⁴⁹ Simó, C., Elvira, C., González, N., San Román, J., Barbas, C., Cifuentes, A., *Electrophoresis* **2004**, *25*, 2056-2064.
- ¹⁵⁰ Ullsten, S., Zuberovic, A., Wetterhall, M., Hardenborg, E., Markides, K.E., Bergquist, J., *Electrophoresis* **2004**, *25*, 2090–2099
- ¹⁵¹ Puerta, A., Axen, J., Soderberg, L., Bergquist, J., *J. Chromatogr. B* **2006**, *838*, 113–121
- ¹⁵² Catai, J. R., Torano, J. S., Jongen, P., de Jong, G. J., Somsen, G. W., *J. Chromatogr. B* **2007**, *852*, 160-166.
- ¹⁵³ Catai, J. R., Torano, J. S., de Jong, G. J., Somsen, G. W., *Electrophoresis* **2006**, *27*, 2091–2099.
- ¹⁵⁴ Liu, T., Li, J-D., Zeng, R., Shao, X-X., Wang, K-Y., and Xia, Q-C., *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5875-5885
- ¹⁵⁵ Zhang, J., Horváth, C., *Electrophoresis* **2003**, *24*, 115–120.
- ¹⁵⁶ Vanhoenacker, G., De l'Escaille, F., De Keukeleire, D., Sandra, P., *J. Pharma. and Biomed. Anal.* **2004**, *34*, 595–606
- ¹⁵⁷ Vanhoenacker, G., De l'Escaille, F., De Keukeleire, D., Sandra, P., *J. Chromatogr. B* **2004**, *799*, 323–330
- ¹⁵⁸ Nehmé, R., Perrin, C., Cottet, H., Blanchin, M.D., Fabre, H., *Electrophoresis* **2008**, *29*, 3013-3023
- ¹⁵⁹ Zamfir, A., Peter-Katalinic, J., *Electrophoresis* **2004**, *25*, 1949–1963.
- ¹⁶⁰ Wittke, S., Kaiser, T., Mischak, H., *J. Chromatogr. B* **2004**, *803*, 17–26.
- ¹⁶¹ Klampfl, C.W., in: Molnar-Perl, I. (Ed.), *Quantitation of Amino Acids and Amines by Chromatography*, J. Chromatogr. Lib., Elsevier, Amsterdam **2005**.
- ¹⁶² Petritis, K., Elfakir, C., Dreux, M., *J. Chromatogr. A* **2002**, *961*, 9–21.
- ¹⁶³ Soga, T., Heiger, D. N., *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1236–1241.
- ¹⁶⁴ Klampfl, C. W., Ahrer, W., *Electrophoresis* **2001**, *22*, 1579–1584.
- ¹⁶⁵ Pawlak, K. P., Palacios, O., Capdevila, M., Gonzalez-Duarte, P., Lobinski, R., *Talanta* **2002**, *57*, 1011–1017.
- ¹⁶⁶ Varesio, E., Rudaz, S., Krause, K. H., Veuthey, J.-L., *J. Chromatogr. A* **2002**, *974*, 135–142
- ¹⁶⁷ Simo, C., Soto-Yarritu, P. L., Cifuentes, A., *Electrophoresis* **2002**, *23*, 2288–2295.
- ¹⁶⁸ de Boni, S., Neusüß, C., Pelzing, M., Scriba, G. K. E., *Electrophoresis* **2003**, *24*, 874–882.
- ¹⁶⁹ Moini, M., Schultz, C. L., Mahmood, H., *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 6282–6287.

- ¹⁷⁰ Klampfl, C. W., Vo, T. D. T., *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* **2003**, *26*, 2783–2797.
- ¹⁷¹ Janini, G. M., Conrads, T. P., Wilkens, K. L., Issaq, H. J., Veenstra, T. D., *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 1615–1619.
- ¹⁷² Wittke, S., Fliser, D., Haubitz, M., Bartel, S., Krebs, R., Hausadel, F., Hillmann, M., *et al.*, *J. Chromatogr. A* **2003**, *1013*, 173–181.
- ¹⁷³ Soga, T., Kakazu, Y., Robert, M., Tomita, M., Nishioka, T., *Electrophoresis* **2004**, *25*, 1964–1972.
- ¹⁷⁴ Kato, M., Sakai-Kato, K., Jin, H., Kubota, K., Miyano, H., Toyoka, T., Dulay, M. T., Zare, R. N., *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 1896–1902.
- ¹⁷⁵ Kaiser, T., Wittke, S., Just, I., Krebs, R., Bartel, S., Fliser, D., Mischak, H., Weissinger, E. M., *Electrophoresis* **2004**, *25*, 2044–2055.
- ¹⁷⁶ Monton, M. R. N., Terabe, S., *J. Chromatogr. A* **2004**, *1032*, 203–211.
- ¹⁷⁷ Stutz, H., Bordin, G., Rodriguez, A. R., *Electrophoresis* **2004**, *25*, 1071–1089.
- ¹⁷⁸ Eriksson, J. H. C., Mol, R., Somsen, G.W., Hinrichs, W. L. J., Frijlink, H. W., de Jong, G. J., *Electrophoresis* **2004**, *25*, 43–49.
- ¹⁷⁹ Storms, H. F., van der Heijden, R., Tjaden, U. R., van der Greef, J., *Electrophoresis* **2004**, *25*, 3461–3467.
- ¹⁸⁰ Hu, A., Tsai, P. J., Ho, Y. P., *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 1488–1495.
- ¹⁸¹ Tessier, B., Schweizer, M., Fournier, F., Framboisier, X. *et al.*, *Food. Res. Int.* **2005**, *38*, 577–584.
- ¹⁸² Amon, S., Plematl, A., Rizzi, A., *Electrophoresis* **2006**, *27*, 1209–1219.
- ¹⁸³ Andon, B., Barbosa, J., Sanz-Nebot, V., *Electrophoresis* **2006**, *27*, 3661–3670.
- ¹⁸⁴ Garza, S., Moini, M., *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 7309–7316.
- ¹⁸⁵ Gluch, I., Urbanska, A., Zadrozna, I., Pawlak, K., Jarosz, M., *Chem. Anal. (Warsaw)* **2006**, *51*, 195–210.
- ¹⁸⁶ Hu, A. R., Chen, C. T., Tsai, P. J., Ho, Y. P., *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 5124–5133.
- ¹⁸⁷ Psurek, A., Neususs, C., Degenkolb, T., Bruckner, H. *et al.*, *J. Peptide Sci.* **2006**, *12*, 279–290.
- ¹⁸⁸ Simionato, A. V. C., Simo, C., Cifuentes, A., Lacava, P. T. *et al.*, *Electrophoresis* **2006**, *27*, 2567–2574.
- ¹⁸⁹ Balaquer, E., Neusüss, C., *Chromatographia* **2006**, *64*, 351–357.
- ¹⁹⁰ Cho, S. H., Jung, B. H., Lee, W. Y., Chung, B. C., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 2995–2998.

- ¹⁹¹ Guo, T., Rudnick, P. A., Wang, W. J., Lee, C. S. *et al.*, *J. Proteome Res.* **2006**, *5*, 1469–1478.
- ¹⁹² Gennaro, L. A., Salas-Solano, O., Ma, S., *Anal. Biochem.* **2006**, *355*, 249–258.
- ¹⁹³ Sanz-Nebot, V., Benavente, F., Hernández, E., Barbosa, J., *Anal. Chim. Acta* **2006**, *577*, 68–76.
- ¹⁹⁴ Balaguer, E., Demelbauer, U., Pelzing, M., Sanz-Nebot, V. *et al.*, *Electrophoresis* **2006**, *27*, 2638–2650.
- ¹⁹⁵ Baldacci, A., Thormann, W., *Electrophoresis* **2006**, *27*, 2444–2457.
- ¹⁹⁶ Simó, C., Herrero, M., Neusüss, C., Pelzing, M. *et al.*, *Electrophoresis* **2005**, *26*, 2674–2683.
- ¹⁹⁷ Arias, M., Simó, C., Ortiz, L. T., de los Mozos-Pascual, M. *et al.*, *Electrophoresis* **2005**, *26*, 2351–2359.
- ¹⁹⁸ Zurbig, P., Renfrow, M. B., Schiffer, E., Novak, J. *et al.*, *Electrophoresis* **2006**, *27*, 2111–2125.
- ¹⁹⁹ Yoo, C., Pal, M., Miller, F. R., Barder, T. J. *et al.*, *Electrophoresis* **2006**, *27*, 2126–2138.
- ²⁰⁰ Simó, C., Perez, P., Neusüss, C., Pelzing, M. *et al.*, *Electrophoresis* **2006**, *27*, 2250–2258.
- ²⁰¹ Zhou, F., Johnston, M. V., *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1383–1388.
- ²⁰² Liang, Z., Zhang, L. H., Duan, J. C., Yan, C. *et al.*, *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1398–1405.
- ²⁰³ Thibault, P., Honda, S. (Eds.), *Capillary Electrophoresis of Carbohydrates*, Humana Press, Totowa, NJ **2003**.
- ²⁰⁴ Ruiz-Calero, V., Moyano, E., Puignou, L., Galceran, M.T., *J. Chromatogr. A* **2001**, *914*, 277.
- ²⁰⁵ Gennaro, A. L., Delaney, J., Vouros, P., Harvey, D. J., Domon, B., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2002**, *16*, 192–200.
- ²⁰⁶ Kühn, A. V., Rüttinger Hans, H., Neubert, H. H. R., Raith, K., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**, *17*, 576–582.
- ²⁰⁷ Zamfir, A., Seidler, D. G., Schönherr, E., Kresse, H., Peter-Katalinic, J., *Electrophoresis* **2004**, *25*, 2010–2016.
- ²⁰⁸ Li, J., Cox, A. D., Hood, D., Moxon, E. R., Richards, J. C., *Electrophoresis* **2004**, *25*, 2017–2025.
- ²⁰⁹ Joucla, G., Brando, T., Remaud-Simeon, M., Monsan, P., Puzo, G., *Electrophoresis* **2004**, *25*, 861–869.
- ²¹⁰ Bindila, L., Peter-Katalinic, J., Zamfir, A., *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1488–1499.
- ²¹¹ Li, J. J., Wang, Z., Altman, E., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, *19*, 1305–1314.

- ²¹² Wang, Z., Vinogradov, E., Larocque, S., Harrison, B. A., Li, J., Altman, E., *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 693–700.
- ²¹³ Li, J., Martin, A., Cox, A. D., Moxon, E. R. et al., *Mass Spectrometry: Modified Proteins and Glycoconjugates* **2005**, *405*, 369–397.
- ²¹⁴ Li, J. J., Cox, A. D., Hood, D. W., Schweda, E. K. H. et al., *Mol. Biosys.* **2005**, *1*, 46–52.
- ²¹⁵ Tissota, B., Salpin, J. Y., Martinez, M., Gaigeota, M. P., Daniela, R., *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 598–609.
- ²¹⁶ Fermas, S., Gonnet, F., Varenne, A., Gareil, P., Daniel, R., *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 4987–4993
- ²¹⁷ Rodriguez, R., Pico, Y., Font, G., Manes, J., *J. Chromatogr. A* **2002**, *949*, 359–366
- ²¹⁸ Bianco, G., Schmitt-Kopplin, P., de Benedetto, G., Kettrup, A., Cataldi, T. R. I., *Electrophoresis* **2002**, *23*, 2904–2912.
- ²¹⁹ Bianco, G., Schmitt-Kopplin, P., Crescenzi, A., Comes, S., Kettrup, A., Cataldi, T. R. I., *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *375*, 799–804.
- ²²⁰ Santos, B., Simonet, B. M., Rios, A., Valcarcel, M., *Electrophoresis* **2004**, *25*, 3427–3433
- ²²¹ Garcia-Villalba, R., Cortacero-Ramirez, S., Segura-Carretero, A., Contreras, J. A. M. L., Fernández-Gutierrez, A., *J. Agric. Food. Chem.* **2006**, *54*, 5400–5409.
- ²²² Ge, L., Yong, J. W. H., Goh, N. K., Chia, L. S. et al., *J. Chromatogr. B* **2005**, *829*, 26–34.
- ²²³ Kuhn, A. V., Ozegowski, J. H., Peschel, G., Neubert, R. H. H., *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 2541–2547.
- ²²⁴ Chen, Y. R., Tseng, M. C., Her, G. R., *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1376–1382.
- ²²⁵ Frommberger, M., Hertkorn, N., Englmann, M., Jakoby, S. et al., *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1523–1532.
- ²²⁶ Meulemans, A., *J. Chromatogr. B* **2005**, *824*, 308–311.
- ²²⁷ Wahby, I., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Ligerio, F. et al., *Electrophoresis* **2006**, *27*, 2208–2215.
- ²²⁸ Ge, L. Y., Yong, J.W. H., Tan, S. N., Yang, X. H., Ong, E. S., *J. Chromatogr. A* **2006**, *1133*, 322–331.
- ²²⁹ Bednar, P., Papouskova, B., Müller, L., Bartak, P. et al., *J. Sep. Sci.* **2005**, *28*, 1291–1299.
- ²³⁰ Simó, C., Rizzi, A., Barbas, C., Cifuentes, A., *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1432–1441.
- ²³¹ Arraez-Roman, D., Cortacero-Ramirez, S., Segura-Carretero, A., Contreras, J. A. M. L., Fernández-Gutierrez, A., *Electrophoresis* **2006**, *27*, 2197–2207.
- ²³² Carrasco-Pancorbo, A., Arraez-Roman, D., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutierrez, A., *Electrophoresis* **2006**, *27*, 2182–2196.

- ²³³ Juan-Garcia, A., Font, G., Pico, Y., *Electrophoresis* **2006**, *27*, 2240–2249.
- ²³⁴ Herrero, M., Arraez-Roman, D., Segura, A., Kenndler, E. *et al.*, *J Chromatogr. A* **2005**, *1084*, 54–62.
- ²³⁵ Altria, K. D., Kelly, M. A., Clark, B. J., *Trends Anal. Chem.* **1998**, *17*, 204–214
- ²³⁶ Smyth, F. W., *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1334–1357.
- ²³⁷ Guetens, G., de Boeck, G., Highley, M. S., Wood, M., Maes, R. A. A., Eggermont, A. A. M., Hanauske, A., *et al.*, *J. Chromatogr. A* **2002**, *976*, 239–247
- ²³⁸ Wey, A. B., Thormann, W., *J. Chromatogr. B* **2002**, *770*, 191–205.
- ²³⁹ Caslavská, J., Thormann, W., *J. Chromatogr. B* **2002**, *770*, 207–216.
- ²⁴⁰ Qin, W., Li, S. F. Y., *Electrophoresis* **2002**, *23*, 4110–4116.
- ²⁴¹ Peri-Okonny, U. L., Kenndler, E., Stubbs, R. J., Guzman, N., *Electrophoresis* **2003**, *24*, 139–150.
- ²⁴² Kindt, E. K., Kurzyniec, S., Wang, S.-C., Kilby, G., Rossi, D. T., *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, *31*, 893–904.
- ²⁴³ Feng, H.-T., Yuan, L.-L., Li, S. F. Y., *J. Chromatogr. A* **2003**, *1014*, 83–91.
- ²⁴⁴ Wan, H., Holmen, A. G., Wang, Y., Lindberg, W., Englund, M., Nagard, M. B., Thompson, R. A., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**, *17*, 2639–2648.
- ²⁴⁵ Krisko, R. M., Schieferecke, M. A., Williams, T. D., Lunte, C. E., *Electrophoresis* **2003**, *24*, 2340–2347.
- ²⁴⁶ Anderson, M. S., Lu, B., Abdel-Rehim, M., Blomberg, S., Blomberg, L., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 2612–2618.
- ²⁴⁷ Baldacci, A., Caslavská, J., Wey, A. B., Thormann, W., *J. Chromatogr. A* **2004**, *1051*, 273–282.
- ²⁴⁸ Bringmann, G., Kajahn, I., Neusüss, C., Pelzing, M. *et al.*, *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1513–1522.
- ²⁴⁹ Chalmers, M. J., Mackay, C. L., Hendrickson, C. L., Wittke, S. *et al.*, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 7163–7171.
- ²⁵⁰ Ganzera, M., Piereder, D., Sturm, S., Erdelmeier, C., Stuppner, H., *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1724–1731.
- ²⁵¹ Graham, R. L. J., McClean, S., O’Kane, E. J., Theakston, D., Shaw, C., *Biochem. Biophys. Res. Co.* **2005**, *333*, 88–94.
- ²⁵² Liu, C. C., Huang, J. S., Tyrrell, D. L. J., Dovichi, N. J., *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1424–1431.

- ²⁵³ Meier, M., Kaiser, T., Herrmann, A., Knueppel, S. *et al.*, *J. Diabetes Complicat.* **2005**, *19*, 223–232.
- ²⁵⁴ Neusüss, C., Demelbauer, U., Pelzing, M., *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1442–1450.
- ²⁵⁵ Peri-Okonny, U. L., Wang, S. X., Stubbs, R. J., Guzman, N. A., *Electrophoresis* **2005**, *26*, 2652–2663.
- ²⁵⁶ Psurek, A., Neusüss, C., Pelzing, M., Scriba, G. K. E., *Electrophoresis* **2005**, *26*, 4368–4378.
- ²⁵⁷ Sassi, A. P., Andel, F., Bitter, H. M. L., Brown, M. P. S. *et al.*, *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1500–1512.
- ²⁵⁸ Simó, C., Gonzalez, R., Barbas, C., Cifuentes, A., *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 7709–7716.
- ²⁵⁹ Theodorescu, D., Fliser, D., Wittke, S., Mischak, H. *et al.*, *Electrophoresis* **2005**, *26*, 2797–2808.
- ²⁶⁰ Wittke, S., Haubitz, M., Walden, M., Rohde, F. *et al.*, *Am. J. Transplant.* **2005**, *5*, 2479–2488.
- ²⁶¹ Wittke, S., Mischak, H., Walden, M., Kolch, W. *et al.*, *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1476–1487.
- ²⁶² Sturm, S., Strasser, E. M., Stuppner, H., *J. Chromatogr. A* **2006**, *1112*, 331–338.
- ²⁶³ Mol, R., Kragt, E., Jimidar, L., de Jong, G. J., Somsen, G.W., *J. Chromatogr. B* **2006**, *843*, 283–288.
- ²⁶⁴ Norton, D., Rizvi, S. A. A., Shamsi, S. A., *Electrophoresis* **2006**, *27*, 4273–4287.
- ²⁶⁵ Anurukvorakun, O., Suntornsuk, W., Suntornsuk, L., *J. Chromatogr. A* **2006**, *1134*, 326–332.
- ²⁶⁶ Himmelsbach, M., Klampfl, C. W., Buchberger, W., *J. Sep. Sci.* **2005**, *28*, 1735–1741.
- ²⁶⁷ Campa, C., Rossi, M., Flamigni, A., Baiutti, E. *et al.*, *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1533–1540.
- ²⁶⁸ Vassort, A., Barrett, D. A., Shaw, P. N., Ferguson, P. D., Szucs, R., *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1712–1723.
- ²⁶⁹ Sugimoto, M., Kikuchi, S., Arita, M., Soga, T. *et al.*, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 78–84.
- ²⁷⁰ Edwards, E. L., Rodrigues, J. A., Ferreira, J., Goodall, D. M. *et al.*, *Electrophoresis* **2006**, *27*, 2164–2170.
- ²⁷¹ Edwards, J. L., Chisolm, C. N., Shackman, J. G., Kennedy, R. T., *J. Chromatogr. A* **2006**, *1106*, 80–88.
- ²⁷² Ullsten, S., Danielsson, R., Backstrom, D., Sjoberg, P., Bergquist, J., *J. Chromatogr. A* **2006**, *1117*, 87–93.

- ²⁷³ Akbay, C., Rizvi, S. A. A., Shamsi, S. A., *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 1672–1683.
- ²⁷⁴ Visky, D., Jimidar, I., Van Ael, W., Vennekens, T. *et al.*, *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1541–1549.
- ²⁷⁵ Castro-Puyana, M., Garcia-Ruiz, C., Cifuentes, A., Crego, A. L., Marina, M. L., *J. Chromatogr. A* **2006**, *1114*, 170–177.
- ²⁷⁶ Kitagawa, F., Inoue, K., Hasegawa, T., Kamiya, M. *et al.*, *J. Chromatogr. A* **2006**, *1130*, 219–226.
- ²⁷⁷ Schappler, J., Guillarme, D., Prat, J., Veuthey, J. L., Rudaz, S., *Electrophoresis* **2006**, *27*, 1537–1546.
- ²⁷⁸ Servais, A. C., Fillet, M., Mol, R., Somsen, G. W. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *40*, 752–757.
- ²⁷⁹ Zheng, J., Shamsi, S. A., *Electrophoresis* **2006**, *27*, 2139–2151.
- ²⁸⁰ Schappler, J., Guillarme, D., Prat, J., Veuthey, J.L., Rudaz, S., *Electrophoresis* **2008**, *29*, 2193–2202
- ²⁸¹ Cahours, X., Morin, P., Dessans, H., Agrofoglio, L. A., *Electrophoresis* **2002**, *23*, 88–92.
- ²⁸² Warnke, U., Rappel, C., Meier, H., Kloft, C., Galanski, M., Hartinger, C. G., Keppler, B. K., Jaehde, U., *ChemBioChem* **2004**, *5*, 1543–1549.
- ²⁸³ Gennaro, L. A., Vadhanam, M., Gupta, R. C., Vouros, P., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 1541–1547.
- ²⁸⁴ Willems, A. V., Deforce, D. L., van den Eeckhout, E. G., Lambert, W. E., van Peteghem, C. H., de Leenheer, A. P., van Bocxlaer, J. F., *Electrophoresis* **2002**, *23*, 4092–4103
- ²⁸⁵ Peterson, Z. D., Lee, M. L., Graves, S.W., *J. Chromatogr. B* **2004**, *810*, 101–110.
- ²⁸⁶ Gottardo, R., Bortolotti, F., Trettene, M., de Paoli, G., Tagliaro, F., *J. Chromatogr. A* **2004**, *1051*, 207–211.
- ²⁸⁷ Sentellas, S., Moyano, E., Puignou, L., Galceran, M. T., *J. Chromatogr. A* **2004**, *1032*, 193–201
- ²⁸⁸ Itoh, A., Ohashi, Y., Soga, T., Mori, H., Nishioka, T., Tomita, M., *Electrophoresis* **2004**, *25*, 1996–2002
- ²⁸⁹ Baidoo, E. E. K., Clench, M. R., Smith, R. F., Tetler, L. W., *J. Chromatogr. B* **2003**, *796*, 303–313.
- ²⁹⁰ Vuorensola, K., Siren, H., Karjalainen, U., *J. Chromatogr. B* **2003**, *788*, 277–289.
- ²⁹¹ Peterson, Z. D., Collins, D. C., Bowerbank, C. R., Lee, M. L., Graves, S. W., *J. Chromatogr. B* **2004**, *776*, 221–229.

- ²⁹² Vuorensola, K., Siren, H., Kostianen, R., Kotiaho, T., *J. Chromatogr. A* **2002**, 979, 277–289
- ²⁹³ Strickmann, D. B., Küng, A., Keppler, B. K., *Electrophoresis* **2002**, 23, 74–80.
- ²⁹⁴ Küng, A., Galanski, M., Baumgartner, C., Keppler, B. K., *Inorg. Chim. Acta* **2002**, 339, 9–13.
- ²⁹⁵ Goodwin, L., Startin, J. R., Keely, B. J., Goodall, D. M., *J. Chromatogr. A* **2003**, 1004, 107–119.
- ²⁹⁶ Juan-Garcia, A., Font, G., Pico, Y., *Electrophoresis* **2005**, 26, 1550–1561
- ²⁹⁷ Rodriguez, R., Manes, J., Pico, Y., *Anal. Chem.* **2003**, 75, 452–459.
- ²⁹⁸ Groom, C. A., Halasz, A., Paquet, L., Thiboutot, S. *et al.*, *J. Chromatogr. A* **2005**, 1072, 73–82.
- ²⁹⁹ Hernández-Borges, J., Rodríguez-Delgado, M. A., García-Montelongo, F. J., Cifuentes, A., *J. Sep. Sci.* **2005**, 28, 948–956.
- ³⁰⁰ Kaech, A., Hofer, M., Rentsch, D., Schnider, C., Egli, T., *Biodegradation* **2005**, 16, 461–473.
- ³⁰¹ Safarpour, H., Asiaie, R., *Electrophoresis* **2005**, 26, 1562–1566.
- ³⁰² Zhao, X. H., Lu, Y. P., Hardin, I., *Biotechnol. Lett.* **2005**, 27, 69–72.
- ³⁰³ Viberg, P., Wahlund, K. G., Skog, K., *J. Chromatogr. A* **2006**, 1133, 347–352.
- ³⁰⁴ Chang, C. H., Chen, C. J., Chuang, Y. C., Her, G. R., *Electrophoresis* **2006**, 27, 4303–4311.
- ³⁰⁵ Fakhari, A. R., Breadmore, M. C., Macka, M., Haddad, P. R., *Anal. Chim. Acta* **2006**, 580, 188–193.
- ³⁰⁶ Fekete, A., Frommberger, M., Ping, G. C., Lahaniatis, M. R. *et al.*, *Electrophoresis* **2006**, 27, 1237–1247.
- ³⁰⁷ Himmelsbach, M., Buchberger, W., Klampfl, C. W., *Electrophoresis* **2006**, 27, 1220–1226.
- ³⁰⁸ Kitagawa, F., Shiomi, K., Otsuka, K., *Electrophoresis* **2006**, 27, 2233–2239.
- ³⁰⁹ Lara, F. J., García-Campaña, A. M., Ales-Barrero, F., Bosque-Sendra, J. M., García-Ayuso, L. E., *Anal. Chem.* **2006**, 78, 7665–7673.
- ³¹⁰ Li, C. C., Chen, Z., Wen, D. W., Zhang, J. X. *et al.*, *Electrophoresis* **2006**, 27, 2152–2163.
- ³¹¹ Para, B. V., Nunez, O., Moyano, E., Galceran, M. T., *Electrophoresis* **2006**, 27, 2225–2232.
- ³¹² Santos, B., Lista, A., Simonet, B. M., Rios, Á., Valcárcel, M., *Electrophoresis* **2005**, 26, 1567–1575.

- ³¹³ Simo, C., Cottet, H., Vayaboury, W., Giani, O., Pelzing, M., Cifuentes, A., *Anal. Chem.*, **2004**, *76*, 335–344.
- ³¹⁴ Zhang, B., Krull, I. S., Cohen, A., Smisek, D. L., Kloss, A., Wang, B., Bourque, A. J., *J. Chromatogr. A* **2004**, *1034*, 213–220.
- ³¹⁵ Morin, C. J., Geulin, L., Desbene, A., Desbene, P. L., *J. Chromatogr. A* **2004**, *1032*, 327–334.
- ³¹⁶ Al-Jarah, S. Y., Sjudahl, J., Woldegiorgis, A., Emmer, A., *J. Sep. Sci.* **2005**, *28*, 239–244.
- ³¹⁷ Friedecky, D., Bednar, P., Prochazka, M., Adam, T., *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids* **2006**, *25*, 1233–1236.
- ³¹⁸ Cook, H. A., Klampfl, C. W., Buchberger, W., *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1576–1583.
- ³¹⁹ Willems, A. V., Deforce, D. L., Van Peteghem, C. H., Van Bocxlaer, J. F., *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1412–1423.
- ³²⁰ Lagarrigue, M., Bossée, A., Bégos, A., Varenne, A., Gareil, P., Bellier, B., *J. Chromatogr. A* **2006**, *1137*, 110–118.
- ³²¹ Lagarrigue, M., Bossée, A., Bégos, A., Delaunay, N., Varenne, A., Gareil, P., Bellier, B., *J. Chromatogr. A* **2008**, *1178*, 239–247.

CHAPITRE II : Etude approfondies sur les effets de succion et de dilution dans un couplage électrophorèse capillaire - spectrométrie de masse *via* une interface à électronébulisation

A- Introduction

Le couplage de l'électrophorèse capillaire avec la spectrométrie de masse (CE/MS) est à ce jour considéré comme une approche analytique multidimensionnelle complémentaire et / ou compétitive aux méthodes séparatives classiques couplées à la spectrométrie de masse. Elle apparaît comme un outil analytique essentiel dans les domaines de la vie, de l'environnement et de la médecine médico-légale. Le couplage CE/MS additionne les avantages des deux méthodes ; l'aspect d'identification (mobilité électrophorétique) et de quantification (aires des pics) de l'électrophorèse capillaire, combiné à l'information structurale et la détermination des masses moléculaires par la spectrométrie de masse. D'un côté, l'électrophorèse capillaire est une méthode séparative très attrayante, en raison de sa faible consommation en échantillon, des faibles durées d'analyse, de sa haute efficacité de séparation, et de sa facilité d'emploi et d'automatisation, mais aussi par le fait qu'elle est exempte de phase stationnaire, ce qui est favorable à l'étude de mécanismes d'interaction. De l'autre côté, la spectrométrie de masse est une technique de détection universelle, permettant non seulement la détection de pratiquement n'importe quel analyte, mais fournit également des informations structurales pour une identification sans équivoque des composés.

La combinaison de l'électrophorèse capillaire à la détection par spectrométrie de masse remonte à deux décennies, lorsque Smith et ses collègues ont présenté la première interface de travail [1-3]. Le module d'interface doit fournir la robustesse, la stabilité, la sensibilité et le maintien de l'efficacité de séparation. Diverses interfaces CE/MS ont été développées pour plusieurs types de sources d'ionisation, l'ionisation par électronébulisation ESI [4], l'ionisation chimique à pression atmosphérique APCI [5], l'ionisation photochimique sous pression atmosphérique APPI [6, 7], l'ionisation/désorption assistée par laser MALDI

(Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation) [8], l'induction par couplage plasma ICP [9] et le bombardement rapide à débit continu d'atome FAB (Flow Fast Atom) [10]. L'ionisation par électronébulisation, développée et mise au point par Dole et al. [11] et Fenn et al. [12], est l'interface la plus commune car c'est la technique d'ionisation la plus douce. Elle est considérée comme l'interface idéale pour le couplage en ligne de l'électrophorèse capillaire avec la spectrométrie de masse, car elle facilite le transfert des analytes de la phase liquide de l'électrophorèse en phase gazeuse vers le spectromètre de masse, produisant des ions directement à partir des liquides à pression atmosphérique, avec une grande sensibilité pour l'analyse d'un large éventail d'analytes. L'ionisation par électronébulisation permet la détection d'une large gamme d'espèces moléculaires, générant des ions avec de multiples charges. Même les espèces de masse moléculaire élevée pourront être détectées à leur rapport masse sur charge (m/z) avec la plupart des analyseurs MS. Trois modèles d'interface à électronébulisation ont été développés au cours des 20 dernières années pour le couplage de l'électrophorèse capillaire avec la spectrométrie de masse [4, 13-15], (i) l'interface sans liquide additionnel « Sheathless », dans laquelle le capillaire de séparation est directement connecté à une interface nanoelectrospray [16], (ii) l'interface à jonction liquide, composée d'un petit compartiment contenant du liquide, permettant la jonction entre le capillaire de séparation et l'aiguille d'interface à électronébulisation et (iii) l'interface à liquide additionnel coaxial, consistant en la jonction à l'extrémité du capillaire de séparation avec un autre capillaire à travers lequel arrive un écoulement constant en liquide additionnel. Cette dernière interface est, à ce jour, la plus fréquemment utilisée pour les couplages CE/ESI-MS.

L'une des principales difficultés du couplage de l'électrophorèse capillaire avec la spectrométrie de masse réside dans le maintien du contact électrique aux bornes du système d'électrophorèse, afin d'assurer la séparation électrophorétique d'une part, mais aussi au niveau du spectromètre de masse pour assurer l'efficacité d'ionisation/désorption dans la source et donc permettre l'obtention d'une bonne sensibilité de détection. Dans la configuration d'un couplage CE/MS, la sortie du capillaire de séparation doit être connectée à la source MS et le réservoir d'électrolyte, habituellement utilisé en sortie en configuration CE-UV, est retiré. L'interface CE/MS doit alors permettre d'appliquer une tension à la sortie du capillaire. La seconde difficulté concerne la différence entre les débits de liquide provenant de l'électrophorèse (de l'ordre d'une centaine de nL/min) et celui d'un spray de nébulisation classique (de l'ordre du μ L/min). Afin de pallier ces difficultés un liquide additionnel est alors délivré par l'interface : il permet de réaliser le contact électrique à l'extrémité de la sortie du

capillaire d'électrophorèse d'une part, de pallier les faibles débits d'électrophorèse et de permettre l'obtention un spray d'électronébulisation suffisant et stable d'autre part. Dans une interface à électronébulisation, un gaz nébulisant est utilisé afin d'aider la formation des petites gouttelettes et de permettre de fournir un spray stable. La pression du gaz nébulisant devra être fixée à une valeur optimale afin de répondre à un compromis entre la sensibilité et la stabilité du spray. Un gaz séchant est introduit à l'entrée du capillaire de transfert pour compléter le transfert des analytes en phase gazeuse.

Lors de quelques études pour l'analyse de divers types de composés par couplage CE/ESI-MS avec une interface à liquide additionnel coaxial, l'influence des paramètres de l'interface (débits de liquide additionnel, de gaz séchant, de gaz nébulisant, température de gaz séchant, position du capillaire dans l'interface ...), sur la sensibilité de détection, a entre autres été étudiée et ces paramètres optimisés. Il a été principalement constaté que la pression du gaz nébulisant était un paramètre à ne pas négliger, ayant une influence significative sur les temps de migration des analytes, la sensibilité de détection et la résolution de la séparation. [17-21]. Une perturbation du système électrophorétique a été constatée lors de l'augmentation du débit de gaz nébulisant. Celle-ci a conduit à des temps d'analyses plus courts, un élargissement de pics et donc une baisse de l'efficacité de séparation, et une moins bonne résolution des composés. Ceci a été expliqué par le fait, que le débit du gaz nébulisant, arrivant de manière coaxiale, produisait un effet de succion à l'extrémité de la sortie du capillaire d'électrophorèse, engendrant un flux hydrodynamique laminaire additionnel au sein du capillaire de séparation. Il a également été constaté que ce phénomène était d'autant plus accentué que le diamètre du capillaire était plus grand [17] et sa longueur plus faible. Par ailleurs, l'augmentation de la pression du gaz nébulisant permettait d'améliorer la sensibilité de détection en MS, car celle-ci est bénéfique pour le processus d'électronébulisation. Elle favorise le passage des composés de l'état liquide à l'état gazeux, par la formation de plus petites gouttelettes dans le spray d'électronébulisation [22]. Il a été également décrit dans la littérature, que durant l'étape d'injection des composés, une quantité d'air était susceptible de pénétrer à l'intérieur du capillaire de séparation, du à l'effet de succion, pouvant conduire à une instabilité du courant d'électrophorèse et donc perturber la séparation électrophorétique [23]. Une étude plus approfondie sur cet effet de succion a été effectuée sur deux types d'interface, présentant des géométries différentes [24]. Il a principalement été constaté que ce phénomène était engendré par le débit du gaz nébulisant mais également que le diamètre externe du capillaire pouvait avoir une influence importante. En ce qui concerne le liquide additionnel, [20, 25] il a été constaté que l'abondance des pics diminue lorsque le débit du

liquide additionnel augmente. Cette baisse de sensibilité a été expliquée comme étant due à un effet de dilution, résultant du mélange entre les deux fluides (liquide additionnel et électrolyte de séparation) à l'aiguille d'interface. Il a également été constaté qu'aux faibles débits de liquide additionnel, le spray d'électronébulisation n'était plus très stable.

Beaucoup d'auteurs notent également l'importance majeure du positionnement de l'extrémité du capillaire d'électrophorèse au niveau de l'interface par rapport à l'arrivée du liquide additionnel. La réponse du signal et la stabilité optimale du système ont été obtenues lorsque le capillaire de séparation dépassait de 0,05-0,3 mm par rapport au capillaire d'introduction du liquide additionnel [26-31].

Dans le cadre de la compréhension des mécanismes mis en jeu dans le système d'interfaçage par électronébulisation entre l'électrophorèse capillaire et la spectrométrie de masse, nous nous sommes intéressés à ces deux phénomènes inhérents au couplage, l'effet de succion et l'effet de dilution, qui n'avaient pas été étudiés de façon systématique jusqu'alors. Dans une étude réalisée par notre groupe (voir Chapitre III), les données expérimentales avaient montré que l'effet de succion ne semblait pas être uniquement généré par le débit de gaz nébulisant, mais également par le débit de liquide additionnel coaxial et probablement par d'autres paramètres comme la température et la position du capillaire au niveau de l'interface. Dans la première partie de ce chapitre, nous présenterons une étude plus approfondie sur ce phénomène. Nous étudierons systématiquement les différents paramètres intervenant à l'interface, c'est-à-dire la position du capillaire, la température et le débit du gaz séchant, la pression du gaz nébulisant, le débit du liquide additionnel, ainsi que les débits électroosmotiques et hydrodynamiques dans le capillaire de séparation. Les résultats seront discutés en termes de débits dans les trois capillaires concentriques de l'interface ESI à jonction liquide coaxiale.

Dans la seconde partie du chapitre, l'étude se concentrera sur l'effet de dilution résultant du mélangeage des trois fluides au niveau de l'aiguille d'interface ESI (liquide additionnel, gaz nébulisant et électrolyte de séparation), et par conséquent de l'effet de succion aussi. Cet effet de dilution, brièvement noté [20, 25], peut avoir des conséquences importantes sur la sensibilité de détection en couplage CE/ESI-MS.

B- Article : Partie I

A new insight into suction and dilution effects in capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry *via* an electrospray ionization interface. Part I- Suction effect

Meriem Mokaddem¹, Pierre Gareil¹, Jamel-Eddine Belgaied², Anne Varenne¹

Electrophoresis **2008**, 29, 1957–1964

¹ Laboratory of Electrochemistry and Analytical Chemistry, UMR 7575 CNRS-ENSCP-Paris 6, Paris, France

² Laboratory of Analytical Chemistry and Electrochemistry, (04UR12-01) INSAT, B.P. 676, Tunis, Tunisie

Keywords: Drying gas / Electroosmotic flow velocity / Hydrodynamic flow velocity / nebulizing gas / Sheath liquid

Non-standard abbreviations: BA, benzoic acid; DG, drying gas; FA, formamide; NG, nebulizing gas; SL, sheath liquid

Abstract

The hyphenation of CE with MS is nowadays accepted as a powerful analytical approach. Employing ESI, the most common interface, one challenge is to provide quantitative information, which is quite a difficult task, as it is linked, among other factors, to suction and dilution effects. In the coaxial ESI configuration, the suction effect has been presented in literature as stemming from nebulizing gas (NG) flow rate and drying gas temperature. But as this interface consists in three concentric capillaries, allowing for BGE, sheath liquid (SL) and NG mixing, it is demonstrated herein that other parameters are also involved in this suction effect: the CE capillary protrusion from the interface needle, SL flow rate, and overall BGE flow rate and velocity profile. Whereas NG flow rate is the parameter affecting suction to a greater extent, separation capillary protruding length, SL, and overall BGE flow rate have a significant additional impact on this phenomenon. It is shown that SL flow rate can affect suction differently according to the NG velocity, which may be explained by modification of the Taylor cone geometry. Furthermore, it appears that suction effect is noticeably favoured by a parabolic velocity profile of the BGE, again probably due to the Taylor cone shape modification. Finally, the temperature gradient created by the contact between the heated NG and the separation capillary enhances this effect.

1- Introduction

The hyphenation of CE with MS (CE-MS) is nowadays accepted as a multidimensional analytical approach, complementary and/or competitive to classical MS-hyphenated separation techniques, and emerging as an essential analytical tool in the fields of life, environmental and forensic sciences. CE-MS combines the advantage of both techniques so that qualitative (migration times) and quantitative (peak areas) information, in combination with molecular masses and/or fragmentation patterns can be obtained in a single run. On one side, CE is a very attractive separation method because of its low sample consumption, short analysis time, high separation efficiency, ease of operation and automation, and that it is free of stationary phase, which is adequate for interaction studies. On the other side, MS is a well established universal detection technique allowing not only the detection of virtually any analyte, but also providing structural information for unequivocal analyte identification. The combination of CE to MS detection dates back to two decades, when Smith and coworkers introduced the first working interface [1–3]. The interface module must provide robustness, stability, sensitivity and maintain separation efficiency. Various CE-MS interfaces for several types of ionization sources have been developed, *i.e.* ESI [4], atmospheric pressure chemical ionization [5], atmospheric pressure photochemical ionization [6], MALDI [7], inductively coupled plasma [8] and FAB [9] ionizations. ESI, developed by Dole *et al.* [10] and Fenn *et al.* [11], serves as the most common interface as it is the softest ionization technique. It is considered as the ideal technique for on-line interfacing of CE to MS, because it facilitates the transfer of analytes from the liquid phase of CE to the gas phase of MS, producing ions directly from liquids at atmospheric pressure, with high sensitivity for a wide range of analytes. ESI allows the detection of large molecular species: by generating ions with multiple charges, even species with high M_r will fall within the limited mass-to-charge ratio detection range of most MS analyzers. Three ESI interface designs have been developed in the last 20 years for coupling CE with MS [4, 12–14], (i) the sheathless interface, wherein the separation capillary is connected directly to a nanoelectrospray emitter [15], (ii) the liquid junction interface, made of a small liquid-filled gap between the separation capillary and an ESI emitter and (iii) the coaxial sheath flow interface, consisting in enclosing the end of the separation capillary with another capillary through which flows a constant supply of sheath liquid ; the latter interface being to date the most frequently used coupling device.

One of the main issues for coupling CE to MS consists in maintaining a continuous electric contact for both the electrophoretic system, providing separation, and the mass spectrometer for efficient ionization in the source and thus detection sensitivity. In CE-MS, the outlet of the separation capillary has to be connected to the MS ion source and obviously, no outlet buffer vial can be used. A CE-MS interface should provide a means to apply voltage to the capillary outlet. The second main issue concerns the flow rate adjustment between CE (in the hundred nL/min range) and the classical sprayers (in the mL/min range), that can be performed through an additional liquid (sheath liquid (SL)) provided by the interface. Alternatively, a miniaturized ESI interfacing system should be used. Other main problems concerning this hyphenation are to provide API, to ensure adequate acquisition and scan speeds and to allow solvent/chemical consistency. In an ESI interface, a nebulizing gas (NG) is used to assist droplet formation and to obtain a stable spray and a drying gas (DG) is introduced at the entrance of the transfer capillary to complete analyte transfer into the gas phase. The NG pressure should meet a compromise between sensitivity and spray stability. Elevated flow rates of NG are known to cause a hydrodynamic flow inside the separation capillary due to a suction effect at the capillary tip [16–19]. This phenomenon has been described as depending mainly from the NG flow rate and DG temperature [20].

In a previous study from our group on the setup of effective strategies for single-run analysis of cationic, anionic and polyanionic compounds by CE-ESI-MS using the coaxial interface [21], the experimental data showed that the suction effect did not seem to be governed only by the NG flow, but also by the coaxial SL flow and hypothetically by other parameters such as temperature and capillary position in the interface. In this paper, we present a deeper study into this phenomenon. We systematically investigated the various parameters involved in the interface, *i.e.* capillary position, DG temperature, NG and DG flow rates, and electroosmotic and hydrodynamic flow rates inside the separation capillary. The results were discussed in terms of respective flow rates in the three concentric capillaries designing the coaxial SL interface.

2- Materials and methods

2.1 Chemicals

Ammonium formate, benzoic acid (BA), triethylamine, and formamide (FA) were purchased from Sigma-Aldrich-Fluka (Saint-Quentin Fallavier, France), sodium hydroxide and HPLC quality methanol from Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France) and ammonia from Merck (Darmstadt, Germany). The analyte solutions were prepared by dissolving BA at a concentration of *ca.* 5 mM in water. Deionized water was obtained from an Alpha-Q system (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France). The BGE was composed of 30 mM ammonium formate and 142.5 mM ammonia, pH 10.0 (ionic strength, 30 mM). Electrolytes were filtered through 0.2 mm PVDF membrane filters (Pall Life Sciences, MI,USA) before use.

2.2 CE-UV experiments

CE was performed with an HP^{3D}CE instrument (Agilent Technologies, Massy, France) equipped with a UV absorbance DAD. Separations were realized in 50 μm id (360 μm od) x 100 cm (20 cm effective length) bare fused silica capillaries (Photonlines, Marly-le-Roi, France). Formamide (0.1% v/v in the BGE) was used as neutral marker to determine EOF. Analytes were hydrodynamically injected (5 kPa, 2 s) and separation voltage was varied from 5 to 30 kV in positive polarity, according to experiments. New capillaries were conditioned by successive flushes with 1 M and 0.1 M NaOH and then with water under a pressure of 93.5 kPa for 15 min each. The temperature in the capillary cassette was set at 25°C. The acquisition rate was 10 points/s. Analytes were detected by UV absorbance at 200 nm. Between runs, capillaries were rinsed with the BGE for 3 min. Capillaries were rinsed with water and dried by air when not in use.

2.3 MS detection

An Agilent Series 1100 MSD single quadrupole mass spectrometer (Agilent Technologies) equipped with an orthogonal ESI source was used in the negative ionization mode. Nitrogen was used as NG at a temperature of 100°C (pressure in the 0 to 100 kPa

range) and as DG at 300°C (flow rate in the 0 to 8 L/min range). Optimized ESI voltage was 3500 V. Skimmer voltage was 10 V. Peak width and dwell time were set to 0.3 min and 880 ms, respectively. CE-MS coupling was carried out using a SL coaxial ESI interface (Agilent Technologies). MS detection of the compounds by direct injection was performed by continuously flushing the sample from the separation capillary to the MS detector under pressure *via* the ESI interface. The SL (50:50 v/v MeOH-H₂O mixture containing 0.01% v/v triethylamine) was delivered by an Agilent 1100 series isocratic HPLC pump (flow rate in the 0–10 µL/min range).

2.4 CE-MS experiments

The MS conditions were those described in Section 2.3. CE-MS experiments were realized in 50 mm id (360 mm od) x 100 cm (20 cm effective length to UV detector and 100 cm effective length to MS detector) bare fused-silica capillaries (Photonlines). Glucose (5 mM in water) and FA (0.1% v/v in the glucose solution) were used as neutral markers to determine EOF in MS and UV detection, respectively. When necessary, a pressure (1–5 kPa) was continuously applied at the inlet of the separation capillary during CE-MS separations.

3- Results and discussion

Coaxial sheath flow interface is to date the most frequently used coupling device, employing three concentric capillaries [22–24] (Fig. 1). The innermost capillary, used for the electrophoretic separation is inserted into the atmospheric region of the ESI source and is surrounded by a metal tube of a larger diameter in a coaxial arrangement, through which the SL is introduced and mixes with the BGE directly in the Taylor cone [25–27]. This arrangement is surrounded by a third tube through which the NG is pumped, which assists in spray formation [28] and scavenges free electrons to prevent corona discharge [20, 29]. The major processes involved in electrospray [30, 31] are (i) the production of charged droplets at the electrospray tip, (ii) the shrinkage of the charged droplet by solvent evaporation and disintegration of the drops resulting from the highly charged droplets, and (iii) the formation of the gas-phase ions that can be described by either the ion evaporation model or the charge residue model, these latter mechanisms still being the subject of many discussions [32, 33].

When performing separations using CE-ESI-MS hyphenation *via* a coaxial SL interface, the overall hydrodynamic velocity of the fluid in the CE capillary, v_{hydro} , can be described according to Eq. (1):

$$v_{\text{hydro}} = v_{\text{eo}} + v_{\Delta P} + v_{\text{suction}} \quad (1)$$

where v_{eo} is the electroosmotic velocity due to voltage application, $v_{\Delta P}$ is the velocity resulting from possible additional application of a pressure at the inlet of the separation capillary, and v_{suction} the velocity due to the suction effect. The apparent velocity of a charged analyte is then:

$$v_{\text{app}} = v_{\text{ep}} + v_{\text{hydro}} \quad (2)$$

where v_{ep} is the analyte electrophoretic velocity. For now, the origin of the suction effect has been mainly associated to the DG temperature and the NG flow rate, and this results in a parabolic flow profile which lowered separation efficiency [20]. In a previous study, we evidenced that other parameters influenced this phenomenon as well [21]. As the parameters involved in such a hyphenation are numerous (capillary position in the interface needle, DG flow rate and temperature, NG and SL flow rates, EOF velocity) and act at different positions of the coupling, they must be studied independently and/or in combination to estimate their impact on the suction effect. Figure 1 represents a diagram of the interface module where the action of the parameters previously described is localized. This study was performed with BA as charged analyte, FA as neutral marker for UV detection and glucose as neutral marker for MS detection in negative mode. SL was composed of a 50:50 v/v MeOH-H₂O mixture containing 0.01% v/v triethylamine to complete sample ionization. In this configuration, no moving boundary of triethylammonium ion should occur because (i) triethylamine was scarcely protonated in the mixture and (ii) triethylammonium ion could not migrate to the positive capillary inlet [34]. Results were identical whatever the mixture proportion within the 20:80 to 80:20 v/v MeOH:H₂O range. It was firstly verified that v_{hydro} values, determined as the apparent velocity of the neutral markers under CE-MS arrangement, were always identical, whether the detection was performed by UV at 20 cm from capillary inlet or by MS at 100 cm from capillary inlet (results not shown), which confirms the absence of any additional extra-column residence time originating from the interface and points to the constancy of the overall hydrodynamic velocity over time. Furthermore it was verified that skimmer voltage did not influence v_{hydro} , whereas an increase in ESI voltage from 1500 to 4000 V led to a slight but significant increase in v_{hydro} by about 5% (for a NG pressure of 55 kPa, a SL flow rate of 6 $\mu\text{L}/\text{min}$ and a separation voltage of 30 kV). The study was focused on

the position of the separation capillary at the interface outlet, DG temperature and flow rate, and the flow rates of the three fluids emerging from the interface needle, *i.e.* NG, SL and BGE.

3.1 Capillary position at the interface outlet

The protrusion of the CE capillary from the SL tube (Fig. 1) has serious consequences on the spray performances [35 – 39], *i.e.* spray stability and ionization efficiency or yield, as it influences the mixing quality between SL and BGE. The signal intensity was studied as a function of the protruding length (distance from the SL tube (*a*-value, see Fig. 1), in the 0.1 to 0.4 mm range) which was set *via* a micrometric screw and modified randomly. Analytes were either infused continuously under pressure into the MS instrument *via* the separation capillary or introduced hydrodynamically into the separation capillary as a short plug. The signal intensity goes past a sharp maximum for a protruding length of 0.25 ± 0.05 mm from the SL tube (with NG pressure set at 55 kPa and SL flow rate at 6 $\mu\text{L}/\text{min}$), leading up to a repeatable ($n = 10$) three-fold increase in ion abundance, as compared with other lengths, and repeatable v_{hydro} values, as previously reported in literature [40]. As far as suction effect is concerned, it appeared that v_{hydro} decreased by about 20% when the protruding length increased from 0 to 0.4 mm, this trend being in accordance with literature [20]. A hypothesis to explain this tendency can be that, in the configuration of a protruding length different from zero, SL and NG merge before the contact with the BGE is realized. This could induce an anticipated partial evaporation of SL, leading to a lower final SL flow rate when entering the Taylor cone, thus inducing a lower suction effect. Furthermore, an anticipated SL heating could occur in this configuration, that could lead to an increased ionization/desorption efficiency. Eventually, the capillary position should be optimized according to several criteria: spray stability, sensitivity and suction effect. Subsequently, the capillary position in the electrospray needle was optimized for each series of analyses.

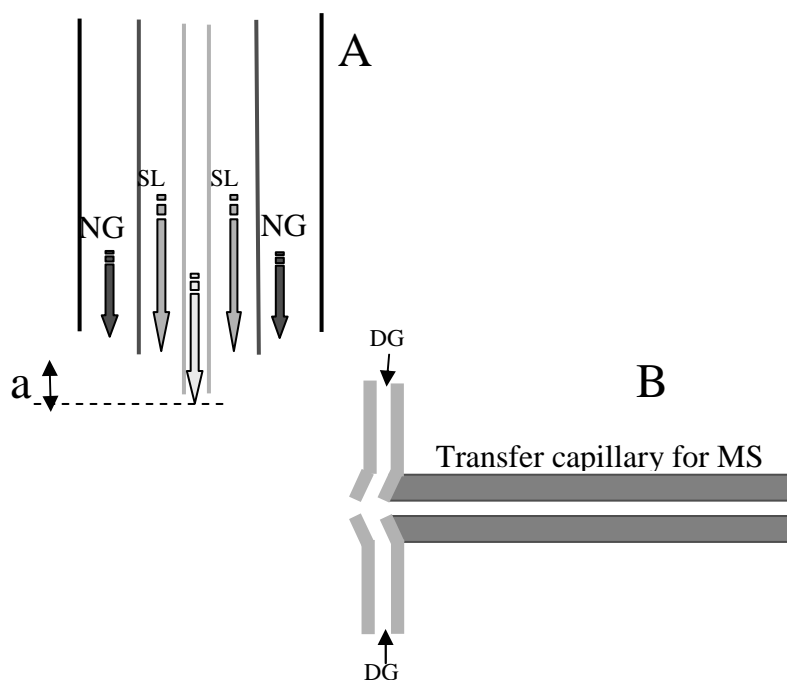


Figure 1. Schematic presentation of the ionization source in the case of the coaxial sheath flow ESI interface. (A) Interface needle comprising three concentric tubes, the innermost one being the separation capillary, surrounded by a first metal tube where the SL flows and by a second one for NG. (B) Transfer capillary for MS at the inlet of which DG flows. “a” is the protrusion length of the CE capillary tip from the SL tube.

3.2 DG temperature and flow rate

When introducing a short plug of BA under an electric field and for a constant DG temperature (300°C), the BA peak intensity and area and its corresponding migration time were constant for a DG flow rate in the range 2–8 L/min. At a DG flow rate of 1 L/min, the peak intensity was twice lower, but the migration time remained unchanged, whereas no signal appeared when no DG flow was applied. This indicates that the presence of a DG is essential to complete nebulization, but its flow rate has no influence on the suction effect, as already observed in the literature [20]. Upon setting the DG flow rate at 7 L/min, a MS signal appeared only when DG temperature was higher than 200°C, in the conditions of this study (BGE, analytes, SL flow rate, 6 mL/min and NG pressure, 55 kPa). This limit likely depends on the analyte nature and on BGE and SL compositions. When varying the DG temperature and monitoring UV detection in the 100 to 350°C range and MS detection in the 200–350°C range, a slight linear increase in v_{hydro} and v_{ep} appeared as a function of temperature (9 and 6%, respectively, in the 100–350°C range), with a decrease in efficiency (about 30%). This

emphasizes that DG temperature has a slight impact on suction effect and electrophoretic migration as well, both phenomena may be caused by a decrease in viscosity, induced by a slight temperature gradient within the separation capillary, although the temperature source corresponding to the DG was not in direct contact with the capillary extremity.

3.3 Fluids intervening at the interface: NG and SL

The apparatus used in this study did not allow to vary the NG temperature, which was fixed at 100°C. Keeping the SL flow rate at a constant value (6 $\mu\text{L}/\text{min}$), the NG pressure was varied between 30 and 100 kPa. Below a pressure of 30 kPa, nebulization was not effective and above a pressure of 100 kPa, noise became excessive. Figure 2 shows a linear increase in v_{hydro} and v_{app} by about 30% on increasing the NG pressure from 30 to 100 kPa, followed by a levelling-off or even perhaps a slight decrease above 100 kPa. Over the whole NG pressure range, v_{ep} (determined as the difference between v_{app} and v_{hydro}) turned out to be constant.

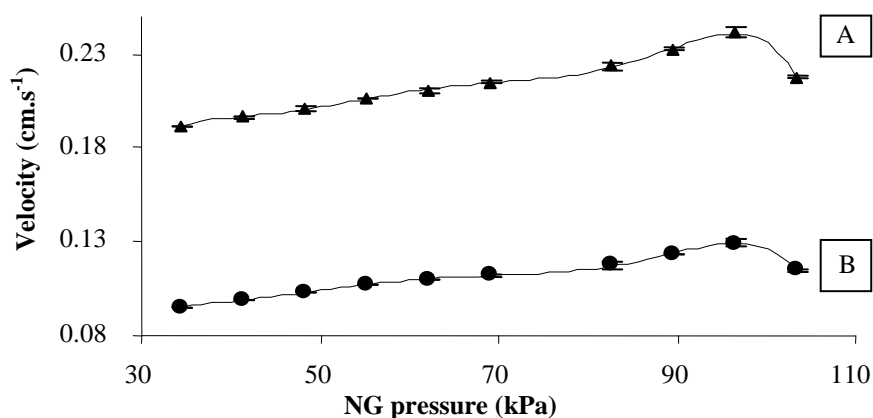


Figure 2. Influence of NG pressure on hydrodynamic (A) and apparent (B) velocities, under electrophoretic separation conditions. CE conditions: bare fused-silica capillary, 50 μm id x 100 cm length. BGE: 30 mM ammonium formate, 142.5 mM ammonia, pH 10.0 (ionic strength, 30 mM). Applied voltage, 30 kV. Cassette temperature, 25°C. Hydrodynamic injection, 5 kPa, 2 s. MS conditions: sheath liquid, water-methanol (1:1, v/v) with 0.01% (v/v) triethylamine; flow rate, 6 $\mu\text{L}/\text{min}$. Nebulizing gas, nitrogen (100°C, 27.6 to 103.4 kPa); drying gas, nitrogen (350°C, 7 mL/min). Negative ionization mode. ESI voltage: 3500 V. Skimmer voltage, 10V. Continuous lines are just a guide for the eyes.

Then, keeping the NG pressure constant (55 kPa), the SL flow rate was varied from 3 to 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, which was the domain for which electric contact was maintained and spray was stable. Figure 3 shows a slight increase in v_{hydro} by about 10% and v_{app} up to a flow rate of 9

mL/min, followed by a levelling-off or slight decrease afterwards, whereas v_{ep} remains constant.

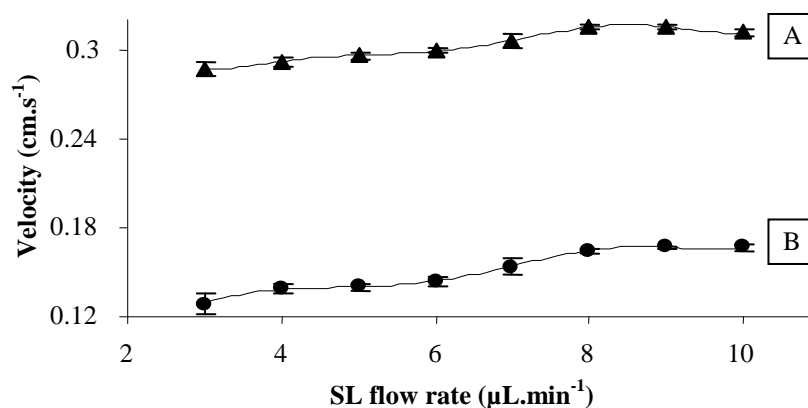


Figure 3. Influence of SL flow rate on hydrodynamic (A) and apparent (B) velocities, under electrophoretic separation conditions. CE and MS conditions: see Fig. 2, except for SL flow rate (3 to 10 $\mu\text{L}/\text{min}$) and NG pressure (55.1 kPa). Continuous lines are just a guide for the eyes.

So, it appears that the flow rates of both NG and SL had an influence on suction effect, with a more pronounced impact for NG. Above a certain value of both NG and SL flow rates, the suction effect seems to decrease.

To go deeper into the understanding of this phenomenon, complementary experiments were performed. According to Eq. (1), v_{suction} can be easily calculated if v_{eo} and $v_{\Delta P}$ are determined. It was verified that the value for $v_{\Delta P}$ determined experimentally in the classical CE arrangement by applying a pressure (1–5 kPa) at the capillary inlet (50 μm id x 1 m, cassette temperature, 25°C) in the absence of separation voltage, SL, NG and DG flows, was equal to the value calculated from the Hagen–Poiseuille law (using the viscosity value for water at 25°C), allowing to use this law for further $v_{\Delta P}$ determinations. v_{eo} was calculated from the migration time of FA with the same capillary in the classical CE arrangement. v_{hydro} was also determined with the same capillary in the CE-MS arrangement (with an SL flow rate of 6 $\mu\text{L}/\text{min}$ and an NG pressure of 55 kPa). When varying the voltage value in the 5 to 30 kV range, v_{eo} (CE), v_{hydro} (CE-MS), which confirmed the existence of the suction effect. v_{hydro} (CE-MS) exhibits a linear variation in terms of voltage, with a slope higher than that of the v_{eo} (CE) vs. voltage plot by about 15% (not shown) suggesting that the suction effect increased with voltage. At this point it has to be reminded that a section of *ca.* 8 cm length of the separation capillary is sheathed by the NG at a temperature of 100°C within the interface needle. This should lead to a temperature gradient inside the separation capillary, modifying

electroosmotic and overall hydrodynamic flows. This temperature gradient may be dependent on the respective values for electroosmotic, NG and SL velocities. To estimate this gradient, experiments were performed with the same capillary either in CE or in CE-MS arrangements. Figure 4 shows the variations of v_{hydro} and v_{app} in the CE-MS arrangement, as compared with the variations of v_{eo} and v_{app} in the classical CE arrangement, according to the temperature imposed in the capillary cassette.

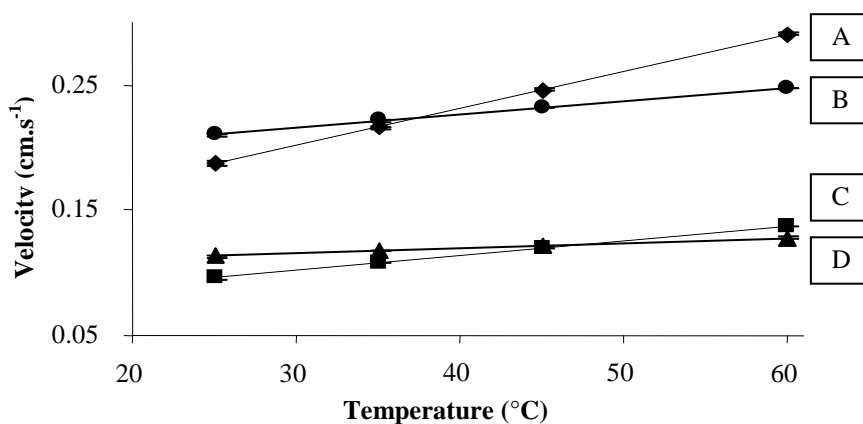


Figure 4. Influence of capillary cassette temperature on hydrodynamic (A, B) and apparent (C, D) velocities, under classical CE (A, C) and CE-MS (B, D) arrangements. CE and MS conditions: see Fig. 2 except for cassette temperature (25 to 60°C) and NG pressure (55.1 kPa). Equations for the least-squares regression straight lines: v_{eo} (A): $y = 0.003x + 0.1135$ ($R^2 = 0.99$) (in classical CE arrangement); v_{hydro} (B): $y = 0.0011x + 0.187$ ($R^2 = 0.99$) (in CE-MS arrangement); v_{app} (C): $y = 0.0004x + 0.1032$ ($R^2 = 0.99$) (in classical CE arrangement) and (D): $y = 0.0012x + 0.0671$ ($R^2 = 0.99$) (in CE-MS arrangement).

It should be reminded that, with the apparatus employed in this study, about 90% of the capillary length was inserted in the cassette in the classical CE arrangement, as compared to only 45% (for a 1 m long capillary) in the CE-MS arrangement. The results indicate that at ambient temperature (25°C), the overall hydrodynamic flow velocity v_{hydro} in the CE-MS arrangement is higher than v_{eo} in CE arrangement, and corresponds to the sole electroosmotic contribution (as measured in classical CE arrangement) at a cassette temperature of 32°C. This result demonstrates that at ambient temperature, the mean temperature inside the separation capillary should not exceed 32°C. Above 37°C, the tendency is reversed, as a larger part of the capillary is thermostated in the classical CE arrangement than in CE-MS arrangement. Thus, the flow rates of NG and SL play an important part in the temperature

gradient along the separation capillary, which in turn influences the overall hydrodynamic velocity

3.4 Fluid emerging from the separation capillary

As the coaxial SL interface design implies three concentric tubes and thus three fluids (NG, SL and BGE), the overall hydrodynamic flow velocity of the BGE should also be considered as a possible parameter in this study. Apart from the suction contribution, two parameters influencing the overall hydrodynamic flow can be varied: voltage allowing for electroosmotic contribution, and pressure at the capillary inlet allowing for the purely hydrodynamic contribution. As v_{suction} can be easily calculated when only pressure is applied ($v_{\text{eo}} = 0$, Eq. 1), this parameter was first considered. According to the previous results, the temperature in the separation capillary can be estimated in the 25–32°C range. The hydrodynamic contribution $v_{\Delta P}$ at 32°C was measured in the same way as for a temperature of 25°C and the results obtained were again in agreement with the values calculated using the Hagen–Poiseuille equation (with the viscosity value for water at 32°C). At constant NG and SL flow velocities, the variation of v_{hydro} as a function of the pressure applied at the capillary inlet is presented in Fig. 5 (curve A) and the $v_{\Delta P}$ contribution is also displayed for the two limiting temperatures (curves D and E). The v_{suction} contribution calculated from Eq. (1) was then estimated as being comprised in the hatched domain delimited by curves B and C.

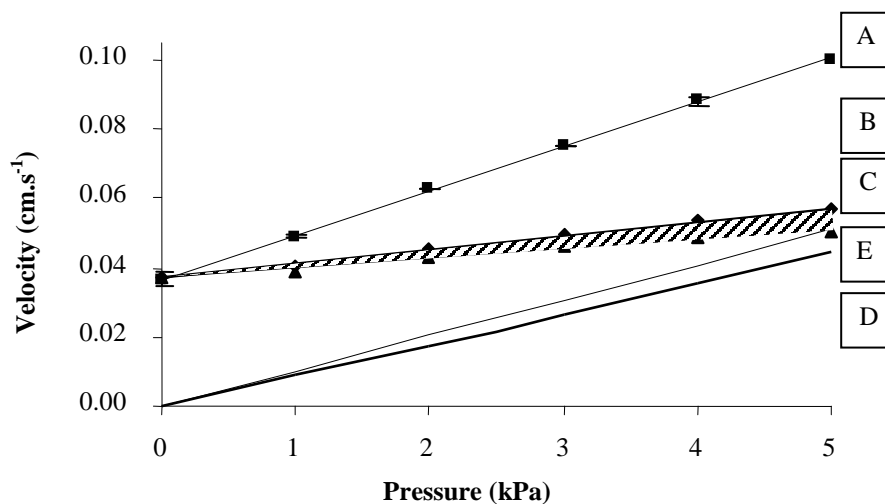


Figure 5. Influence of the pressure applied at the inlet of the separation capillary on the overall hydrodynamic flow velocity (A, experimental) and flow velocity due to suction effect (B and C, calculated from Eq.1) under CE-MS arrangement. Theoretical variation of $v_{\Delta P}$ at 25°C (D, $y = 0.0089x$) and 32°C (E, $y = 0.0102x$) according to Hagen-Poiseuille law. CE and MS conditions: see Fig. 2 except for applied voltage (0 kV), applied pressure at the inlet of

the separation capillary (1 to 5 kPa) and NG pressure (55.1 kPa). Equations for the least-squares regression straight lines: v_{hydro} (A): $y = 0.0128x + 0.0367$ ($R^2 = 0.99$). v_{suction} (25°C) (B): $y = 0.0041x + 0.0367$ ($R^2 = 0.99$). v_{suction} (32°C) (C): $y = 0.0028x + 0.0367$ ($R^2 = 0.99$).

It appears that suction effect slightly increases with pressure, which demonstrates that the suction effect should be identified as a phenomenon depending on the respective velocities of the three fluids. When applying a 5 kPa pressure at the inlet of the separation capillary (zero voltage) and a 6 $\mu\text{L}/\text{min}$ SL flow, the suction effect increases almost linearly with NG flow (Fig. 6, $v_{\Delta P}$ calculated at 32°C).

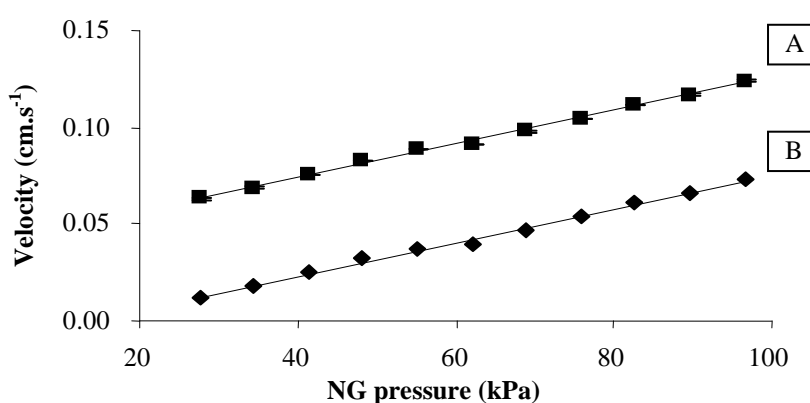


Figure 6. Influence of NG pressure on overall hydrodynamic flow velocity (A, experimental) and flow velocity due to suction effect (B, calculated from Eq.1 using $v_{\Delta P}$ at 32°C) under CE-MS arrangement and pressure application at the inlet of the separation capillary. CE and MS conditions: see Fig. 2 except for applied voltage (0 kV) and applied pressure at the inlet of the separation capillary (5 kPa). Equations for the least-squares regression straight lines: v_{hydro} (A): $y = 0.0009x + 0.0395$ ($R^2 = 0.99$); v_{suction} (B): $y = 0.0009x - 0.0113$ ($R^2 = 0.99$).

On extrapolating this curve to zero NG flow, a zero suction velocity was obtained within the range of experimental errors, which demonstrates that the NG is an essential parameter for suction, *i.e.* SL cannot produce any suction without the presence of NG.

In the same manner, the SL flow was varied (1–10 $\mu\text{L}/\text{min}$) for different NG pressures under constant applied pressure at the inlet of the separation capillary and in the absence of voltage applied. Figure 7 indicates that for NG pressure lower than about 50 kPa, the flow velocity due to suction effect, v_{suction} , remains almost independent of the SL flow rate. Above this value of pressure, v_{suction} tends to decrease upon increasing SL flow rate.

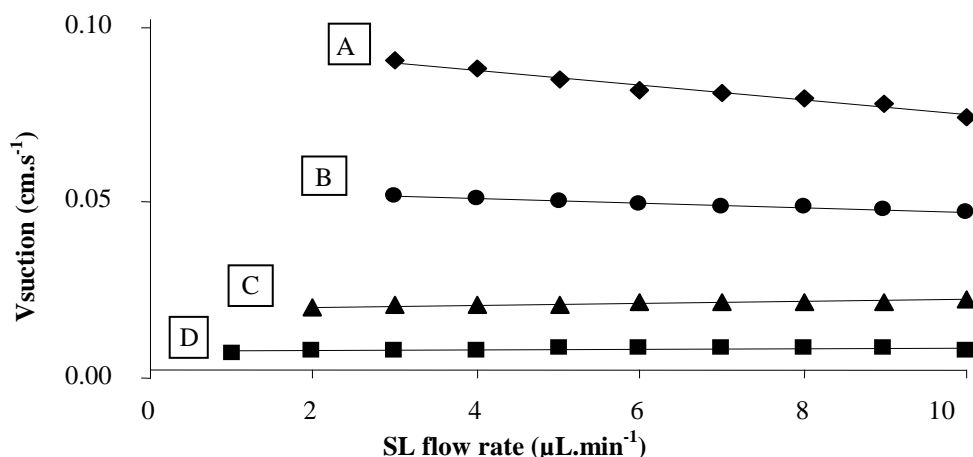


Figure 7. Influence of SL flow rate on the flow velocity due to suction effect (v_{suction} , calculated from Eq.1 under CE-MS arrangement and pressure application at the inlet of the separation capillary, for different NG pressures: (A): 96.5 kPa; (B): 55.1 kPa; (C): 34.1 kPa; (D): 0 kPa. CE and MS conditions: see Fig. 2 except for applied voltage (0 kV), applied pressure at the inlet of the separation capillary (5 kPa), NG pressure (as specified above) and SL flow rate (1 to 10 $\mu\text{L}/\text{min}$). Equations for the least-squares regression straight lines: (A): $y = -0.0021x + 0.0941$ ($R^2 = 0.97$); (B): $y = -0.0006x + 0.0516$ ($R^2 = 0.98$); (C): $y = 0.0002x + 0.0179$ ($R^2 = 0.96$); (D): $y = 9 \cdot 10^{-5}x + 0.0055$ ($R^2 = 0.43$).

Furthermore, this figure confirms that suction effect increases with NG flow rate. However, the evolution of the curves for different NG pressures seems to indicate that opposite phenomena took place according to the respective velocities. It is worth noticing that an SL flow rate around 6 $\mu\text{L}/\text{min}$, is about 20 times higher than the BGE flow rate inside the separation capillary. The two fluids (NG and SL) merging at the outlet of the separation capillary lead to the formation of the Taylor cone, where electronebulization occurs. Its geometry may depend on the respective velocities of the fluids, influencing the suction effect differently. Above a certain NG flow, the added SL flow may increase the cone angle (thus shortening the cone length), producing a lower area for the gas-liquid interface, and thus may reduce the suction effect.

The influence of voltage and pressure applied at the inlet of the separation capillary was then studied separately at constant NG (55 kPa) and SL (6 $\mu\text{L}/\text{min}$) flow rates, and the flow velocity due to suction effect was again calculated from Eq. (2) (Fig. 8). By applying a pressure in the 1 to 5 kPa range, $v_{\Delta P}$ varies from 0.0089 to 0.044 cm/s (Fig. 8A), introducing a parabolic contribution to the velocity profile. By applying a voltage in the 5 to 30 kV range, v_{eo} varies from 0.03 to 0.20 cm/s, with an intrinsically flat profile (Fig. 8B). From these data, it appears that for a given value of v_{hydro} , the suction effect is higher when a pressure is

applied. These unexpected results may be explained by differences in the velocity profiles of the fluid emerging from the separation capillary, which may have an impact on the width and depth of the Taylor cone. A flatter profile may be associated with a shorter Taylor cone, which may again lower the suction effect. The same evolution still occurred when both pressure and voltage were applied (Fig. 8C): at the same voltage, the addition of a pressure increased v_{suction} drastically, keeping in mind that suction effect itself should enhance the parabolic character of the velocity profile.

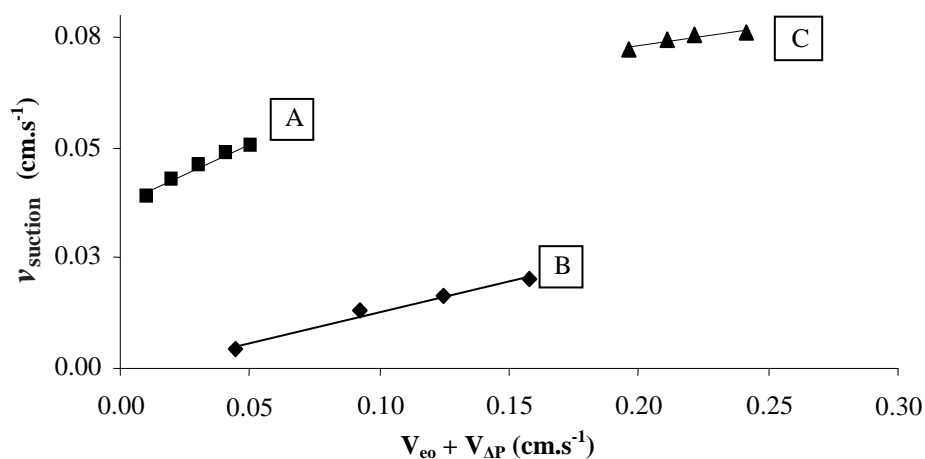


Figure 8. Influence on the flow velocity due to suction effect (v_{suction} , calculated from Eq.1) of the respective contributions of pressure and voltage applications to the overall BGE velocity under CE-MS arrangement. CE and MS conditions: see Fig. 2 except for NG pressure (55.1 kPa), and (A) applied pressure at the inlet of the separation capillary (1 to 5 kPa) and applied voltage (0 kV) ; (B) applied pressure (0 kPa) and applied voltage (5 to 30 kV) and (C) applied pressure (1 to 5 kPa) and applied voltage (30 kV). Equations for the least-squares regression straight lines: v_{suction} : (A) $y = 0.2755x + 0.037$ ($R^2 = 0.98$); (B) $y = 0.1416x - 0.0013$ ($R^2 = 0.98$); (C) $y = 0.0869x + 0.0557$ ($R^2 = 0.93$).

4- Concluding remarks

A deeper study, into suction effect appearing with the coaxial sheath flow ESI interface when coupling CE to MS was performed. This effect is not only dependent on the NG flow rate and DG temperature, as previously described in literature, but also on the capillary protrusion from the interface needle, SL and overall BGE flow. Suction effect originates from the mixing of the three fluids involved at the separation capillary outlet (*i.e.* NG, SL and BGE), and depends on the respective velocities of each of them. Whereas NG flow rate is the parameter affecting suction to a greater extent, SL flow rate, separation

capillary protruding length and overall BGE flow have a significant additional impact on this phenomenon. It is shown that SL flow rate can affect suction differently according to the NG velocity, which may be explained by modification of the Taylor cone geometry. Suction effect is also noticeably favoured by a parabolic velocity profile of the BGE, which may equally alter the shape of the Taylor cone.

5- References

- [1] Olivares, J. A., Nguyen, N. T., Yonker, C. R., Smith, R. D., *Anal. Chem.* 1987, 59, 1230–1232.
- [2] Smith, R. D., Olivares, J. A., Nguyen, N. T., Udseth, H. R., *Anal. Chem.* 1988, 60, 436–441.
- [3] Smith, R. D., Barinaga, C. J., Udseth, H. R., *Anal. Chem.* 1988, 60, 1948–1952.
- [4] Smyth, W. F., Rodriguez, V., *J. Chromatogr. A* 2007, 1159, 159–174.
- [5] Tanaka, Y., Otsuka, K., Terabe, S., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003, 30, 1889–1895.
- [6] Mol, R., de Jong, G. J., Somsen, G.W., *Electrophoresis* 2005, 26, 146–154.
- [7] Huck, C. W., Bakry, R., Huber, L. A., Bonn, G. K., *Electrophoresis* 2006, 27, 2063–2074.
- [8] Alvarez-Llamas, G., Fernandez de la Campa, M. R., Sanz-Medel, A., *Trends Anal. Chem.* 2005, 24, 28–36.
- [9] Moseley, M. A., Deterding, L. J., de Wit, J. S. M., Tomer, K. B. *et al.*, *Anal. Chem.* 1989, 61, 1577–1584.
- [10] Mack, L. L., Kralik, P., Rhonde, A., Dole, M., *J. Chem. Phys.* 1970, 52, 4977.
- [11] Whitehouse, C. M., Dreyer, R. N., Yamashita, M., Fenn, J. B., *Anal. Chem.* 1985, 57, 675–679.
- [12] Smyth, W. F., *Electrophoresis* 2005, 26, 1334–1357.
- [13] Lee, E. D., Mück, W., Henion, J. D., Covey, T. R., *J. Chromatogr.* 1988, 458, 313–321.
- [14] Shamsi, S. A., Miller, B. E., *Electrophoresis* 2004, 25, 3927 – 3961.
- [15] Kirby, D. P., Thorne, J. M., Götzinger, W. K., Karger, B. L., *Anal. Chem.* 1996, 68, 4451–4457.
- [16] Henion, J. D., Mordehai, A. V., Jianyi, C., *Anal. Chem.* 1994, 66, 2103–2109.
- [17] Varesio, E., Cherkaoui, S., Veuthey, J. L., *J. High Resolut. Chromatogr.* 1998, 21, 653–657.
- [18] Nielen, M., *J. Chromatogr. A* 1995, 712, 269–284.
- [19] Zheng, J., Jann, M. W., Hon, Y. Y., Shamsi, S. A., *Electrophoresis* 2004, 25, 2033–2043.
- [20] Huikko, K., Kotiaho, T., Kostianen, R., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2002, 16, 1562–1568.
- [21] Mokaddem, M., Varenne, A., Belgaied, J. E., Factor, C., Gareil, P., *Electrophoresis* 2007, 28, 3070–3077.
- [22] Ding, J., Vouros, P., *Anal. Chem.* 1999, 71, 378A–385A.

- [23] Tetler, L.W., Cooper, P. A., Powell, B., *J. Chromatogr. A* 1995, 700, 21–26.
- [24] Wetterhall, M., Nilsson, S., Markides, K. E., Bergquist, J., *Anal. Chem.* 2002, 74, 239–245.
- [25] Cole, R. B. *Electrospray Ionization Mass Spectrometry – Fundamentals, Instrumentation and Applications*, John Wiley and Sons, New York 1997.
- [26] Ikonomou, M. G., Blades, A. T., Kebarle, P., *Anal. Chem.* 1991, 63, 1989–1998.
- [27] Van Berkel, G. J., Zhou, F., *Anal. Chem.* 1995, 67, 2916–2023.
- [28] Schmitt-Kopplin, P., Frommberger, M., *Electrophoresis* 2003, 24, 3837–3867.
- [29] Banks, J. F., *Electrophoresis* 1997, 18, 2255–2266.
- [30] Schmitt-Kopplin, P., Frommberger, M., *Electrophoresis* 2003, 24, 3837–3867.
- [31] Stutz, H., *Electrophoresis* 2005, 26, 1254–1290.
- [32] Constantopoulos, T. L., Jackson, G. S., Enke, C. G., *Anal. Chim. Acta* 2000, 406, 37–52.
- [33] Labowsky, M., Fenn, J. B., de la Mora, J. F., *Anal. Chim. Acta* 2000, 406, 105–118.
- [34] Foret, F., Thompson, T. J., Vouros, P., Karger, B. L. *et al.*, *Anal. Chem.* 1994, 66, 4450–4458.
- [35] Ohnesorge, J., Sängler-van de Griend, C., Wätzig, H., *Electrophoresis* 2005, 26, 2360–2375.
- [36] Geiser, L., Rudaz, S., Veuthey, J. L., *Electrophoresis* 2003, 24, 3049–3056.
- [37] Nunez, O., Moyano, E., Galceran, M. T., *J. Chromatogr. A* 2002, 974, 243–255.
- [38] Sanz-Nebot, V., Benavente, F., Balaguer, E., Barbosa, J., *Electrophoresis* 2003, 24, 883–891.
- [39] Nilsson, S. L., Bylund, D., Jörnten-Karlsson, M., Petersson, P., Markides, K. E., *Electrophoresis* 2004, 25, 2100–2107.
- [40] Mol, R., Servais, A. C., Fillet, M., Crommen, J. *et al.*, *J. Chromatogr. A* 2007, 1159, 51–57.

C- Article : Partie II

A new insight into suction and dilution effects in capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry *via* an electrospray ionization interface. Part II- Dilution effect

Meriem Mokaddem¹, Pierre Gareil¹, Jamel-Eddine Belgaied², Anne Varenne¹

Electrophoresis (soumis)

¹ Laboratory of Electrochemistry and Analytical Chemistry, UMR 7575 CNRS-ENSCP-Paris 6, Paris, France

² Laboratory of Analytical Chemistry and Electrochemistry, (04UR12-01) INSAT, B.P. 676, Tunisie, France

Keywords: nebulizing gas, sheath liquid, dilution factor, drying gas, Taylor cone geometry

Non-standard abbreviations: **DG:** drying gas; **NG:** nebulizing gas; **SL:** sheath liquid.

Abstract

The hyphenation of capillary electrophoresis (CE) with mass spectrometry (MS) is nowadays accepted as a powerful analytical approach. As far as electrospray ionization (ESI), the most common interface, is concerned, one challenge is to provide the most sensitive as well as quantitative information, which is quite a difficult task, as it is linked, among other factors, to suction and dilution effects. In the coaxial ESI configuration, it has been previously demonstrated that suction effect depends on many parameters inherent to the ESI interface geometry, the prevailing ones being the CE capillary protrusion from the interface needle, the sheath liquid (SL) and the overall BGE flow rates and velocity profile. In this paper, dilution effect is studied, as the CE electrolyte is mixed with SL at the interface. Considering peak intensity and efficiency, this effect was studied as a function of the various parameters of the interface (capillary protrusion from the SL tube, nebulizing gas (NG), SL and CE electrolyte flow rates) or of the source (skimmer and ESI voltages, drying gas (DG) flow rate and temperature). It appears that the dilution effect seems slightly lower than what can be anticipated from the proportions of the liquid flow rates. This study also indicates that suction effect has to be considered first to better understand the dilution phenomenon, as suction effect leads to an increase in peak intensity, before a dilution effect appears.

1- Introduction

The hyphenation of capillary electrophoresis (CE) with mass spectrometry (MS) (CEMS) is nowadays accepted as a multidimensional analytical approach, complementary and / or competitive to chromatographic MS-hyphenated separation techniques, and emerging as an essential analytical tool in the fields of life, environmental and forensic sciences. CE-MS combines the advantage of both techniques so that qualitative (migration times) and quantitative (peak areas) information, in combination with molecular masses and/or fragmentation patterns can be obtained in a single run. On one side, CE is a very attractive separation method because of its low sample consumption, short analysis time, high separation efficiency, ease of operation and automation, and that it is free of stationary phase, which is adequate for interaction studies. On the other side, MS is a well established universal detection technique allowing not only the detection of virtually any analyte, but also providing structural information for unequivocal analyte identification. The combination of CE to MS detection dates back to two decades, when Smith and coworkers introduced the first operating interface [1-3]. The interface device must provide robustness, stability, sensitivity and maintain separation efficiency. Various CE-MS interfaces for several types of ionization sources have been developed, namely electrospray ionization (ESI) [4], atmospheric pressure chemical ionization (APCI) [5], atmospheric pressure photochemical ionization (APPI) [6,7] matrix-assisted laser-desorption ionization (MALDI) [8], inductively coupled plasma (ICP) [9] and fast-atom bombardment (FAB) [10] ionizations. ESI, developed by Dole et al [11] and Fenn et al [12] serves as the most common interface as it is the softest ionization technique. It is considered as the ideal technique for on-line interfacing of CE to MS, because it facilitates the transfer of analytes from the liquid phase of the CE to the gas phase of the MS, producing ions directly from liquids at atmospheric pressure, with high abundance for a wide range of analytes. ESI allows the detection of high molecular mass species: by generating ions with multiple charges, even species with high M_r will fall within the limited m/z detection range of most MS analyzers. Three ESI interface designs have been developed in the last 20 years for coupling CE with MS [13-15]: (1) the sheathless interface, wherein the separation capillary is connected directly to an electrospray emitter, (2) the liquid-junction interface, made of a small liquid-filled gap between the separation capillary and an ESI emitter and (3) the triple coaxial sheath flow interface, consisting in enclosing the end of the separation capillary with another capillary through which flows a constant supply

of sheath liquid. Coaxial sheath flow interface is to date the most frequently used coupling device, employing three concentric capillaries [16-19].

In a previous study [20], a deeper insight into suction effect appearing with the coaxial sheath flow ESI interface when coupling CE to MS was provided. This effect was demonstrated to be dependent on capillary protrusion from the interface needle, drying gas temperature, temperature gradient created by the contact between the heated NG and the separation capillary inside the interface needle, and nebulizing gas, sheath liquid and BGE flow rates. Suction effect originates from the mixing of the three fluids involved at the separation capillary outlet (i.e. nebulizing gas, sheath liquid and separation BGE), and depends on (1) the respective velocities of each of them and (2) the velocity profile of the BGE (either flat or parabolic, according to whether separation voltage or pressure is applied, respectively), that could modify the Taylor cone geometry. In this paper, the study is focused on the dilution effect resulting from the mixing of the three fluids at the ESI interface needle and consequently from the suction effect as well. This effect, that has been briefly noted [21] can have major consequences on detection sensitivity in CE-ESI-MS configuration.

2- Materials and methods

2.1 Chemicals

Ammonium formate, benzoic acid (BA), triethylamine, and formamide were purchased from Sigma-Aldrich-Fluka (Saint-Quentin Fallavier, France), sodium hydroxide and HPLC-grade methanol from Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France) and ammonia from Merck (Darmstadt, Germany). The analyte solutions were prepared by dissolving benzoic acid at a concentration of *ca* 5 mM in water. Deionized water was obtained from an Alpha-Q system (Millipore, Saint- Quentin-en-Yvelines, France). The BGE was composed of 30 mM ammonium formate and 142.5 mM ammonia, pH 10.0 (ionic strength, 30 mM). Electrolytes were filtered through 0.2 μm PVDF membrane filters (Pall Life Sciences, MI, USA) before use.

2.2 CE-UV experiments

CE was performed with an HP³DCE instrument (Agilent Technologies, Massy, France) equipped with a UV absorbance DAD. Separations were realized in 50 μm id (360 μm od) x 100 cm (20 cm effective length) bare fused-silica capillaries (Photonlines, Marly-le-Roi, France). Formamide (0.1% v/v in the BGE) was used as neutral marker to determine EOF. Analytes were hydrodynamically injected (5 kPa, 2 s) and separation voltage was varied from 5 to 30 kV in positive polarity, according to experiments. New capillaries were conditioned by successive flushes with 1 M and 0.1 M NaOH and then with water under a pressure of 93.5 kPa for 15 min each. The temperature in the capillary cassette was set at 25°C. The acquisition rate was 10 points/s. Analytes were detected by UV absorbance at 200 nm. Between runs, capillaries were rinsed with the BGE for 3 min. Capillaries were rinsed with water and dried by air when not in use.

2.3 MS detection

An Agilent Series 1100 MSD single quadrupole mass spectrometer (Agilent Technologies, Massy, France) equipped with an orthogonal ESI source was used in the negative ionization mode. Nitrogen was used as NG at a temperature of 100°C (pressure in the 0 to 100 kPa range) and as DG at 300°C (flow rate in the 0 to 8 L.min⁻¹ range). ESI voltage was varied in the 1500 to 4000 V range. Skimmer voltage was in the 10 to 150 V range. Peak width and dwell time were set to 0.3 min and 880 ms, respectively. BA was detected in single ion monitoring (SIM) mode at m/z 121.3. The sheath liquid (50:50 v/v MeOH-H₂O mixture containing 0.01% v/v triethylamine) was delivered by an Agilent 1100 series isocratic HPLC pump (flow rate in the 0 - 10 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ range).

2.4 CE-MS experiments

The MS conditions were those described in Section 2.3. CE-MS coupling was carried out using a SL coaxial ESI interface (Agilent Technologies). CE-MS experiments were realized in 50 μm id (360 μm od) x 100 cm (20 cm effective length to UV detector and 100 cm effective length to MS detector) bare fused-silica capillaries (Photonlines). Glucose (5 mM in water) and formamide (0.1% v/v in the glucose solution) were used as neutral markers to determine EOF in MS and UV detection, respectively.

3- Results and discussion

In the coaxial sheath flow ESI interface, the innermost capillary, used for the electrophoretic separation is inserted into the atmospheric region of the ESI source and is surrounded by a metal tube of a larger diameter in a coaxial arrangement, through which the SL is introduced and mixes with the BGE directly in the Taylor cone [22-24]. This arrangement is surrounded by a third tube through which the NG is pumped, which assists in spray formation [25] and scavenges free electrons to prevent corona discharge [26, 27]. In this ESI interface configuration, a suction effect appears that causes a hydrodynamic flow inside the separation capillary in the direction of its outlet. Suction effect originates from the mixing of the three fluids involved at the separation capillary outlet (i.e. nebulizing gas, sheath liquid and BGE). It was previously demonstrated that several parameters were involved, that modulated this suction effect [20] : separation capillary protruding length from the interface needle, drying gas temperature, temperature gradient created by the contact between the heated NG and the separation capillary inside the interface needle, and nebulizing gas, sheath liquid and overall BGE flow rates. Whereas NG flow rate is the parameter affecting suction to a greater extent, SL and overall BGE flow rate have a significant additional impact on this phenomenon. According to the respective velocities of the three fluids, a modification of the Taylor cone geometry was supposed to occur, influencing suction effect. Suction effect is also noticeably favored by a parabolic velocity profile of the BGE, which may equally alter the shape of the Taylor cone. Finally, the temperature gradient created by the contact between the heated NG and the separation capillary inside the interface needle enhances this effect [20].

Another consequence of the mixing of the three fluids at the ESI interface needle is the sample dilution effect, as overall BGE flow rate is lower (100 to 500 nL.min⁻¹ range) than SL (1 to 5 μL.min⁻¹ range). Furthermore, in the CE-ESI-MS coupling employed in this study, ESI voltage is on during sampling (either hydrodynamic or electrokinetic injection). As suction effect leads to a higher overall BGE flow rate than the one due to solely voltage and/or pressure application at the separation capillary, it implies that a higher quantity of sample is injected compared to the quantity injected in a classical CE arrangement, the other conditions being similar. As suction effect induces a parabolic BGE flow profile, the separation efficiency diminishes when suction effect increases. In this context, the different parameters that potentially act on suction effect were examined again to better understand their impact on dilution. This study was performed with benzoic acid (BA) as charged analyte, formamide

(FA) as neutral marker for UV detection and glucose (Gl) as neutral marker for MS detection in negative mode. Dilution effect was studied for hydrodynamically injected BA, by determining its UV and MS peak intensities (I_{UV} and I_{MS} , respectively) and efficiencies (N_{UV} and N_{MS} , respectively). Each experiment was performed three times. Unless otherwise specified, the separation and detection conditions were as following: NG pressure set at 55 kPa, SL flow rate at $6 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, and separation voltage at 30 kV. For each study, a comparison of the evolution of linear velocity due to suction effect demonstrated in the previous paper for various parameters [20] was performed. The overall BGE flow rate was calculated from FA velocity ; SL and NG flow rates were set by the software. The ratio between I_{MS} and I_{UV} allows to eliminate the influence of suction and thus represents the concentration modification after passing the interface, due to dilution and ionization/desorption effects. Thus I_{MS}/I_{UV} was drawn as a function of F_{BGE}/F_{SL} , the overall BGE flow rate to the SL flow rate ratio, that represents the theoretical dilution factor. It has to be noticed that the optimum experimental conditions described in this work are specific of the chemical properties of the studied molecule (BA), but the observed trends can be expected for all types of compounds analyzed by CE-ESI-MS. SIM spectra were used as it is possible to achieve better precision and accuracy in ion-intensity measurement compared to the scan spectra [28]. Dilution effect was studied as a function of the various parameters of the interface (capillary protrusion from the SL tube, NG, SL and CE electrolyte flow rates) or of the source (skimmer and ESI voltages, DG flow rate and temperature).

3.1 Skimmer and ESI voltages:

In the 10 to 150 V skimmer voltage range, I_{UV} and N_{UV} remained quite stable, as skimmer voltage does not influence suction effect [20]. On the other hand, I_{MS} presents a maximum at 75 V that can be explained by the fact that while increasing skimmer voltage, ionization in the source is favored, whereas at higher values, fragmentation can also occur, inducing a loss of sensitivity. This general evolution was already described by Huikko et al [29]. N_{MS} presents a slight minimum at 75 V. When ESI voltage was varied between 1500 and 4000 V, I_{UV} presents a very slight maximum at 3500 V (corresponding to an increase of around 5 %) along with a quite stable N_{UV} , which is in agreement with a slight increase in v_{hydro} by about 5 % [20] Whereas no MS signal was detected for ESI voltage lower than 1500V, a deep increase in I_{MS} occurred (*ca* 13 times increase from 2000 to 4000 V), the general evolution of which

being in accordance with literature [30-32] This deep increase evidences the strong influence of ESI voltage on ionization/desorption. N_{MS} presents a maximum at 3000 V (value doubled from 2000 to 3000 V), which indicates that suction is not the single phenomenon influencing efficiency.

3.2 Drying gas temperature and flow rate

In the 0 to 8 L.min⁻¹ DG flow rate range, I_{UV} and N_{UV} remained constant whereas I_{MS} drastically increased from 0 to 3 L.min⁻¹ and then stayed at a constant value. In effect, it was previously shown that suction effect remained constant whatever the DG flow rate [20], which explains the constancy of I_{UV} and N_{UV} . As the drying gas is introduced at the entrance of the transfer capillary to complete analyte transfer into the gas phase, increasing its flow rate increases the ionization efficiency. Above 3 L.min⁻¹, this effect seems to level-off. It has to be noted that N_{MS} presents a minimum for 3 L.min⁻¹. When varying the DG temperature from 100 to 350°C, it appears that I_{UV} increases and N_{UV} decreases, which is consistent with the increase in suction effect with this temperature [20]. Concerning I_{MS} , no signal appears for a temperature below 200°C, as described previously. Above 200°C, a deep increase in I_{MS} appears as compared to I_{UV} with a maximum for 300°C, (whereas N_{MS} presents a minimum at 300°C). This tendency was already observed [32]. Especially, upon varying temperature from 250°C to 300°C, an increase in I_{UV} by 8% and in I_{MS} by 180% occurs, that can be mainly explained by an increase in ionization efficiency.

3-3 Capillary position at the interface outlet

As for the protrusion of the CE capillary from the SL tube, the response signals were studied as a function of the protruding length (“a” value), which was set via a micrometric screw in the 0 to 0,4 mm range. As previously explained [20], an increase in protruding length could induce an increased anticipated partial evaporation of SL, leading to both (1) a decrease in suction effect (that could lead to a decrease in I_{UV} and I_{MS}) and (2) an increase in ionization efficiency (inducing an increase in I_{MS}). I_{UV} presents a non significant minimum at a distance of 0.15 mm while N_{MS} does not significantly vary. On the other hand, I_{MS} presents a maximum for a distance of 0.2 mm. The non monotonous variation of I_{MS} , which was already

reported by Para et al [33], emphasizes the effects of both ionization/desorption efficiency, which prevails for a values lower than 0.2 mm, and of suction effect, which prevails for a values higher than 0.2 mm. Figure 1 represents the influence of F_{BGE}/F_{SL} on I_{MS}/I_{UV} ratio, where F_{BGE}/F_{SL} depends on a value as indicated on the graph. A maximum appears at $a = 0.2$ mm : below this value, ionization/desorption is increasing with increasing a value; above 0.2 mm and for increasing a values, a perturbation of the Taylor cone can explain the diminution.

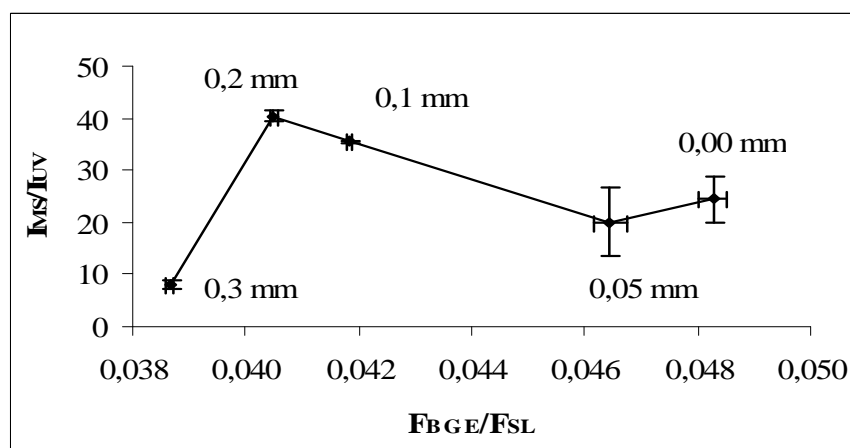


Figure 1. Variation of I_{MS}/I_{UV} in terms of theoretical dilution factor (F_{BGE}/F_{SL}) : influence of capillary protruding length from the SL tube.

CE conditions : bare-fused silica capillary, 50 μm id x 100 cm. BGE : 30 mM ammonium formate and 142,5 mM ammonia, pH 10.0 (ionic strength, 30 mM). Applied voltage, 30 kV. Cassette temperature, 25°C. Hydrodynamic injection, 5 kPa, 2s. MS conditions : SL, water-methanol (1:1, v/v) with 0.01% (v/v) triethylamine; flow rate, 6 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. NG, nitrogen (100°C); pressure, 55 kPa. DG, nitrogen (350°C, 7 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$). Negative ionization mode. ESI voltage : 3500 V. Skimmer voltage, 10V. Continuous lines are just a guide for the eyes.

3.4 Sheath liquid flow rate: dilution effect?

While keeping NG pressure to 55 kPa, Figure 2 presents the evolution of I_{UV} and I_{MS} according to SL flow rate. An increase in I_{UV} (curve A) appears when SL flow rate increases up to 8 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, followed by a levelling-off. On the other hand, I_{MS} (curve B) presents a maximum at around 7 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. For I_{MS} , a similar evolution was found by Bezy et al [34], without discussion of a possible suction effect during injection. Within the frame of this study, I_{UV} is only influenced by suction effect and I_{MS} by both suction, ionization/desorption efficiency and dilution effects. The increase in peak intensity in the first part of both curves is correlated to the increase in suction effect demonstrated previously [20]. The diminution of I_{MS} for the highest SL flow rates should mainly be attributed to dilution and

ionization/desorption effects that only appear when the sample passes the ESI interface, *i.e.* in the MS signal.

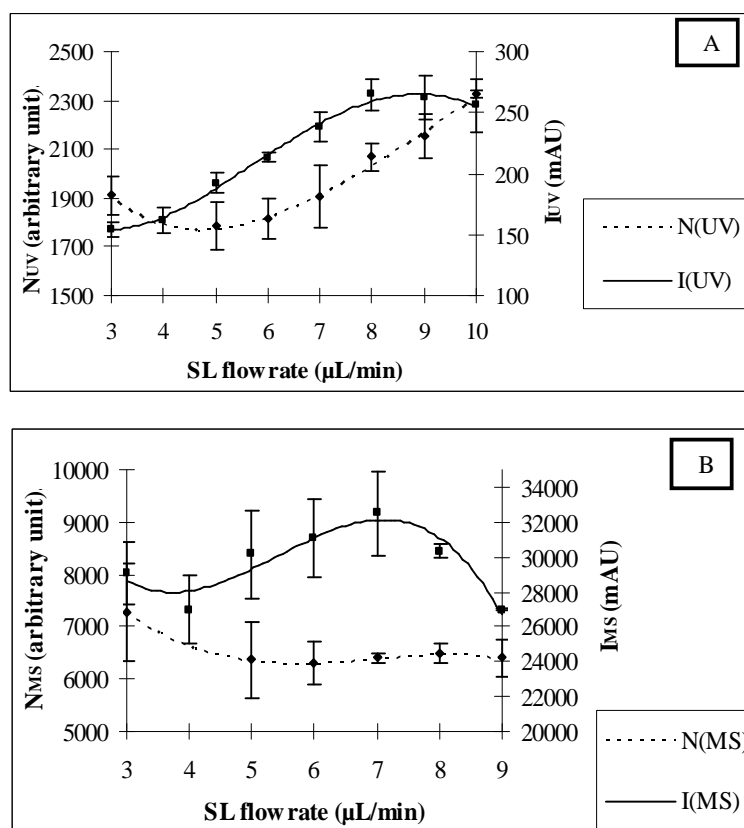


Figure 2. Influence of SL flow rate on (A) I_{UV} and N_{UV} , and (B) I_{MS} and N_{MS} . CE and MS conditions : see Fig. 1, except for SL flow rate (3 to 10 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$).

The ratio between I_{MS} and I_{UV} , that allows to eliminate the influence of suction, decreases when SL flow rate increases, indicating that this dilution effect occurs at all SL flow rates, even if its consequence is masked by the suction effect at the lowest SL flow rates. When plotting I_{MS}/I_{UV} in terms of F_{BGE}/F_{SL} , representing the theoretical dilution factor, (Figure 3), an almost linear increase for the lowest F_{BGE}/F_{SL} values appears (*i.e.* the highest SL flow rates) followed by a levelling-off : the first increasing zone indicates the region where dilution and ionization/desorption effects predominate over suction effect. Furthermore, when SL flow rate varies from 5 to 9 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, the ratio between overall BGE flow rate and SL flow rate (F_{BGE}/F_{SL}) diminishes by 40 % whereas I_{MS}/I_{UV} , which is influenced by both dilution effect and ionization/desorption efficiency, and thus expected to decrease by more than 40%, diminishes by only 34 %. This indicates that dilution effect is not directly proportional to the ratio of flow rates of the two fluids that mix in the interface, *i.e.* BGE and SL. Dilution effect seems to appear lower than expected.

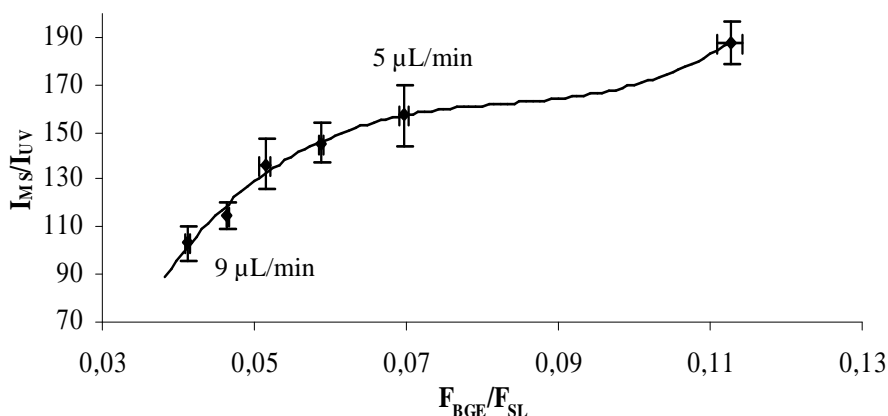


Figure 3. Variation of I_{MS}/I_{UV} in terms of theoretical dilution factor (F_{BGE}/F_{SL}) : influence of SL flow rate.
CE and MS conditions: see Fig. 2.

Furthermore, N_{UV} presents a minimum at $5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ and N_{MS} diminishes up to $6 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ and levels off afterwards. As suction should induce a decrease in efficiency due to the generation of a parabolic flow profile, the unexpected increase of N_{UV} above $5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ should be due to another phenomenon, such as possible temperature variation in the interface when SL flow rate varies, leading to different sample zone profiles. As for N_{MS} , its decrease up to a flow rate of $6 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ is explained by the increase in suction effect, whereas its levelling off may be explained by a modification of the Taylor cone geometry for the highest SL flow rates.

In the ESI configuration of this study, it appears that dilution effect should occur at all SL flow rates, but it is masked by suction effect at the lowest flow rates, and is not directly proportional, at the highest flow rates, to the ratio between the overall BGE and SL flow rates emerging at the ESI interface.

3-5 Nebulizing gas flow rate:

Keeping the SL flow rate at a constant value ($6 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$), the NG pressure was varied between 30 and 100 kPa. I_{UV} (Figure 4A) presents a linear increase up to a pressure of 96 kPa and then a slight decrease. I_{MS} (Figure 4B) presents a slight, followed by a steeper increase ending by a sharp maximum at around 97 kPa.

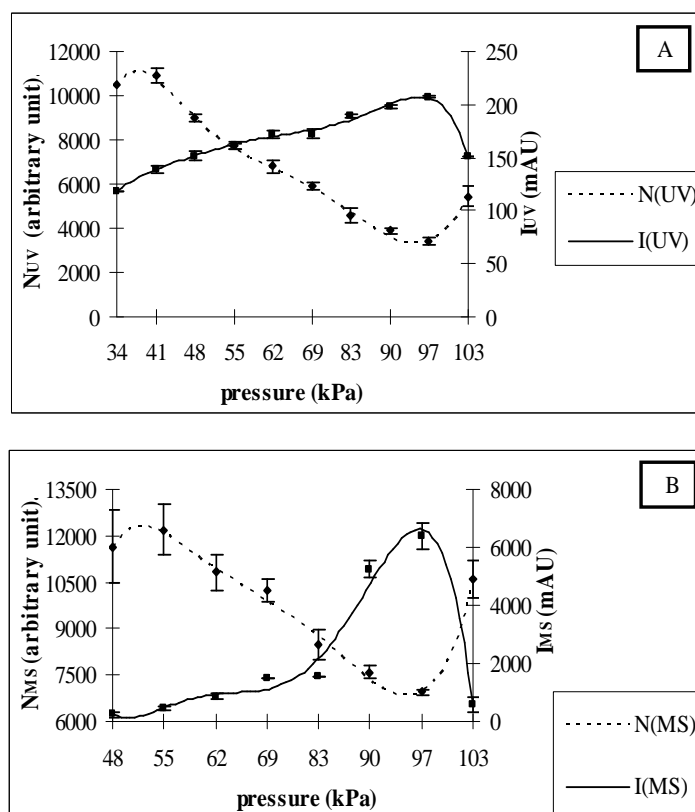


Figure 4. Influence of NG pressure on (A) I_{UV} and N_{UV} , and (B) I_{MS} and N_{MS} . CE and MS conditions : see Fig. 1, except for NG pressure (34 to 103 kPa).

The general evolution of both curves corresponds to the influence of NG flow rate on suction effect. The particularly drastic increase in I_{MS} can be due to an additional increase in ionization efficiency, while increasing NG flow rate.

Figure 5 represents the influence of F_{BGE}/F_{SL} on I_{MS}/I_{UV} ratio, where F_{BGE}/F_{SL} depends on NG pressure as indicated on the graph. It appears that dilution effect does not only explain I_{MS}/I_{UV} variation: in the 30 to 60 kPa range, F_{BGE}/F_{SL} increases by around 9 % whereas I_{MS}/I_{UV} is multiplied by a factor of 4 ; in the 60 to 90 kPa range, F_{BGE}/F_{SL} increases by 15 % whereas I_{MS}/I_{UV} is multiplied by a factor of 6. This tendency seems to indicate that an increase in NG flow rate does not much enhance dilution effect, but mainly helps for a better ionization/desorption efficiency.

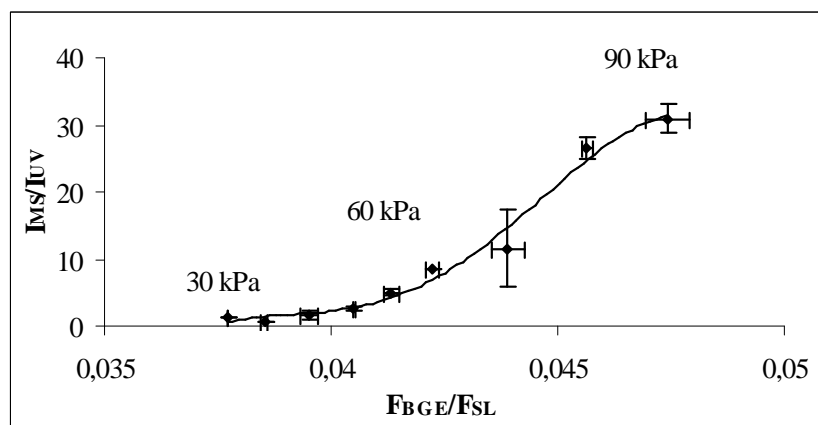


Figure 5. Variation of I_{MS}/I_{UV} as a function of theoretical dilution factor (F_{BGE} / F_{SL}): influence of NG pressure.

CE and MS conditions : see Fig. 4.

4- Concluding remarks

A deeper study into dilution effect appearing with the coaxial sheath flow ESI interface when coupling CE to MS was performed. This effect is due to the mixing, at the interface, of the BGE with the SL, in the presence of the NG, and is also related to the suction effect already studied [20]. Dilution effect was studied for hydrodynamically injected BA, by determining its UV peak intensity (I_{UV}) and its MS peak intensity (I_{MS}) in terms of various parameters, and by correlating their I_{MS}/I_{UV} ratio to the theoretical dilution factor. In the frame of this study, I_{UV} is only influenced by suction effect and I_{MS} by both suction, ionization/desorption and dilution effects, leading to a I_{MS}/I_{UV} ratio being independent of suction effect. Concerning the interface parameters that are skimmer voltage, ESI voltage and DG flow rate, I_{UV} remains quite constant whatever their value, meaning that suction effect is hardly modified. On the other hand, I_{MS} drastically varies, indicating the strong influence of these parameters on ionization/desorption efficiency. Concerning the fourth external parameter, DG temperature, both suction and ionization/desorption effects were evidenced. The dilution effect was then studied for the parameters involved at the interface, i.e. protrusion of the CE capillary from the SL tube and SL and NG flow rates. As for the protrusion of the CE capillary from the SL tube, combined effects of enhancement of ionization/desorption efficiency and of diminution of suction effect were demonstrated. Concerning SL flow rate,

suction and dilution appeared in the whole range experienced, but dilution tends to predominate over suction for the highest SL flow rates. Furthermore, the actual dilution effect is slightly lower than what can be anticipated from the F_{BGE}/F_{SL} ratio. On the other hand, an increase in NG flow rate did not enhance dilution effect, but helped for a better ionization/desorption efficiency.

5- References

- [1] Olivares, J. A., Nguyen, N. T., Yonker, C. R., Smith, R. D., *Anal. Chem.* 1987, 59, 1230–1232.
- [2] Smith, R. D., Olivares, J. A., Nguyen, N. T., Udseth, H. R., *Anal. Chem.* 1988, 60, 436–441.
- [3] Smith, R.D., Barinaga, C.J., Udseth, H.R., *Anal. Chem.* 1988, 60, 1948-1952.
- [4] Smyth, W.F., Rodriguez, V., *J. Chromatogr. A*, 2007, 1159, 159-174.
- [5] Tanaka, Y., Otsuka, K., Terabe, S., *J. Pharmac. Biomed. Analysis* 2003, 30, 1889-1895.
- [6] Mol, R., de Jong, G.J., Somsen, G.W., *Electrophoresis* 2005, 26, 146-154
- [7] Schappler, J., Guillarme, D.; Prat, J., Veuthey, J.L., Rudaz, S., *Electrophoresis* 2007, 28, 3078-3087.
- [8] Huck, C.W., Bakry, R. Huber, L.A., Bonn, G.K., *Electrophoresis* 2006, 27, 2063-2074.
- [9] Alvarez-Llamas, G., Fernandez de la Campa, M.R., Sanz-Medel, A., *TrAC* 2005, 24, 28-36.
- [10] Moseley, M.A., Deterding, L.J., de Wit, J.S.M., Tomer, K.B., Kennedy, R.T., Bragg, R.T., Jorgenson, J.W., *Anal. Chem.* 1989, 61, 1577-1584
- [11] Mack, L.L., Kralik, P., Rhonde, A., Dole, M., *J. Chem. Phys.* 1970, 52, 4977.
- [12] Whitehouse, C.M., Dreyer, R.N., Yamashita, M., Fenn, J.B., *Anal. Chem.* 1985, 57, 675.
- [13] Smyth, W.F., *Electrophoresis* 2005, 26, 1334-1357.
- [14] Lee, E.D., Mück, W., Henion, J.D., Covey, T.R., *J. Chromatogr.*, 1988, 458, 313-321.
- [15] Shamsi, S.A., Miller, B.E., *Electrophoresis* 2004, 25, 3927-3961.
- [16] Mokaddem, M., Varenne, A., Belgaied, J.E., Factor, C., Gareil, P., *Electrophoresis* 2007, 28, 3070-3077.
- [17] Ding, J., Vouros, P., *Anal. Chem.* 1999, 71, 378A-385A.
- [18] Tetler, L.W., Cooper, P.A., Powell, B., *J. Chromatogr. A* 1995, 700, 21-26.
- [19] Wetterhall, M., Nilsson, S., Markides, K.E., Bergquist, J., *Anal. Chem.* 2002, 74, 239-245.
- [20] Mokaddem, M., Gareil, P., Belgaied, J.E., Varenne, A., *Electrophoresis* 2008, 29, 1957-1964.
- [21] Cherkaoui, S., Veuthey, J.L., *Electrophoresis* 2002, 23, 442-448.
- [22] Cole, R.B. (Ed.) *Electrospray Ionization Mass Spectrometry – Fundamentals, Instrumentation and Applications*, John Wiley and Sons, New York, 1997.

- [23] Ikonomou, M.G., Blades, A.T., Kebarle, P., *Anal. Chem.* 1991, 63, 1989-1998.
- [24] Van Berkel, G.J., Zhou, F., *Anal. Chem.* 1995, 67, 2916-2023.
- [25] Schmitt-Kopplin P., Frommberger M., *Electrophoresis* 2003, 24, 3837-3867.
- [26] Huikko, K., Kotiaho, T., Kostianen, R., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2002, 16, 1562-1568.
- [27] Banks, J.F., *Electrophoresis* 1997, 18, 2255-2266.
- [28] Liu, R.H., Lin, D.L., Chang, W.T., Liu, C., Tsay, W.-I, Li, J.-H, Kuo, T.-L, *Anal. Chem.*, 2002, 74, 619A-626A.
- [29] Huikko, K., Kostianen, R., *J. Chromatogr. A*, 2000, 872, 289-298.
- [30] Duteil, S., Gareil, P., Girault, S., Mallet, A., Feve, C., Siret, L., *Rapid. Com. Mass Spectrom.*, 1999, 13, 1889-1898.
- [31] Vuorensola, K., Kokkonen, J., Siren, H., Ketola, R.A., *Electrophoresis*, 2001, 22, 4347-4354.
- [32] Castro-Puyana, M., Garcia-Ruiz, C., Cifuentes, A., Crego, A.L., Marina, M.L. *J. Chromatogr. A*, 2006, 1114; 170-177.
- [33] Para, B.C., Nunez, O., Moyano, E., Galceran, M.T., *Electrophoresis*, 2006, 27, 2225-2232.
- [34] Bezy, V., Chaimbault, P., Morin P., Unger, S.E., Bernard, M.C., Agrofoglio, L.A., *Electrophoresis*, 2006, 27, 2464-2476.

D- Conclusion

Une étude approfondie de l'effet de succion apparaissant avec une interface ESI à liquide additionnel coaxial dans un couplage électrophorèse capillaire – spectrométrie de masse a été réalisée. Cet effet est non seulement engendré par le débit de gaz nébulisant, comme cela avait déjà été décrit dans la littérature, mais également par d'autres paramètres (la position du capillaire au niveau de l'aiguille d'interface, les débits de liquide additionnel et d'électrolyte de séparation de CE). Cet effet de succion est généré par le mélangeage des trois fluides de l'interface à la pointe du capillaire (c'est-à-dire gaz nébulisant, liquide additionnel et électrolyte de séparation), et dépend des vitesses respectives de chacun d'eux. Il a été démontré au cours de cette étude que le débit du gaz nébulisant était le paramètre influant le plus sur l'effet de succion. Cependant, le débit de liquide additionnel, la position du capillaire de séparation et le flux d'électrolyte ont tout de même un impact, moins important, mais significatif sur ce phénomène. Il a également été démontré que le débit de liquide additionnel pouvait affecter différemment l'effet de succion en fonction du débit de gaz nébulisant, ce qui peut s'expliquer par la modification de la géométrie du cône de Taylor. L'effet de succion semble être également, sensiblement favorisé par un profil parabolique de vitesse de l'électrolyte dans le capillaire d'électrophorèse, ce qui peut aussi engendrer une modification de la forme du cône de Taylor.

Lors de la seconde partie, une étude approfondie sur l'effet de dilution a été réalisée. Cet effet est dû au mélange, à l'interface, entre l'électrolyte de séparation et le liquide additionnel, à des débits sensiblement différents, en présence de gaz nébulisant. Cet effet de dilution a été étudié, lors d'injections hydrodynamiques d'acide benzoïque, en fonction de différents paramètres. L'intensité des pics en détection UV (I_{UV}) a été déterminée, ainsi que celle des pics en détection MS (I_{MS}), et le rapport I_{MS}/I_{UV} a été corrélé en fonction du facteur théorique de dilution. Dans le cadre de cette étude, I_{UV} était uniquement influencé par l'effet de succion et I_{MS} influencé à la fois par les effets de succion, de dilution et d'efficacité d'ionisation/désorption. Le rapport I_{MS}/I_{UV} a donc été calculé afin de s'affranchir de l'effet de succion. Concernant les paramètres externes à l'interface, que sont les tensions de fragmentation et d'électrospray et le débit de gaz séchant, il s'est avéré qu'aucune influence n'a été notée sur I_{UV} , ce qui signifie que l'effet de succion n'a pas été affecté par ces derniers. D'autre part, I_{MS} a varié considérablement, ce qui indique la forte influence de ces paramètres

sur l'efficacité d'ionisation/désorption. Concernant le quatrième paramètre externe, qui est la température du gaz séchant, des effets de succion et d'efficacité d'ionisation/désorption ont été mis en évidence. L'effet de dilution a par la suite été étudié en fonction des paramètres associés à l'interface, c'est-à-dire la position du capillaire de CE à l'interface et les débits de liquide additionnel et de gaz nébulisant. En ce qui concerne la position du capillaire de CE, il a été démontré qu'il y avait des effets combinés entre l'augmentation de l'efficacité d'ionisation/désorption et la diminution de l'effet de succion. Concernant le débit de liquide additionnel, les effets de succion et de dilution ont été mis en évidence dans la gamme de débit étudiés, mais la dilution tend à prédominer sur la succion aux débits élevés de liquide additionnel. En outre, cet effet de dilution semble être légèrement inférieur à ce qui pouvait être prévu par le rapport théorique des débits d'électrolyte de séparation et de liquide additionnel (F_{BGE}/F_{SL}). D'autre part, l'augmentation du débit de gaz nébulisant n'a pas renforcé l'effet de dilution, mais a plutôt contribué à une amélioration de l'efficacité d'ionisation/désorption.

En bref, nous pouvons conclure que l'effet de succion est principalement influencé par la pression du gaz nébulisant, mais également de manière moins importante par la position du capillaire à l'interface et par les débits de liquide additionnel et d'électrolyte de séparation. En outre, il semble que l'effet de dilution ou du mélangeage des trois fluides à l'interface, est moins important que ce qu'on pouvait attendre. Il apparaît également que la géométrie du cône de Taylor est un paramètre important ayant une influence sur les effets de succion et de dilution. Cette géométrie semblerait dépendre principalement du profil et de la vitesse des fluides émergeant à l'interface.

E- Références

- [1] Olivares, J. A., Nguyen, N. T., Yonker, C. R., Smith, R. D., *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 1230 – 1232.
- [2] Smith, R. D., Olivares, J. A., Nguyen, N. T., Udseth, H. R., *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 436 – 441.
- [3] Smith, R. D., Barinaga, C. J., Udseth, H. R., *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 1948–1952.
- [4] Smyth, W. F., Rodriguez, V., *J. Chromatogr. A* **2007**, *1159*, 159–174.
- [5] Tanaka, Y., Otsuka, K., Terabe, S., *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, *30*, 1889–1895.
- [6] Mol, R., de Jong, G. J., Somsen, G.W., *Electrophoresis* **2005**, *26*, 146–154.
- [7] Schappler, J., Guillarme, D.; Prat, J., Veuthey, J.L., Rudaz ,S., *Electrophoresis* **2007**, *28*, 3078-3087.
- [8] Huck, C. W., Bakry, R., Huber, L. A., Bonn, G. K., *Electrophoresis* **2006**, *27*, 2063–2074.
- [9] Alvarez-Llamas, G., Fernandez de la Campa, M. R., Sanz-Medel, A., *Trends Anal. Chem.* **2005**, *24*, 28–36.
- [10] Moseley, M. A., Deterding, L. J., de Wit, J. S. M., Tomer, K. B. *et al.*, *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 1577–1584.
- [11] Mack, L. L., Kralik, P., Rhonde, A., Dole, M., *J. Chem. Phys.* **1970**, *52*, 4977.
- [12] Whitehouse, C. M., Dreyer, R. N., Yamashita, M., Fenn, J. B., *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 675–679.
- [13] Smyth, W. F., *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1334–1357.
- [14] Lee, E. D., Mück, W., Henion, J. D., Covey, T. R., *J. Chromatogr.* **1988**, *458*, 313–321.
- [15] Shamsi, S. A., Miller, B. E., *Electrophoresis* **2004**, *25*, 3927 – 3961.
- [16] Kirby, D. P., Thorne, J. M., Götzinger, W. K., Karger, B. L., *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 4451–4457.
- [17] Henion, J. D., Mordehai, A. V., Cai, J., *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 2103–2109.
- [18] Varesio, E., Cherkaoui, S., Veuthey, J. L., *J. High Resolut. Chromatogr.* **1998**, *21*, 653–657.
- [19] Nielen, M., *J. Chromatogr. A* **1995**, *712*, 269–284.
- [20] Zheng, J., Jann, M. W., Hon, Y. Y., Shamsi, S. A., *Electrophoresis* **2004**, *25*, 2033–2043.
- [21] Shamsi, S. A., *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5103-5108
- [22] Geiser, L., Rudaz, S., Veuthey, S., *Electrophoresis* **2003**, *24*, 3049-3056.

- [23] Severs, J. C., Smith, R. D., in : Cole, R.B. (Ed.) *Electrospray Ionization Mass Spectrometry – Fundamentals, Instrumentation and Applications*, John Wiley and Sons, New York, **1997**, pp. 343-382.
- [24] Huikko, K., Kotiaho, T., Kostianen, R., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2002**, *16*, 1562–1568.
- [25] Cherkaoui, S., Veuthey, J.L., *Electrophoresis* **2002**, *23*, 442-448
- [26] Banks, J.F., Jr., *J. Chromatogr. A* **1995**, *712*, 245-252.
- [27] Martin-Girardeau, A. and Renou-Gonnord, M.F., *J. Chromatogr. B* **2000**, *742*, 163-171
- [28] Hau, J. and Roberts, M., *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 3977-3984.
- [29] Núñez, O., Moyano, E., and Galceran, M.T., *J. Chromatogr. A*, **2002**, *974*, 243-255.
- [30] Lu, W., Poon, G.K., Carmichael, P.L., and Cole, R.B., *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 668-674.
- [31] Jáuregui, O., Moyano, E., and Galceran, M.T., *J. Chromatogr. A* **2000**, *896*, 125-133.

CHAPITRE III: Stratégie de séparation pour l'analyse simultanée de composés cationiques et polyanioniques par électrophorèse capillaire couplée à la spectrométrie de masse *via* une interface à électronébulisation

A-Introduction

Depuis une quinzaine d'année, le couplage entre l'électrophorèse capillaire et la spectrométrie de masse a connu un intérêt croissant. Sachant que l'électrophorèse capillaire, d'une part, permet de consommer de faibles quantités d'échantillon, d'avoir des temps d'analyse courts, d'utiliser divers modes de séparation avec une haute efficacité, mais aussi de travailler avec une méthode automatisée ; et que la détection par spectrométrie de masse, d'autre part, permet d'obtenir une information structurale sur les composés, il paraît évident que le couplage de ces deux systèmes est une avancée dans le domaine des sciences séparatives et analytiques. L'interface ESI a été la plus couramment employée pour ce type de couplage, du fait de sa sensibilité, de sa souplesse, sa relative facilité d'utilisation, et de son aptitude à l'analyse de composés polaires, généralement séparés par électrophorèse capillaire [1]. Ce couplage est généralement utilisé pour diverses applications, telles que l'analyse de biomolécules [2-8], de produits pharmaceutiques [9] et de ses métabolites [10], mais aussi pour l'analyse de produits alimentaires [11], ou encore l'analyse environnementale [12, 13], mais aussi dans l'investigation de produits plus techniques [14].

Toutefois une des problématiques du couplage CE/MS avec une interface ESI, réside dans le maintien du contact électrique au bornes du capillaire d'électrophorèse lors de séparations électrophorétiques. L'électrode et le flacon d'électrolyte de séparation à l'extrémité de la sortie du capillaire ayant été remplacés par un système d'interfaçage (une aiguille d'interface), pour que le contact électrique se fasse de manière continue, un écoulement minimum de liquide est nécessaire entre l'électrophorèse capillaire et le spectromètre de masse. Ce contact est généralement obtenu par l'écoulement électroosmotique cathodique lorsqu'un capillaire en silice vierge est employé, pour l'analyse de composés cationiques ou de composés anioniques peu mobiles. Dans le cas contraire, c'est-à-dire lors de la séparation en polarité négative de composés polyanioniques de mobilité

électrophorétique supérieure, en valeur absolue, à la mobilité électroosmotique, dans des capillaires en silice vierge, une déplétion en électrolyte à l'extrémité de sortie du capillaire empêcherait le contact électrique de se faire. C'est pourquoi on retrouve peu de références dans la littérature, traitant de l'analyse de composés anioniques par couplage CE-ESI-MS.

Une méthode pour l'analyse de métabolites anioniques, par couplage CE-ESI-MS, a été proposée par Soga et ses collaborateurs [15]. Une modification dynamique du capillaire, a été réalisée par la technique SMIL (+), décrite par Katayma [16], à l'aide d'un polymère cationique, le polybrène (bromure d'hexadiméthrine). Cette modification dynamique du capillaire permet donc une inversion du flux électroosmotique au sein de celui-ci, de manière plus ou moins durable, et éviter ainsi d'avoir recours à l'ajout d'un surfactant dans l'électrolyte de séparation. La séparation a été donc réalisée en polarité négative, en milieu basique (acétate d'ammonium, pH 9). Un mélange contenant 27 standards de différents types de métabolites mono-anioniques (acides carboxyliques, acides carboxyliques phosphorylés, saccharides phosphorylés et nucléotides) a pu être analysé avec des temps d'analyse courts, de très bonnes sensibilité et sélectivité, ainsi qu'une bonne reproductibilité des temps d'analyse. Cette technique permet donc l'analyse de divers types d'anions sans dérivation préalable, dans un large éventail de domaines d'application. Toutefois, cette technique présente quelques limites, les composés polyanioniques sont susceptibles de s'adsorber sur la paroi interne du capillaire chargé positivement. Pour l'analyse de composés polyanioniques, les mêmes auteurs ont proposé d'utiliser un capillaire dont la paroi interne est revêtue par un polymère neutre, le poly(diméthylsiloxane) afin d'éviter l'adsorption des composés polyanioniques sur la paroi interne du capillaire. Par ailleurs une pression hydrodynamique a été appliquée à l'entrée du capillaire, durant la séparation électrophorétique, afin de générer un écoulement vers l'anode (coté MS) (électrophorèse capillaire assistée par pression PACE/ESI-MS [17]) et donc de permettre de maintenir la jonction liquide entre le capillaire d'électrophorèse et l'aiguille d'interface ESI [18]. Les avantages de cette méthode sont tels qu'elle permet l'analyse simultanée des composés polyanioniques (tels que les citrates, les nucléotides, les coenzymes nicotinamides et les coenzymes A), avec de bonnes sensibilité et sélectivité et des temps d'analyse relativement courts. Par contre il existe des inconvénients majeurs à cette technique, décrits ultérieurement par les mêmes auteurs [19]. Ils ont remarqué une fluctuation du courant d'électrophorèse durant les analyses, des temps de rétention non reproductibles, mais aussi que l'entrée du capillaire était souvent obstruée. Ils ont donc proposé une méthode alternative, pour l'analyse de nucléotides par PACE/ESI-MS. Il a été mis en évidence dans la littérature [20, 21] qu'une adsorption d'espèces phosphorylées sur les groupements silanols de

la paroi interne du capillaire, pouvait se produire. Afin d'éviter ce type d'adsorption, les groupements silanols ont été « masqués » par des ions phosphates lors de l'étape de préconditionnement et l'analyse des nucléotides a été réalisée avec un électrolyte volatil exempt d'ions phosphate. L'arrivée du gaz nébulisant a par ailleurs été coupée lors de la première étape, afin d'éviter la contamination de la source MS par les ions phosphates. Pour l'analyse de ces nucléotides en polarité positive par électrophorèse capillaire à pH 7,5, il a été nécessaire d'appliquer une pression à l'entrée du capillaire durant la séparation, afin que les composés soient entraînés vers la cathode par le flux électroosmotique cathodique d'une part et par le flux hydrodynamique d'autre part. Il a également été préconisé de changer les flacons d'électrolyte à chaque analyse afin d'obtenir une meilleure répétabilité des temps d'analyse. Ainsi grâce à cette méthode, il a été possible d'analyser simultanément différents types d'espèces phosphorylées (comme les nucléotides, nicotinamide-adénine dinucléotides, et les coenzymes A) avec des sensibilités et sélectivités suffisamment élevées pour la quantification de ces espèces, mais également avec une bonne reproductibilité et linéarité des analyses.

D'autres groupes de recherche ont proposé une méthode permettant la séparation simultanée des petits acides carboxyliques (tels que les succinates, malates, tartrates, maléates et citrates) avec un capillaire en silice vierge [22]. Pour ce faire les séparations ont été effectuées en milieu basique (formiate d'ammonium pH 10), car la mobilité électroosmotique en valeur absolue est supérieure à la mobilité électrophorétique des acides carboxyliques étudiés à ce pH [23]. Ainsi les acides carboxyliques de petite taille ont pu être entraînés vers la MS et donc analysés par couplage CE-ESI-MS.

D'autres auteurs ont utilisé la même approche que la méthode précédemment décrite, c'est-à-dire l'utilisation d'un capillaire en silice vierge en milieu très basique, pour l'analyse cette fois-ci de métabolites anioniques et polyanioniques (phosphate de sucres, acides organiques, nucléotides et coenzymes A), par PACE-ESI-MS [24]. Ils ont dans un premier temps employé la triéthylamine comme additif qui entraîne une suppression partielle du flux électroosmotique. Ce ralentissement du flux électroosmotique engendre donc des analyses plus longues, une meilleure résolution des composés anioniques et une meilleure séparation. Dans un deuxième temps, l'analyse des composés polyanioniques a été effectuée dans les mêmes conditions, en arrêtant le champ électrique après un temps déterminé et en appliquant ensuite une pression hydrodynamique pour entraîner les composés séparés vers l'analyseur de masse. Ainsi la résolution et l'efficacité sont augmentées en palliant le phénomène de diffusion, du au temps d'analyse trop long. Cette méthode en deux étapes permet donc l'analyse simultanée d'un grand nombre de composés anioniques et polyanioniques. Celle-ci

présente quelques limitations : des temps d'analyse relativement longs (de l'ordre de 50 min) et seulement l'analyse des composés polyanioniques de mobilité électrophorétique inférieure à la mobilité électroosmotique en valeur absolue.

Toutefois, pour l'analyse simultanée d'un mélange complexe de composés cationiques, anioniques, et polyanionique, aucun protocole n'a, à notre connaissance, encore été développé. Par exemple, l'étude et l'analyse quantitative de métabolites chargés, par couplage CE/ESI-MS, a été réalisée en utilisant trois protocoles différents [10]. Pour les métabolites cationiques, la séparation a été réalisée sur un capillaire en silice vierge. Quant aux métabolites anioniques, les capillaires utilisés pour les séparations sont des capillaires dont la paroi interne a été traitée par un dépôt de couches ioniques successives (SMIL) [16]. Enfin pour les composés polyanioniques (nucléotides et coenzymes) la séparation a été réalisée avec un capillaire neutre PDMS greffé DB-1 en superposant une pression hydrodynamique, à l'entrée du capillaire, pour générer un écoulement vers la MS et donc permettre le maintien du contact électrique lors de la séparation électrophorétique.

Lors de notre étude, nous avons entrepris plusieurs approches afin de permettre la séparation simultanée de composés cationiques, anioniques, et polyanioniques par couplage CE/ESI-MS.

Trois stratégies ont été envisagées au cours de cette étude.

- La première a consisté à utiliser un capillaire avec un écoulement électroosmotique cathodique. L'objectif a été de tenter d'accélérer l'écoulement électroosmotique généré dans un capillaire en silice vierge, et d'obtenir une vitesse électroosmotique supérieure à la vitesse électrophorétique des composés polyanioniques afin de pouvoir détecter ces derniers.
- La seconde stratégie a consisté quant à elle, en l'utilisation d'un capillaire avec un écoulement électroosmotique résiduel (capillaire greffé neutre), en imposant une tension négative à l'entrée du capillaire. Ainsi dans ce cas de figure les polyanions pourraient être détectés aisément. Mais la difficulté résidera dans le maintien du contact électrique et la détection des cations.
- Enfin, la dernière stratégie envisagée, a été d'utiliser un capillaire avec un écoulement électroosmotique anodique, permettant ainsi d'obtenir des vitesses électroosmotiques et électrophorétiques de même sens pour les anions. Par ailleurs, il faudra que la vitesse électroosmotique soit suffisamment élevée pour pouvoir entraîner les cations du mélange réactionnel.

Ces différentes approches ont été réalisées et appliquées dans la mise en place du couplage CE/MS, pour la séparation d'un mélange de composés à la fois polyanioniques et cationiques, intermédiaires de synthèse d'une classe de produits de contraste utilisés en imagerie médicale.

B- Article

Single-run separation of cationic, anionic, and polyanionic compounds by CE/ESI-MS

Meriem Mokaddem¹, Anne Varenne¹, Jamel-Eddine Belgaied², Cécile Factor³, Pierre Gareil¹

Electrophoresis **2007**, 28, 3070-3077

¹ Laboratory of Electrochemistry and Analytical Chemistry, UMR 7575 CNRS-ENSCP-Paris 6, Paris, France

² Laboratory of Analytical Chemistry and Electrochemistry, (04UR12-01) INSAT, B.P. 676, Tunisie, France

³ Guerbet, BP 50400, Roissy, France

Keywords : CE-ESI-MS / CE-MS

Abstract

A method for a single-run separation of cationic, anionic, and polyanionic compounds by CE hyphenated to ESI-MS (CE-ESI-MS) is described. One of the main issues for coupling CE to MS with an ESI source consists in maintaining an electric contact for the electrophoretic separation. This condition is only performed if a liquid flow arising from the separation capillary is directed to the needle, making it coupling-compatible. This latter situation is incompatible with the separations of polyanionic compounds of higher electrophoretic mobility (in absolute value) than the electroosmotic mobility, performed in bare fused-silica capillaries under a negative polarity. In this study, several alternative approaches were evaluated to circumvent this difficulty, and applied to the setup of the CE-MS separation of a mixture containing both cationic and polyanionic compounds, which are synthesis intermediates of contrast agents for medical imaging. Eventually, the detection of the cationic and anionic compounds in a single run could be obtained by either using neutrally coated polymethylsiloxane (DB-1) capillaries and simultaneously applying a negative voltage polarity and a pressure allowing to compensate for the residual cathodic EOF or by dynamically modifying the inner wall of a bare fused-silica capillary with a polycationic polymer (hexadimethrine bromide) and using it afterwards under negative voltage polarity.

1- Introduction

For about 15 years, the hyphenation between CE and MS has received increasing attention. Whereas CE provides low sample consumption, short analysis time, high separation efficiency, various separation modes, and ease of operation and automation, MS detection brings unambiguous identification and m/z separation capability. For coupling CE to MS, the ESI interface is the most commonly employed for its sensitivity, versatility, relative easiness of use, and its suitability for the analysis of polar compounds, thereby showing a good match with the type of analytes usually separated by CE [1]. This hyphenation is widely used in a variety of fields, such as biomolecules [2–8] pharmaceuticals [9] and metabolites [10], food analysis [11], environmental analysis [12, 13], and investigation of technical products [14]. However, the major limiting difficulty for coupling CE to MS through an ESI interface consists in maintaining an electric contact for the electrophoretic separation. When the outlet electrode and vial are replaced by the interfacing system (interface needle), the electric connexion is provided if a liquid flow arising from the separation capillary is directed to the needle, making it coupling compatible. If not, electrolyte depletion at the outlet end of the capillary hinders this contact, resulting in a current drop. This latter situation is encountered for the separation of polyanionic compounds of higher electrophoretic mobility (in absolute value) than the electroosmotic mobility, performed in bare fused-silica capillaries under negative CE voltage polarity. For this reason, few papers on anion analysis have been reported by CE-ESI-MS using this configuration. A method for the determination of anionic metabolites based on CE-ESI-MS was developed by Soga *et al.* [15], requiring inversion of EOF and CE voltage polarity by using a cationic polymer-coated capillary. Various types of monoanionic metabolites could be analyzed in a short time with a relatively high sensitivity, selectivity, and reproducibility. For the case of polyanions, the same authors proposed using a neutral-polymer capillary coating to avoid wall adsorption, and applying pressure during separation to produce constant liquid flow toward the anode on the MS side [16]. Other groups developed a new method allowing the simultaneous separation of some anions and polyanions using EOF suppression and an air pressure gradient [17, 18]. However, for a more complex mixture of both cationic, anionic, and polyanionic compounds, no single protocol has, to our knowledge, yet been developed. For example, the comprehensive and quantitative analysis of charged metabolites by CE-ESI-MS was performed applying three different separation protocols [10]. Whereas the separation of cationic metabolites was performed in

bare silica capillaries, successive multiple ionic layer (SMIL) coatings [19] were employed for the anionic metabolites. Last, the separation of multivalent anions (nucleotides and coenzymes) was performed with a neutral PDMS DB-1-coated capillary on superimposing air pressure to create electrolyte suction and hence complete the electric circuit.

In this paper, several alternative approaches were evaluated to allow the simultaneous separation of cationic, anionic, and polyanionic compounds by CE-ESI-MS. They are based on (i) the speed-up of the cathodic EOF, generated in bare fused-silica capillaries, by superimposing a pressure at the capillary inlet or by dynamically modifying the inner wall of the capillary by a polyanionic layer; (ii) the use of neutral coated capillaries and the offset of the residual cathodic EOF by superimposition of a low pressure at the capillary inlet; (iii) the reversal of EOF from cathodic to anodic direction by dynamically modifying the inner wall of the capillaries with ammonium groups. These different approaches are discussed and applied to the setup of the CE-MS separation of a mixture containing both polyanionic and cationic compounds, which are synthesis intermediates of contrast agents for medical imaging.

2- Materials and methods

2.1 Chemicals

Trimesic acid, Bis-Tris [bis(2-hydroxyethyl)imino-tris(hydroxyethyl)-methane], acetic acid, triethyl amine, formamide, and hexadimethrine bromide (Polybrene) were purchased from Sigma-Aldrich-Fluka (Saint-Quentin Fallavier, France), sodium hydroxide and HPLC-quality methanol from Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France), ammonia from Merck (Darmstadt, Germany), maleic acid from Lancaster (Strasbourg, France), and formic acid from Acros Organics France (Noisy le Grand, France). A CEofix MS kit was kindly donated by Analis (Namur, Belgium). The reactional mixture used as sample in this work was provided by Guerbet (Roissy, France). It contained the tetraacidic target synthesis intermediate of a proprietary contrast agent denoted A₂ (*Mr* 1359.8) and two main impurities originating from uncompleted reaction, a pentaacidic one denoted A₁ (*Mr* 248.1), and a monobasic one denoted B (*Mr* 1129.6). For confidentiality purposes, only their molecular masses and maximum negative or positive charges at high or low pH can be disclosed. The sample solutions were prepared by dissolving each analyte at a concentration of *ca.* 3.5 mM in

water. Deionized water was obtained from an Alpha-Q system (Millipore, St. Quentin-en-Yvelines, France). Electrolytes were filtered through 0.2 mm PVDF membrane filters (Pall Life Sciences, MI, USA) before use.

2.2 Capillary coating

For capillary modification with CEofix MS kit, bare fused silica capillaries were successively flushed (950 mbar) with 1 M NaOH for 15 min, 0.1 M NaOH for 2 min, CEofix-MS Initiator (polycation solution in 1 M formic acid) for 2 min, BGE (16.8 mM ammonia, 330 mM formic acid (20 mM ionic strength, pH 2.5) with 1:24 v/v CEofix-MS Accelerator) for 4 min, 0.1 M NaOH for 2 min, and CEofix-MS Initiator for 2 min, according to a procedure described by Analis [20, 21]. All these steps were carried out after disconnecting the MS source in order to minimize contamination risks.

Capillaries were dynamically coated with polybrene as described in the literature [22–24]. Briefly, a new bare fused silica capillary was first flushed with 1 M NaOH for 15 min and rinsed with water for 5 min. Next, the capillary was flushed with a polybrene solution at 3 g/100 mL in water for 25 min using a syringe pump (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA) at a flow rate of 240 mL/h, corresponding to 50 capillary volumes (100 mL). Finally, the capillary was rinsed with water for 5 min and conditioned with BGE for 5 min, all these steps being performed under a pressure of 950 mbar. Recoating of the capillary with the cationic polymer was accomplished by using the same method restarting from NaOH flushing.

2.3 CE-UV experiments

CE was performed with an HP^{3D}CE (Agilent Technologies, Massy, France) equipped with a UV absorbance DAD. Separations were realized in 50 μm id x 35 cm (26.5 cm effective length) bare fused-silica capillaries (Photonlines, Marly-le-Roi, France). Indirect UV detection was carried out with separation electrolytes composed of trimesate or maleate as chromophore ion and different concentrations of Bis-Tris, sodium or ammonium to adjust the electrolyte pH to the desired value and ionic strength to 20 mM. Formamide (0.0003% v/v in the BGE) was used as neutral marker to determine EOF. Analytes were hydrodynamically injected (5 kPa, 3 s) and separation voltage was set to 20 kV in positive or negative polarity. New capillaries were conditioned by successive flushes with 1 M and 0.1 M NaOH and then with water under a pressure of 935 mbar for 15 min each. The temperature in the capillary

cartridge was set at 25°C. The acquisition rate was 10 points/s. Analytes were detected by indirect UV absorbance at 200 nm. Between runs, capillaries were rinsed with electrolyte for 3 min. Capillaries were rinsed with water and dried by air when not in use.

2.4 MS detection

An SL simple quadrupole mass spectrometer (Agilent Technologies) equipped with an orthogonal ESI source was used in the negative ionization mode. Nitrogen was used as nebulizing gas at a temperature of 100°C and a pressure of 10 psi (1 psi = 6894.76 Pa) and as drying gas at 350°C and a flow rate of 7 L/min. Optimized ESI voltage was 3500 V. Skimmer voltage was 10 V. CE-MS coupling was carried out using a sheath liquid coaxial ESI interface (Agilent Technologies). MS detection of the compounds by direct injection was performed by continuously flushing the sample from the CE capillary to the MS detector under pressure *via* the ESI interface. The sheath liquid (80:20 v/v MeOH-H₂O mixture containing 0.01% v/v triethylamine) was delivered by an Agilent 1100 series isocratic HPLC pump. The acquisition time was 60 s.

2.5 CE-MS experiments

The MS conditions were those described in Section 2.4. CE-MS experiments were realized in 50 µm id x 100 cm (20 cm effective length to UV detector and 100 cm effective length to MS detector) bare fused-silica capillaries (Photonlines), poly(methylsiloxane) DB-1-coated capillaries (Agilent Technologies) or dynamically modified capillaries (see Section 2.2). The BGE was made up with 19.9 mM ammonia, 119 mM acetic acid (20 mM ionic strength), pH 4.0 or with 16.8 mM ammonia, 330 mM formic acid (20 mM ionic strength), pH 2.5). Analytes were hydrodynamically injected (5 kPa, 2 s) and separation voltage was set to -20 kV or +20 kV according to cases. When necessary, a 5 kPa pressure was continuously applied during CE-MS separations.

3- Results and discussion

The main difficulty in the separation of a complex mixture of cationic, anionic, and polyanionic compounds by CE-ESI-MS consists in maintaining the electric contact required for the electrophoretic separation. Indeed, as the electrode and the BGE vial normally positioned at the capillary outlet are replaced by the interfacing system (interface needle), the electric connexion is provided when a liquid flow arising from the separation capillary is directed to the needle, thus allowing consistent conditions for coupling. When not, an electrolyte depletion at the capillary outlet will hinder this contact. This latter situation is encountered especially for the separations of polyanionic compounds of higher electrophoretic mobility (in absolute value) than electroosmotic mobility, that are performed in bare fused-silica capillaries under negative voltage polarity. In this study, different alternative approaches were evaluated to circumvent this difficulty and allow the CE-ESI-MS separation of polyanionic and cationic compounds in a single run. This purpose was exemplified through the separation of a model mixture, containing two polyanionic species, denoted A_1 and A_2 , and a cationic species denoted B , which are synthesis intermediates of contrast agents for medical imaging, according to reaction:



For the sake of simplicity, charges, which are dependent on pH, were omitted in writing this reaction. The maximum negative charge rate at high pH is five for A_1 and four for A_2 , while the maximum positive charge rate is one for B at low pH. The final aim was to determine the presence of A_1 and B precursors in A_2 batches during synthesis in a single run. Direct UV detection was only possible for B and A_2 . MS detection of a mixture of A_1 , B , and A_2 could be performed in negative ionization mode with a sheath liquid made up with a 80:20 v/v MeOH–H₂O mixture containing 0.01% v/v triethylamine. In these conditions, the pseudomolecular ion of A_1 [A_1-H]⁻ appeared at m/z 247.1. The deprotonated forms of B appeared at m/z 1128.4 [$B-H$]⁻ and 564.3 [$B-2H$]²⁻. The deprotonated forms of A_2 appeared at m/z 1359.2 [A_2-H]⁻ and 679.3 [A_2-2H]²⁻. Nevertheless, the MS apparatus available for this work can only record the signals from four specific ions simultaneously.

When separating the sample mixture in bare fused-silica capillaries under positive CE voltage polarity with a 10.7 mM Bis-Tris, 4 mM trimesic acid (20 mM ionic strength) electrolyte (pH 5.0), only species B and A_2 could be detected (UV and MS). Indeed, as the anionic compounds were migrating counter electroosmotically, they could be detected only if

their electrophoretic mobility was lower (in absolute value) than the electroosmotic mobility. In view of fulfilling this condition, the variations of the electroosmotic mobility and anion A_1 electrophoretic mobility was studied in terms of BGE pH in the range of 3.5–7.5 (Fig. 1). Whatever the pH value, the electrophoretic mobility of polyanion A_1 still remained higher (in absolute value) than the electroosmotic mobility. We then turned to different alternative approaches to solve the problem.

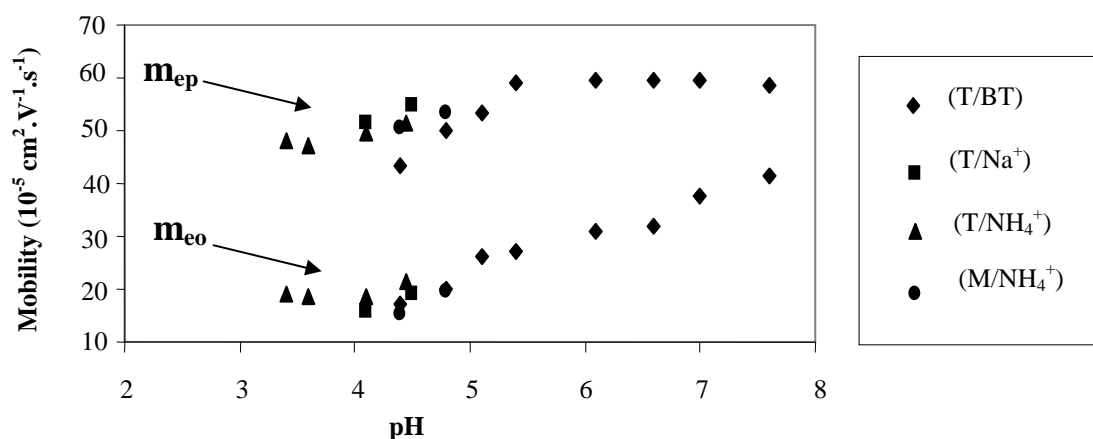
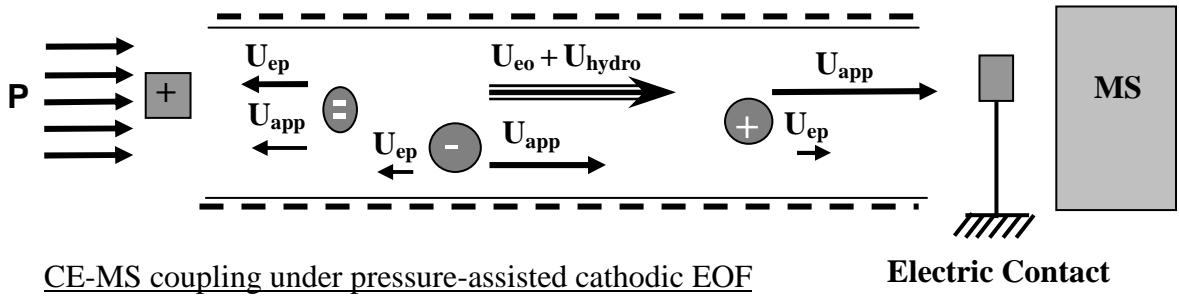


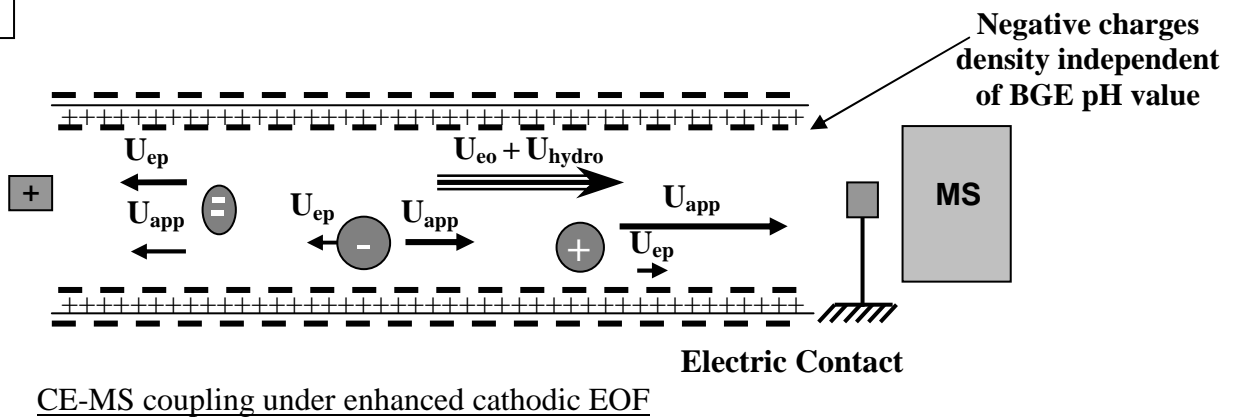
Figure 1. Influence of BGE pH on electroosmotic mobility (m_{eo}) and effective electrophoretic mobility (m_{ep}) of polyanion A_1 .

Bare fused-silica capillary, 50 μm id x 100 cm length (UV detection, 20 cm). BGE: trimesate/ammonium (20 mM ionic strength) for pH 3.4–4.8 (T/NH₄⁺); trimesate/sodium (20 mM ionic strength) for pH 4.1 and 4.45 (T/Na⁺); maleate/ammonium (20 mM ionic strength) for pH 4.5–5 (M/NH₄⁺); trimesate/Bis-Tris (20 mM ionic strength) for pH 4.5–7.5 (T/BT). Applied voltage, +20 kV; temperature, 25°C; hydrodynamic injection, 5 kPa, 2 s. UV absorbance detection at 200 nm.

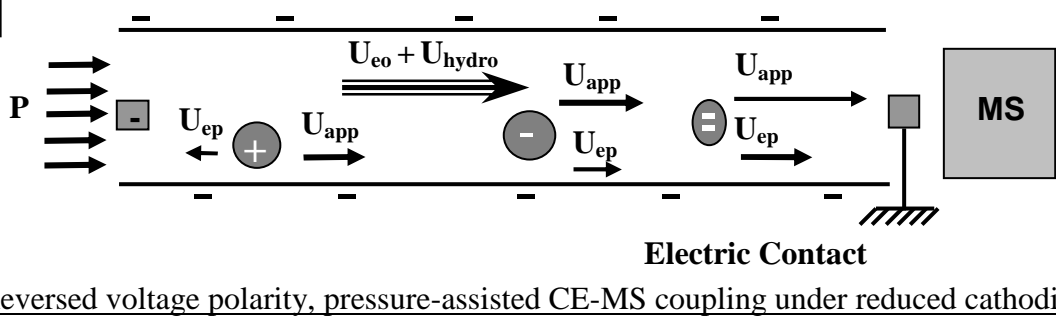
A



B



C



D

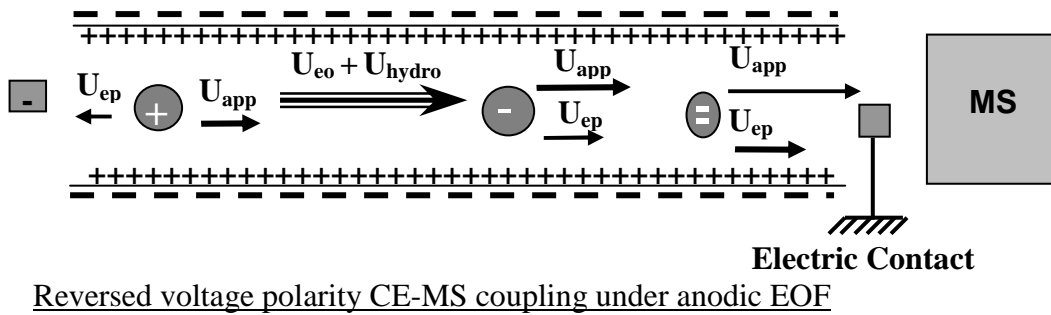


Figure 2. Schematic representation of the various contributions to the transport of cationic and (poly)anionic species in the separation capillary.

(A) CE-MS coupling under pressure-assisted cathodic EOF, (B) CE-MS coupling under enhanced cathodic EOF, (C) reversed voltage polarity, pressure-assisted CE-MS coupling under reduced cathodic EOF, (D) reversed voltage polarity CE-MS coupling under anodic EOF. U_{app} , apparent (overall) velocity; U_{ep} , electrophoretic velocity; U_{eo} , electroosmotic velocity; U_{hydro} , hydrodynamic velocity; $U_{hydro} = U_p + U_{suction}$. U_p , contribution of applied pressure; $U_{suction}$, contribution of the suction effect.

3.1 CE-MS coupling under pressure-assisted cathodic EOF

A first alternative consisted in keeping the CE separation of the polyanionic compounds under counter-EOF conditions using a bare fused-silica capillary and compensate for the high electrophoretic mobility of polyanion A_1 by superimposing a pressure during CE separation in positive voltage polarity, thus allowing the net motion of more mobile polyanion A_1 to the MS detector (Fig. 2A). The conditions retained were 20 mM ionic strength ammonium acetate, pH 4 as BGE with a 5 kPa superimposed pressure. Under these conditions, cation B and polyanion A_2 were detected in positive voltage polarity, with effective electrophoretic mobility values of 8.2×10^{-5} and $-16 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ respectively, which are similar to the values obtained in CE-UV arrangement under the same electrolyte conditions without applying any pressure (9.2×10^{-5} and $-18.1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, respectively). Unfortunately, the highest pressure value provided by the Agilent apparatus during separation (5 kPa) did not allow to obtain a higher overall linear flow velocity (which is the sum of the electroosmotic velocity, the hydrodynamic velocity generated by the pressure application and a possible additional velocity due to suction effect) than the migration velocity of polyanion A_1 in the opposite direction (Fig. 3). Indeed, the overall flow velocity through the separation capillary was calculated from the time it took to the neutral marker to reach the UV detection window, yielding $(U_{eo} + U_{hydro}) = 9.10^{-2} \text{ cm/s}$. According to Hagen–Poiseuille law, the hydrodynamic linear velocity resulting from a 5 kPa pressure application in such a capillary (50 μm id x 1 m) amounted to $U_p = 4.4 \times 10^{-2} \text{ cm/s}$, which contributed to the overall flow velocity by no more than *ca.* 50%.

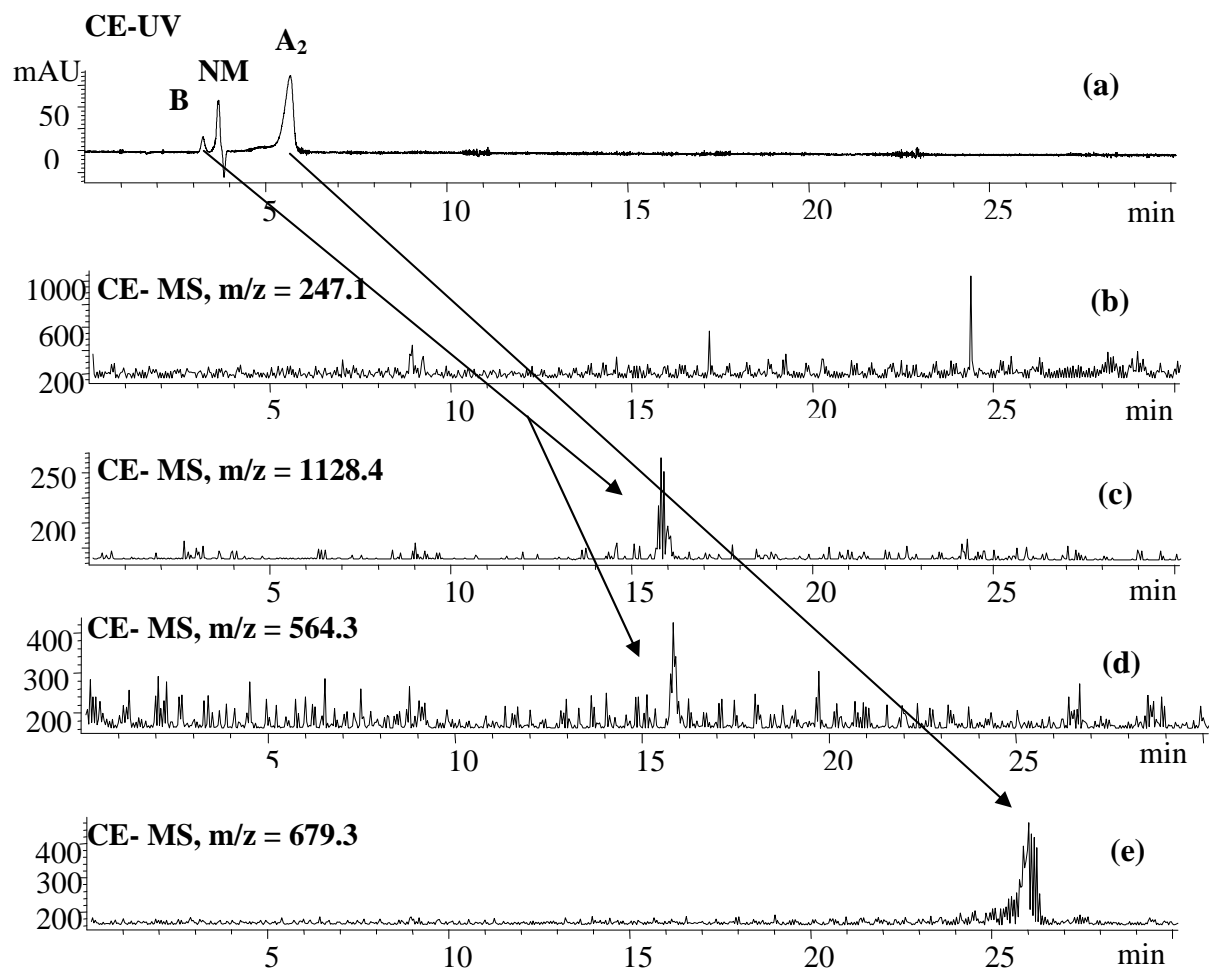


Figure 3. CE-UV-ESI-MS of the reactional mixture of polyanions A_1 and A_2 and cation B under pressure-assisted cathodic EOF.

(a) UV absorbance electropherogram; (b) MS detection at m/z 247.1 ($[A_1-H]^-$); (c) MS detection at m/z 1128.4 ($[B-H]^-$); (d) MS detection at m/z 564.3 ($[B-2H]^{-2}$); (e) MS detection at m/z 679.3 ($[A_2-2H]^{-2}$). CE conditions: bare fused-silica capillary, 50 μm id x 100 cm length (UV detection, 20 cm). BGE: ammonium acetate (20 mM ionic strength) pH 4.0. Applied voltage, +20 kV; temperature, 25°C; hydrodynamic injection, 5 kPa, 2 s. UV absorbance detection at 200 nm. Continuous application of pressure during separation (5 kPa). MS conditions: sheath liquid, water-methanol (20:80, v/v) with 0.01% triethylamine v/v; flow rate, 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Nebulizing gas, nitrogen (100°C, 70 kPa); drying gas, nitrogen (350°C, 5 L/min). Negative ionization mode. Skimmer voltage, 10 V. Peak assignment: see electropherograms. NM, neutral marker.

3.2 CE-MS coupling under enhanced cathodic EOF

Another strategy was based on the speed-up of cathodic EOF by dynamically enhancing the negative charge density borne by the capillary wall. This was achieved using a commercial procedure developed by Analis, which consists in dynamically coating the inner

surface of the capillary by a double layer of cationic and anionic polyelectrolytes [20, 21] (Fig. 2B). The polyanionic layer, deposited last, produced a fast and constant cathodic EOF whatever the pH, which was stable during about 20 runs. Capillaries modified accordingly were already recognized for being implemented in CE-MS experiments without risking to foul the MS source ([24] or [25]). Nevertheless, this approach did not succeed in allowing most negatively charged compound A_1 to be detected by MS in the same run as cation B and polyanion A_2 , using a classical ammonium formate BGE (20 mM ionic strength, pH 2.5, containing 1:24 v/v of CEofix-MS Accelerator) under positive CE voltage polarity and negative ionization mode. In effect, as calculated from Fig. 4, cation B and polyanion A_2 were detected under these conditions with effective electrophoretic mobilities of $9.5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ and $-18.2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, respectively, in agreement with previous results, but the electroosmotic mobility obtained ($46.6 \pm 2.26 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) was not high enough to provide simultaneous detection of polyanion A_1 .

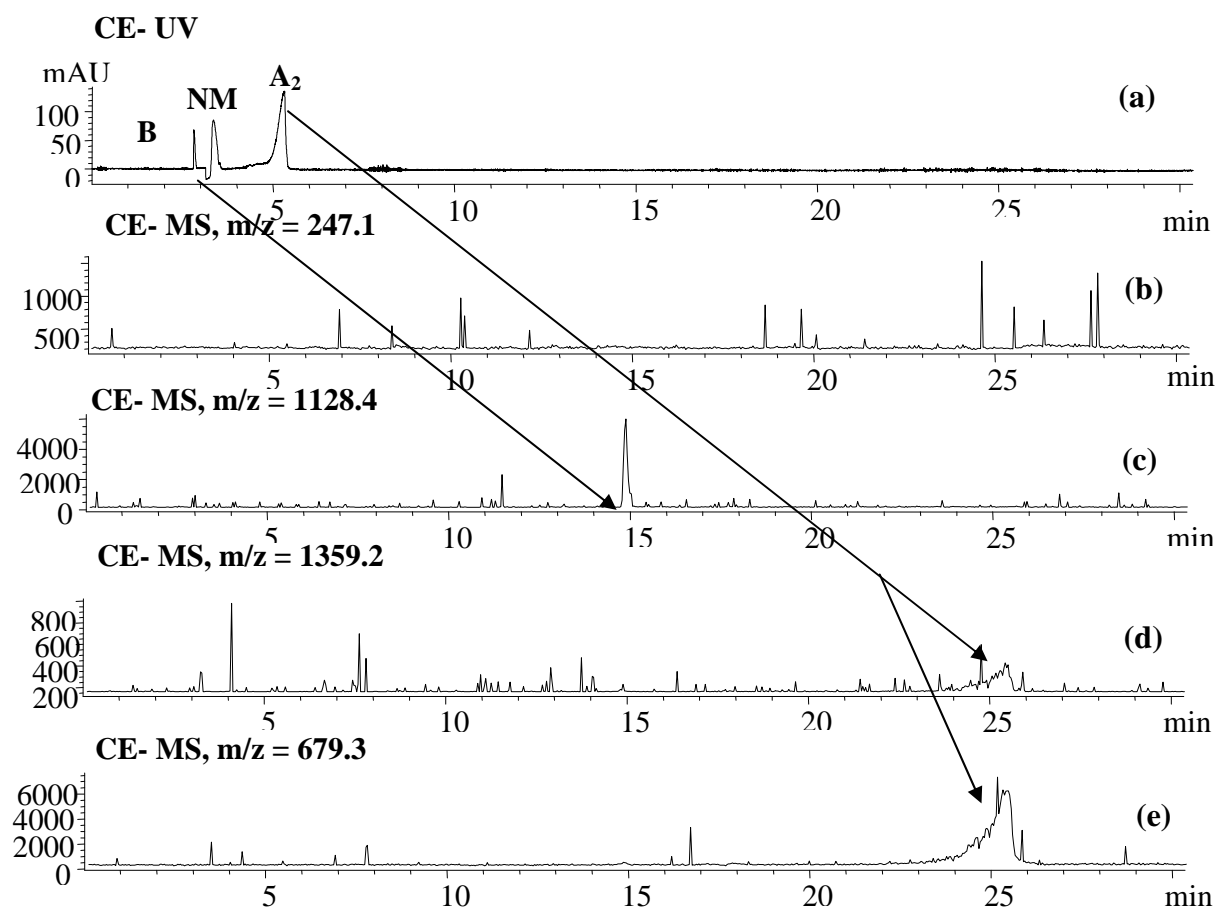


Figure 4. CE-UV-ESI-MS of the reactional mixture of polyanions A_1 and A_2 and cation B under enhanced cathodic EOF.

(a) UV absorbance electropherogram; (b) MS detection at m/z 247.1 ($[A^1-H]^-$); (c) MS detection at m/z 1128.4 ($[B-H]^-$); (d) MS detection at m/z 1359.2 ($[A_2-H]^-$); (e) MS detection at m/z 679.3 ($[A_2-2H]^{-2}$). Experimental conditions: see Fig. 3, except for capillary pretreatment with CEofix MS kit (see Section 2.2), BGE (20 mM ionic strength ammonium formate + 1:24 v/v CEofix accelerator, pH 2.5) and the absence of applied pressure during separation.

3.3 Reversed voltage polarity, pressure-assisted CE-MS coupling under reduced cathodic EOF

The next attempt consisted in reducing the cathodic EOF occurring in bare fused-silica capillaries, so that this flow can be easily reversed applying a counterpressure on the downstream side and simultaneously in reversing the CE voltage polarity (Fig. 2C). In this trend, a neutrally poly-(methylsiloxane) DB-1 coated capillary was employed, usually presenting residual cathodic EOF. A pressure-assisted CE separation was then set up with 20 mM ammonium acetate, pH 4.0 as BGE under negative voltage polarity, in such a way as to obtain an anodic overall flow, thus preserving the electric contact at the CE-MS interface. In this strategy, all three A_1 , B, and A_2 ions were effectively detected by MS, with a CE resolution depending on the pressure value applied. The pressure value was next varied in the 1–5 kPa range (upper available limit of the CE apparatus), and the best resolved peaks were obtained for a 1 kPa value (Fig. 5), as expected. Except for the experiment under 5 kPa pressure, no UV-detection window was created on the capillary, so as to diminish fragility at this position.

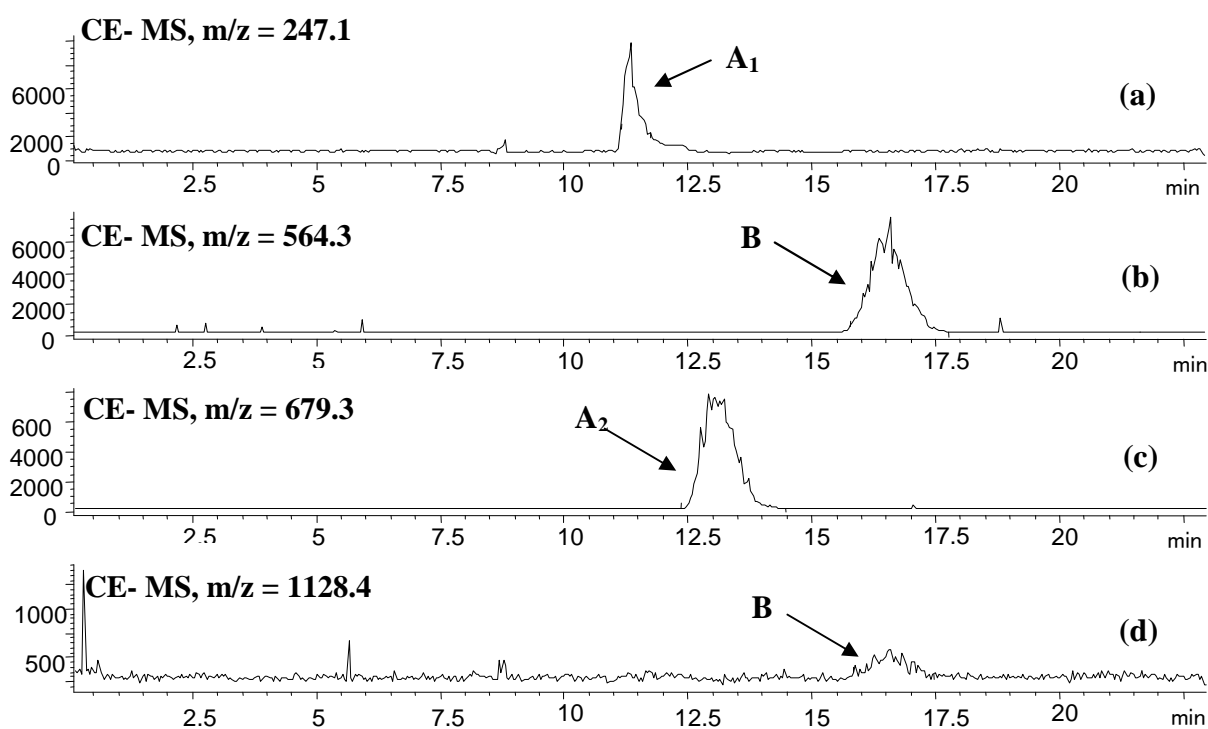


Figure 5. Reversed voltage polarity, pressure-assisted CE-ESI-MS of the reactional mixture of polyanions A_1 and A_2 and cation B under reduced cathodic EOF.

(a) MS detection at m/z 247.1 ($[A_1-H]^-$); (b) MS detection at m/z 564.3 ($[B-2H]^{-2}$); (c) MS detection at m/z 679.3 ($[A_2-2H]^{-2}$); (d) MS detection at m/z 1128.4 ($[B-H]^-$). Experimental conditions: see Fig. 3, except for fused silica capillary (neutrally, DB-1 coated, same dimensions), applied voltage (-20 kV) and continuous application of a pressure during separation (1 kPa).

Figure 6 represents the theoretical variation of the linear flow velocity due to the pressure application according to Hagen–Poiseuille law and the experimental linear velocity for each compound in terms of the applied pressure. The fact that the slope of the analyte velocity variation was higher than the expected one, should be due to temperature effects on BGE viscosity inside the spray needle heated by the nebulizing gas. This phenomenon might be less pronounced for higher applied pressures, because of the higher liquid flow inside the separation capillary under these conditions. This graph clearly shows that even cationic compound B migrating upward in the capillary coelectroosmotically could be detected without applying any back-pressure, which emphasized the importance of the suction effect resulting from both the coaxial sheath liquid and nebulizing gas flows.

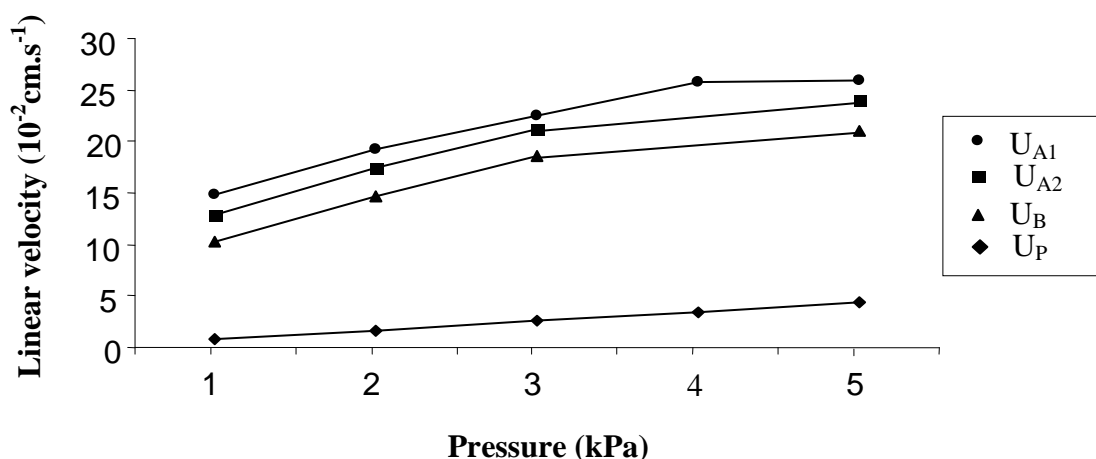


Figure 6. Variation of the theoretical linear velocity due to pressure application (U_P) and experimental linear velocity for compounds A_1 , B, and A_2 (U_{A1} , U_B , and U_{A2}) in terms of the applied pressure value.

Experimental conditions: see Fig. 5.

Thanks to this effect, this strategy allows to detect anions whatever their charge and cations with low to quite high electrophoretic mobility. Indeed, under the present

experimental conditions (capillary dimensions, coaxial sheath liquid, nebulizing gas, and temperature), applying a 5 kPa pressure at the CE capillary inlet will result in an overall linear flow velocity of *ca.* 23×10^{-2} cm/s, which will allow cations having electrophoretic mobilities less than $90 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ to be detected in under 30 min.

3.4 Reversed voltage polarity CE-MS coupling under anodic EOF

Another way to arrange MS detection of all anions and of cations having mobilities under a given limit was to reverse cathodic EOF (as those naturally existing in bare fused-silica capillaries) into anodic EOF, as produced in positively coated capillaries (Fig. 2D). To our knowledge, long enough capillaries (80 cm minimum) with a positively charged covalent coating and presenting an anodic EOF for use in CE-MS separations are not commercially available. A variety of noncovalently, home-modified, positively coated capillaries has been described in the literature, but the main problem for CE-MS separation is the compatibility of such coatings with MS interfacing conditions, *i.e.*, heating at the last few centimeters of the capillary outlet by the nebulizing gas and risk of bleeding. Nevertheless, a few number of MS-compatible cationic coatings have been proposed in literature, either as a single layer of 2-ethyl-(2-pyrrolidine)methacrylate-dimethylacrylamide (EPyM-DMA) copolymer [25], PolyE-323 polyamine coating [26], Polybrene [27, 28] or Polybrene/ethyleneglycol [29], or as SMIL coatings of Polybrene/dextran sulphate [15, 30]. For this study, a Polybrene monolayer was chosen because of its ease of preparation and use (see Section 2.2) and quite good stability within approximately 20 runs. Under these conditions, all three compounds could be MS-detected in a short analysis time and with good CE resolution (Fig. 7). Anion A_1 was not visualized on the CE-UV electropherogram as it does not contain any UV-absorbing moiety and could thus only be detected by MS. Interestingly, a MS signal at m/z 1128.4 corresponding to the pseudomolecular ion of B appears at two different times, among which one corresponds to A_2 detection time. This indicates an A_2 fragmentation into B during ionization. As the electroosmotic mobility was $-44.6 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, a cation MS-detected at 30 min (or 1 h) would have an electrophoretic mobility of about $17 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ($30 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).

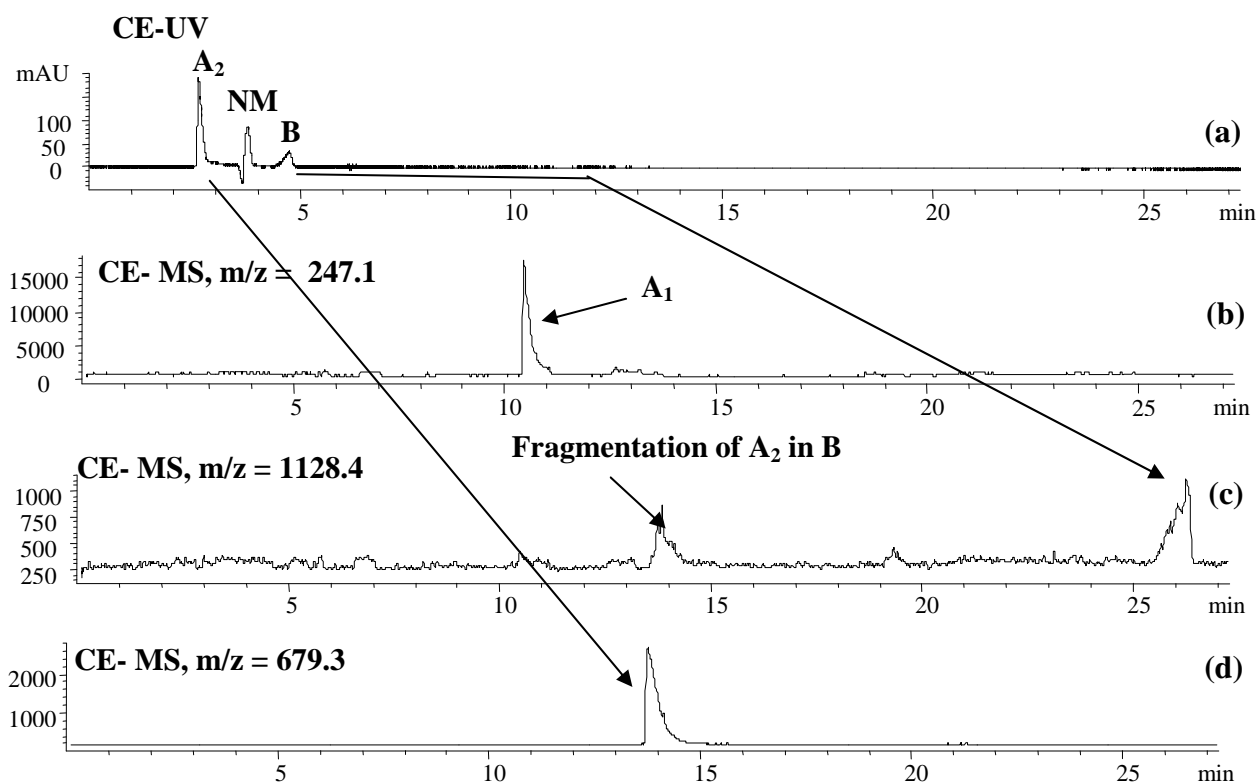


Figure 7. Reversed voltage polarity CE-UV-ESI-MS of the reactional mixture of polyanions A_1 and A_2 and cation B under anodic EOF.

(a) UV absorbance electropherogram; (b) MS detection at m/z 247.1 ($[A_1-H]^-$); (c) MS detection at m/z 1128.4 ($[B-H]^-$); (d) MS detection at m/z 679.3 ($[A_2-2H]^{-2}$). Experimental conditions: see Fig. 3, except for fused-silica capillary (dynamically modified by a polybrene monolayer, as described in Section 2.2), applied voltage -20 kV) and the absence of applied pressure during separation.

4- Concluding remarks

Effective on-line coupling of CE to ESI-MS requires the presence of a liquid flow from the CE capillary to maintain proper electric contact for the CE separation. This condition is most often met when using bare fused-silica capillaries presenting cathodic EOF for cationic analytes migrating coelectroosmotically and slow-migrating anionic analytes electroosmotically carried to the ESI needle. The situation of fast-migrating anionic analytes having a net motion opposite to EOF is somewhat more intricate. For this special case, two effective strategies for single-run analysis of cationic, anionic, and polyanionic compounds by CE hyphenated to ESI-MS were developed in this work. Two parameters were considered:

EOF direction and magnitude, and superimposition of a pressure at the inlet of the CE capillary during separation, in connection with the suction effect generated by sheath liquid and gas flow at the ESI interface. The speed-up of cathodic EOF either by superimposition of a pressure in bare fused-silica capillaries or by enhancement of the negative charge at the capillary wall by a dynamic double layer coating did not allow us to detect fastest-migrating polyanions by CE-MS. Eventually, the detection of the cationic and polyanionic compounds in a single run could be obtained under negative CE voltage polarity by either using neutrally coated polymethylsiloxane DB-1 capillaries and simultaneously applying a slight pressure allowing to compensate for the residual cathodic EOF, or dynamically modifying the inner wall of the bare fused-silica capillary with a polycationic polymer, such as polybrene. In the latter case superimposition of a pressure may not be needed. Both strategies can be applied to practically all kinds of complex mixtures, allowing CE-MS analysis of all sample anions and almost all cations (depending on the additional suction effect) in a reasonable time (most likely in under 30 min) and with satisfactory resolution.

The authors would like to thank François de L'Escaille (Analis, Namur, Belgium) for the gift of a CEofix-MS kit.

5- References

- [1] Cole, R. B. (Ed.), *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*, Wiley, New York 1997.
- [2] Campa, C., Coslovi, A., Flamigni, A., Rossi, M., *Electrophoresis* 2006, 27, 2027–2050.
- [3] Catai, J. R., Sastre Torano, J., de Jong, G. J., Somsen, G.W., *Electrophoresis* 2006, 27, 2091–2099.
- [4] Yu, W., Li, Y., Deng, C., Zhang, X., *Electrophoresis* 2006, 27, 2100–2110.
- [5] Monton, R. M. N., Terabe, S., *Anal. Sci.* 2005, 21, 5–13.
- [6] Simpson, D. C., Smith, R. D., *Electrophoresis* 2005, 26, 1291–1305.
- [7] Stutz, H., *Electrophoresis* 2005, 26, 1254–1290.
- [8] Hernandez-Borges, J., Neusüb, C., Cifuentes, A., Pelzing, M., *Electrophoresis* 2004, 25, 2257–2281.
- [9] Smyth, W. F., *Electrophoresis* 2006, 27, 2051–2062.
- [10] Soga, T., Ohashi, Y., Ueno, Y., Naraoka, H. K., Tomita, M., Nishioka, T., *J. Proteome Res.* 2003, 2, 488–494.
- [11] Simó, C., Barbas, C., Cifuentes, A., *Electrophoresis* 2005, 26, 1306–1318.
- [12] Zhao, X., Lu, Y., Hardin, I., *Biotech. Lett.* 2005, 27, 69–72.
- [13] Himmelsbach, M., Klampf, C. W., Buchberger, W., *J. Sep. Sci.* 2005, 28, 1735–741.
- [14] Klampf, C., *Electrophoresis* 2006, 27, 3–34.
- [15] Soga, T., Ueno, Y., Naraoka, H., Ohashi, Y., Tomita, M., Nishioka, T., *Anal. Chem.* 2002, 74, 2233–2239.
- [16] Soga, T., Ueno, Y., Naraoka, H., Matzuda, K., Tomita, M., Nishioka, T., *Anal. Chem.* 2002, 74, 6224–6229.
- [17] Sawada, H., Nogami, C., *Anal. Chim. Acta* 2004, 507, 195–202.
- [18] Harada, K., Fukusaki, E., Kobayashi, A., *J. Biosci. Bioeng.* 2006, 101, 403–409.
- [19] Katayama, H., Ishihama, Y., Asakawa, N., *Anal. Chem.* 1998, 70, 5272–5277.
- [20] Vanhoenacker, G., de l’Escaille, F., De Keukeleire, D., Sandra, P., *J. Chromatogr. B* 2004, 799, 323–330.
- [21] Vanhoenacker, G., de l’Escaille, F., De Keukeleire, D., Sandra, P., *J. of Pharma. and Biomed. Anal.* 2004, 34, 595–606.
- [22] Yao, Y. J., Li, S. F. Y., *J. Chromatogr. A* 1994, 680, 431.
- [23] Cordova, E., Gao, J., Whitesides, G. M., *Anal. Chem.* 1997, 69, 1370 - 1379
- [24] Macia, A., Borrull, F., Calull, M., Aguilar, C., *Electrophoresis* 2004, 25, 3441.

- [25] Simó, C., Elvira, C., Gonzalez, N., San Roman, J., Barbas, C., Cifuentes, A., *Electrophoresis* 2004, 25, 2056–2064.
- [26] Ullsten, S., Zuberovic, A., Wetterhall, M., Hardenborg, E. *et al.*, *Electrophoresis* 2004, 25, 2090–2099.
- [27] Li, M., Liu, L., Wu, J. T., Lubman, D., *Anal. Chem.* 1997, 69, 2451–2456.
- [28] Kelly, J. F., Ramaley, L., Thibault, P., *Anal. Chem.* 1997, 69, 51–69.
- [29] Liu, T., Li, J. D., Zeng, R., Shao, X. X. *et al.*, *Anal. Chem.* 2001, 73, 5875 - 5885.
- [30] Lai, C. C., Her, G. R., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2000, 14, 2012–2018.

C- Conclusion

La mise en place du couplage en ligne de l'électrophorèse capillaire avec la spectrométrie de masse *via* une interface à électronébulisation, nécessite la présence d'un flux continu de liquide de la CE vers la MS, afin de maintenir un contact électrique pour la séparation électrophorétique. Cette condition est le plus souvent rencontrée lors de l'utilisation d'un capillaire en silice vierge, présentant un flux électroosmotique cathodique pour l'analyse de composés cationiques, migrant dans le sens coélectroosmotique, et pour l'analyse de composés anioniques, de faible mobilité électrophorétique, pouvant être entraînés vers l'interface ESI. Lorsque l'on se trouve dans le cas de figure où les anions à analyser ont une mobilité électrophorétique très élevée, supérieure à la mobilité électroosmotique, en valeur absolue, au sein du capillaire, la situation est un peu plus complexe. Dans ce contexte, deux stratégies efficaces ont été développées au cours de ce travail, permettant l'analyse simultanée de composés cationiques, anioniques et polyanioniques de mobilité élevée, par couplage CE/ESI-MS. Deux paramètres ont donc été pris en considération lors de cette étude: la direction et la vitesse du flux électroosmotique, ainsi que la surimposition d'une pression hydrodynamique à l'entrée du capillaire d'électrophorèse au cours de séparation, pouvant augmenter l'effet de succion, engendré par les arrivées de liquide additionnel et gaz nébulisant au niveau de l'interface ESI, et donc pouvant accélérer le mouvement du fluide au sein du capillaire d'électrophorèse.

La tentative d'accélération de la vitesse du flux électroosmotique cathodique d'une part par surimposition d'une pression hydrodynamique à l'entrée d'un capillaire en silice vierge ou d'autre part par l'accroissement du taux de charge négative sur la paroi interne du capillaire, par une modification dynamique par une double couche de polymères ne nous a pas permis de détecter les composés polyanioniques très mobiles, par CE/MS.

Finalement, deux stratégies nous ont donc permis la détection simultanée des composés cationiques et polyanioniques par couplage CE/ESI-MS. La première est l'utilisation d'un capillaire greffé par le polyméthylsiloxane (DB-1), avec application d'une tension négative à l'entrée du capillaire et la surimposition d'une pression hydrodynamique afin de contrebalancer l'écoulement électroosmotique cathodique résiduel. La seconde a été la modification dynamique sur des capillaires longs (sur une longueur de 1 m) en silice vierge à partir d'un polymère cationique couramment disponibles (le polybrène) en inversant l'écoulement

électroosmotique. Dans ce dernier cas, la surimposition d'une pression hydrodynamique à l'entrée du capillaire n'est pas toujours nécessaire.

Ces deux stratégies peuvent être appliquées à pratiquement toutes sortes de mélanges complexes, permettant l'analyse simultanée par couplage CE/MS de tous les composés anioniques et de presque tous les composés cationiques (selon l'effet de succion additionnel), avec des temps raisonnables (en moins de 30 minutes) et avec une bonne résolution.

D- Références

- [1] Cole, R. B. (Ed.), *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*, Wiley, New York **1997**.
- [2] Campa, C., Coslovi, A., Flamigni, A., Rossi, M., *Electrophoresis* **2006**, *27*, 2027–2050.
- [3] Catai, J. R., Sastre Torano, J., de Jong, G. J., Somsen, G.W., *Electrophoresis* **2006**, *27*, 2091–2099.
- [4] Yu, W., Li, Y., Deng, C., Zhang, X., *Electrophoresis* **2006**, *27*, 2100–2110.
- [5] Monton, R. M. N., Terabe, S., *Anal. Sci.* **2005**, *21*, 5–13.
- [6] Simpson, D. C., Smith, R. D., *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1291–1305.
- [7] Stutz, H., *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1254–1290.
- [8] Hernandez-Borges, J., Neusüb, C., Cifuentes, A., Pelzing, M., *Electrophoresis* **2004**, *25*, 2257–2281
- [9] Smyth, W. F., *Electrophoresis* **2006**, *27*, 2051–2062.
- [10] Soga, T., Ohashi, Y., Ueno, Y., Naraoka, H. K., Tomita, M., Nishioka, T., *J. Proteome Res.* **2003**, *2*, 488–494.
- [11] Simó, C., Barbas, C., Cifuentes, A., *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1306–1318.
- [12] Zhao, X., Lu, Y., Hardin, I., *Biotech. Lett.* **2005**, *27*, 69–72.
- [13] Himmelsbach, M., Klampf, C. W., Buchberger, W., *J. Sep. Sci.* **2005**, *28*, 1735–741.
- [14] Klampf, C., *Electrophoresis* **2006**, *27*, 3–34.
- [15] Soga, T., Ueno, Y., Naraoka, H., Ohashi, Y., Tomita, M., Nishioka, T., *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 2233–2239.
- [16] Katayama, H., Ishihama, Y., Asakawa, N., *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 5272–5277.
- [17] Cao, P., Mioni, M., *Electrophoresis* **1998**, *19*, 2200–2206.
- [18] Soga, T., Ueno, Y., Naraoka, H., Matzuda, K., Tomita, M., Nishioka, T., *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 6224–6229.
- [19] Soga, T., Ishikawa, T., Igarashi, S., Sugawara, K., Kakazu, Y. and Tomita, M., *J. Chromatogr. A*, **2007**, *1159*, 125–133.
- [20] Liu, Q., Lin, F., Hartwich, R.A., *Chromatographia* **1998**, *47*, 219
- [21] Liu, G., *Chromatographia* **1989**, *28*, 493
- [22] Sawada, H., Nogami, C., *Anal. Chim. Acta* **2004**, *507*, 191–198.
- [23] Chiari, M., Nesi, M., Righetti, P.G., in : P.G. Righetti (Ed.) *Capillary electrophoresis in Analytical Biotechnology*, CRC Press, Boca Raton, **1996**, p.1
- [24] Harada, K., Fukusaki, E., Kobayashi, A., *J. Biosci. Bioeng.* **2006**, *101*, 403–409.

CHAPITRE IV : Couplage en ligne de la focalisation isoélectrique capillaire avec la spectrométrie de masse *via* une interface à électronébulisation pour la caractérisation de protéines hydrophiles et hydrophobes

A-Introduction

La focalisation isoélectrique capillaire (CIEF), qui est la deuxième technique électrophorétique la plus populaire, permet la séparation de composés de nature amphotère, tels que les protéines. Celles-ci sont séparées selon leur point isoélectrique (pI) : un mélange d'ampholytes de pI légèrement différent et d'analytes est introduit dans le capillaire d'électrophorèse; sous l'action du champ électrique, un gradient de pH se forme grâce aux ampholytes le long du capillaire et les protéines chargées se déplacent vers la zone où le pH est égal à leur pI . Aucune force électromotrice ne s'exerce sur ces molécules dans cette zone focalisée car elles sont alors neutres, si l'écoulement électroosmotique est nul. Si elles diffusent dans une zone voisine de pH différent de leur pI , elles sont alors chargées et donc soumises au champ électrique jusqu'à ce qu'elles retournent dans leur zone de neutralité, à leur pI . Les zones focalisées sont par la suite mobilisées vers le détecteur par des voies diverses (par flux hydrodynamique [1-3], seul ou associé à l'application d'une tension électrique, par mobilisation chimique [4, 5], électroosmotique [6-9], ou par déplacement isotachophorétique [10]. La CIEF est considérée comme étant une méthode séparative avec un pouvoir de résolution des plus élevés parmi toutes les méthodes électrophorétiques, permettant même la séparation de protéines isoformes avec substitution délétion ou insertion d'un seul acide aminé, et avec une résolution autour de 0,02 par unité de pH. L'étape de focalisation permet de concentrer les protéines avec un facteur de 50 à 100 [11, 12], rendant les échantillons, même dilués, accessibles à l'analyse par spectrométrie de masse. La CIEF couplée en ligne avec la spectrométrie de masse est considérée comme une alternative prometteuse à la 2D-PAGE pour des analyses protéomiques plus rapides. Ce couplage permet de fournir des informations sur les pI et les masses moléculaires, avec de hautes capacités de résolution et des informations structurales améliorées, tout en en faisant abstraction des

inconvenients liés à l'électrophorèse sur gel conventionnelle, comme les limitations en termes de sensibilité et de débit, ainsi que les procédures de détection laborieuses [13].

Un couplage « off-line » CIEF/MS avec un détecteur MS-MALDI a été réalisé par Karger et al. [14, 15], avec un système de collecteur de fractions. Chartogne et al. [16] ont développé un système de collecteur sur cible. Un couplage d'un capillaire RPLC dans une première dimension, avec la CIEF en deuxième dimension, suivi par une détection MALDI-MS a également été développé [17, 18], par adsorption et concentration de fraction, et élimination des ampholytes par un lavage puis digestion tryptique, le tout sur la cible MALDI.

Le couplage en ligne de la CIEF avec la détection par spectrométrie de masse via une interface à électronébulisation présente quelques difficultés inhérentes à ce couplage : (i) le maintien du contact électrique requis pour les séparations électrophorétiques ; (ii) la nature et la composition de l'électrolyte arrivant du capillaire de séparation, qui devra être compatible avec les détecteurs MS ; et (iii) la nature de la paroi interne du capillaire de séparation qui devra également être compatible avec l'interface à électronébulisation. Ce couplage a montré des avancées remarquables [12, 13, 19, 20], cependant en raison des difficultés précédemment décrites, il a souvent été exécuté avec un protocole « semi-en-ligne », comme par exemple lors du premier essai du couplage de la CIEF avec la MS réalisé par Tang et al. en 1995 [21, 22], avec une interface à liquide additionnel coaxial. En effet, en raison de l'absence du réservoir de sortie dans la configuration du couplage CE/ESI-MS, différentes approches ont été proposées afin d'assurer le contact électrique pour le couplage potentiel en ligne CIEF/ESI-MS. L'une des approches consiste durant l'étape de focalisation, de positionner le capillaire de séparation dans l'aiguille d'interface, de manière à ce que l'extrémité ne dépasse pas de l'aiguille et le catholyte est délivré de manière coaxiale (*via* l'arrivée prévue pour le liquide additionnel) et un débit de gaz nébulisant est alors réduit afin d'assurer la formation d'une suspension statique de la goutte de catholyte à l'extrémité de l'aiguille d'électronébulisation. Une fois l'étape de focalisation terminée, on fait légèrement dépasser l'extrémité du capillaire de l'aiguille d'électronébulisation (0,5 mm) et l'anolyte est délivré via l'arrivée du liquide additionnel pour mobiliser des zones de protéine focalisées [23-25]. Dans une autre approche, le réservoir de catholyte a été placé à la sortie du capillaire durant l'étape de focalisation des protéines, puis retiré avant l'étape de mobilisation et le processus d'électronébulisation *via* le positionnement de l'interface [12, 21, 26-28]. Durant l'étape de mobilisation, les ions (anions) du liquide additionnel s'introduisent dans le capillaire de séparation (attirés par l'anode), et perturbent la zone du gradient de pH formée ; mais également ralentissent la migration des protéines vers la source d'ESI [12]. Cette frontière

ionique qui se déplace, pourrait également contribuer à une perte de résolution et une inversion de l'ordre de migration. La solution à cet inconvénient serait de générer un flux hydrodynamique induit par la gravité pendant l'étape de mobilisation [13, 22]. Dans ces deux approches, la coupure du champ électrique entre les étapes de focalisation et de mobilisation gêne l'automatisation de la méthode et peut induire une perte d'efficacité de la séparation. Afin de permettre la continuité entre les étapes de focalisation et de mobilisation, une autre approche propose une nouvelle configuration. Celle-ci consiste en l'utilisation du liquide additionnel comme anolyte pour l'étape de focalisation isoélectrique, mais également pour favoriser le processus d'électrospray. Le catholyte sera donc placé à l'entrée du capillaire de séparation et la polarité sera inversée [29]. Mais le déplacement de la frontière peut toujours se produire dans cette configuration. Une autre configuration consiste à coupler la CIEF-cITP transitoire/CZE avec un analyseur FTICR-MS. Cela a démontré des améliorations significatives en termes de résolution, de sensibilité et de débit d'analyse [30].

L'autre contrainte lors de la mise en place d'un couplage entre la CIEF et MS est la nature et la composition des fluides entrant dans la source du spectromètre de masse, c'est-à-dire la présence d'un gel anticonvectif et d'ampholytes afin de réaliser le gradient pH pour la focalisation isoélectrique. Bien que les rapports m/z des ampholytes soient pour la plupart au dessous de la gamme de masse de la majorité des protéines, leur présence dans le spray de d'électronébulisation engendre une diminution de l'intensité du signal MS en raison du phénomène de suppression d'ionisation [21, 31-33] d'une part, mais également un bruit de fond supplémentaire dans le signal et diminue la résolution en masse. Des approches proposant d'éviter l'introduction des ampholytes dans la source MS ont été développées. Un système de microdialyse est placé à la jonction de l'interface à électronébulisation permettant d'éliminer les ampholytes du fluide arrivant de la CE, évitant ainsi l'interférence des composés lors de la détection MS [34-37] mais ce système a été rarement employé car très laborieux à mettre en place. Le couplage en ligne de la CIEF et la chromatographie liquide en phase inverse (RPLC) avec une détection ESI-MS est une autre approche pour contourner les problèmes liés à la présence des ampholytes lors de la détection MS [31, 38-42]. En ce qui concerne le gel aqueux de polyacrylamide usuellement employé en CIEF-UV, il est particulièrement à éviter lorsque la CIEF est couplée à la MS, en raison de son incompatibilité avec le détecteur MS. L'utilisation d'un milieu (ou matrice) purement aqueux pour les étapes de focalisation et de mobilisation pourrait augmenter l'effet de convection au sein du capillaire. En outre, dans ce milieu aqueux, les protéines hydrophobes ne pourraient pas être correctement caractérisées.

La dernière principale contrainte concerne la modification de la paroi interne du capillaire de séparation. La CIEF est habituellement réalisée avec des capillaires dont la paroi interne a été modifiée avec des polymères de nature hydrophile, tels que le polyacrylamide, ou l'alcool polyvinylique [21, 26, 27, 31, 43, 44] afin de supprimer ou au moins de réduire le flux électroosmotique. Cependant, peu de polymères, usuellement utilisés en CIEF-UV sont compatibles avec les conditions d'interface et de détection MS. L'extrémité du capillaire modifié au niveau de l'aiguille d'interface chauffe du à la présence du gaz nébulisant ($T_{NG} = 100^{\circ}\text{C}$ dans notre configuration), pouvant engendrer une instabilité du greffage et un relargage du polymère vers la source du spectromètre de masse [45-51].

Dans cette étude, nous proposons un nouveau couplage en ligne intégré entre la CIEF et la MS, répondant aux principales contraintes décrites ci-dessus, c'est-à-dire (i) le couplage en ligne automatisé tenant compte du maintien du contact électrique entre les étapes de focalisation et de mobilisation, (ii) l'utilisation d'un milieu (ou matrice) anticonvectif permettant la caractérisation de protéines hydrophiles et hydrophobes, tout en étant compatible avec le détecteur MS et (iii) l'utilisation d'un capillaire de séparation en silice vierge afin d'éviter l'utilisation de capillaire greffés dont le recouvrement peut parfois être long et laborieux et/ou présenter un coût onéreux. Dans une étude précédente [52], nous avons démontré la faisabilité de réaliser une CIEF en milieu eau/glycérol pour l'analyse et la caractérisation de protéines hydrophiles et hydrophobes. Grâce à sa viscosité élevée, le glycérol, connu pour stabiliser et solubiliser des protéines hydrophobes, joue également, dans ce cas de figure, le rôle de milieu anticonvectif et permet aussi l'utilisation de capillaires de silice vierge, car il réduit considérablement le flux électroosmotique. La bonne concordance avec la séparation obtenue par le système CIEF conventionnel, a indiqué l'adéquation de ce système. En outre, ce système semble être une alternative prometteuse, comparé au gel aqueux conventionnel de la CIEF, pour la caractérisation de protéines hydrophobes dans des conditions natives. Dans cette étude nous avons mis en place un couplage entre la CIEF en milieu eau/glycérol et la détection par ESI-MS et un mélange de six protéines standards a été analysé et séparé.

B- Article

ON-LINE CAPILLARY ISOELECTRIC FOCUSING ELECTROSPRAY IONIZATION MASS SPECTROMETRY FOR HYDROPHOBIC AND HYDROPHILIC PROTEIN CHARACTERIZATION

Abstract

A new on-line coupling of capillary isoelectric focusing (CIEF) with electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) that allows for hydrophilic and hydrophobic protein characterization has been developed. This improved protocol provides (i) the electric continuity during the whole analysis by a partial filling of the capillary with 60:40 (cm/cm) catholyte / protein-ampholyte mixture, (ii) the use of an anticonvective medium, i.e. 30:70 glycerol/water (v/v), compatible with MS detection and allowing for hydrophobic protein solubilization (iii) and the use of unmodified bare fused-silica capillaries, as the glycerol/water medium strongly reduces EOF. Focusing was performed in positive polarity and cathodic mobilization was achieved by both voltage and pressure application. The set-up was optimized with respect to analysis time, sensitivity and pI determination precision. The optimized anolyte and catholyte were composed of 50 mM formic acid / 1 mM glutamic acid (pH 2.35) and 100 mM NH₃ / 1 mM lysine (pH 10.6), respectively. The effects of ampholyte concentration, focusing time and ESI parameters were presented for model proteins and discussed. This new integrated protocol should be an easy and effective additional tool for proteome characterization, providing a means for the characterization of a large number of hydrophilic and hydrophobic proteins.

Introduction

CIEF, which is the second most popular CE mode, allows separating amphoteric compounds, like proteins, according to their isoelectric point (pI): a mixture containing carrier ampholytes of slightly different pI and the sample is introduced into a capillary; under an electric field, a pH gradient is formed by the carrier ampholytes along the capillary, and the proteins migrate until they reach the point of the capillary where the pH value matches their pI and they stop there. The focused zones are mobilized to reach the detector by various ways (i.e. hydrodynamic flow¹⁻³ either alone or combined with voltage application, chemical mobilization^{4, 5}, electroosmosis⁶⁻⁹ or isotachophoretic displacement¹⁰). CIEF is considered to provide the highest resolving power of all CE modes, even separating protein isoforms with single amino acid substitution, deletion or insertion, and affords a resolution of around 0.02 pI unit. The focusing effect concentrates proteins by a factor of 50-100^{11, 12}, making even diluted samples accessible to MS detection. CIEF coupled on-line with MS is regarded as a promising alternative to 2-D PAGE for fast proteome analysis, providing information on pI and M_r , with high resolving capabilities and enhanced structural information, omitting drawbacks of conventional slab-gel electrophoresis, such as restrictions in sensitivity and throughput as well as tedious staining procedures¹³.

The off-line CIEF-MS coupling with MALDI-MS detection has been realized by Karger et al^{14, 15}, with fraction collection. Chartogne et al¹⁶ developed an on-target collection system, with subsequent matrix mixing for the off-line coupling of CIEF to MALDI-MS. A coupling of capillary reversed-phase LC (RPLC) as the first dimension with CIEF as the second dimension followed by MALDI-MS was developed^{17, 18}, with incorporation of fraction adsorption and concentration, ampholyte removal by washing and tryptic digestion on the MALDI-target.

On-line coupling CIEF-MS coupling using ESI interfaces presents some difficulties; among which (i) maintaining the electrical continuity required for the electrophoretic separation; (ii) the compatibility of the composition of the fluid arising from the separation capillary with MS detector; and (iii) the compatibility and resistance of the inner wall of the separation capillary with the ESI interface. Although this coupling has shown remarkable advances^{12, 13, 19, 20}; it has however been mainly performed thus far in a semi-on-line protocol, as exemplified in the first report on CIEF coupling to MS with a sheath flow interface by Tang et al in 1995^{21, 22}. Indeed, due to the inherent absence of the outlet vial in CE-ESI-MS

configuration, different approaches have been utilized to ensure electrical continuity during separation and detection. One of them consists in retracting the CE capillary into the ESI needle and in coaxially delivering the catholyte as the sheath liquid (SL) under reduced nebulizing gas flow rate to ensure the formation of a static hanging catholyte drop at the tip of the ESI needle. Once the focusing step is terminated, the capillary tip is passed out of the ESI needle and analyte is delivered via the (SL) line to mobilize protein bands²³⁻²⁵ Alternatively, a catholyte reservoir is attached to the capillary outlet during protein focusing and is removed prior to the mobilization and spray process via the manual positioning of the interface^{12, 21, 26-28}. During the mobilization, ions from the SL enter the capillary, shift the pH gradient and make the proteins migrate towards the ESI source¹². This moving ionic boundary however could also contribute to a loss in resolution and an inversion of migration order but the problems could be remediated by applying a gravity-induced hydrodynamic flow during mobilization^{13, 22}. In these two configurations, the removal of electric field between the focusing and the mobilizing steps hinders automation and can result in a loss of separation efficiency. To avoid switching of electric field from focusing to mobilizing, a new configuration was proposed consisting in employing the sheath liquid as the anolyte for isoelectric focusing and as an aid to electrospray performance, the catholyte being at the capillary entrance²⁹. But moving boundary may still occur. Another configuration consists in coupling CIEF-transient cITP/CZE with FTICR-MS, that furthermore demonstrated significant improvements in resolution, sensitivity and throughput³⁰.

The other constraint for the set up of a coupling between CIEF and MS is the composition of the fluids required by CIEF, i.e. the presence of ampholytes and an anticonvective gel to establish and stabilize the pH gradient. Although the m/z values of ampholytes are mostly beyond the m/z range of most proteins, their presence in the sprayed solution causes a reduction in the MS signal intensity due to ion suppression^{21, 31-33} and background signal, and decreases the mass resolution. Approaches aiming at preventing the ampholytes from entering the ion source have been developed. A microdialysis system at the ESI junction may allow the removal of the ampholytes out of the CE effluent leading to interference-free detection of proteins³⁴⁻³⁷, but this complicated system has not gained wide acceptance. The on-line combination of CIEF and RPLC with ESI-MS detection is another option to circumvent ampholyte-related detection problems^{31, 38-42}. Concerning aqueous polyacrylamide gel medium currently employed in CIEF-UV, it is most often not incorporated when CIEF is coupled to MS, due to its incompatibility with the MS detector, but the use of a

purely aqueous medium for focusing and mobilizing could lead to more convective effect. Furthermore, in aqueous medium, hydrophobic proteins cannot be correctly characterized.

The last main constraint concerns the chemical modification of the inner wall of the separation capillary. So as to suppress or at least lower EOF, CIEF is usually performed in fused-silica capillaries coated with hydrophilic moieties, such as polyacrylamide or polyvinylalcohol^{21, 26, 27, 31, 43, 44}. However, few wall modifications are compatible with MS interfacing conditions, i.e. heating at the last few centimetres of the capillary outlet by the nebulizing gas, which may lead to coating breakage and risk of bleeding⁴⁵⁻⁵¹.

In this paper, we propose a new on-line coupling between CIEF and MS, that satisfies the main constraints described above, i.e. (i) unattended preservation of electric continuity, (ii) the use of a MS compatible anticonvective medium that allows for hydrophilic and hydrophobic protein stabilization and (iii) the use of a bare fused-silica separation capillary that precludes the use of expensive and short-lifetime coated capillaries. Indeed, in a previous work⁵², we demonstrated the feasibility of performing CIEF in glycerol-water media and in uncoated capillaries for hydrophilic and hydrophobic proteins. Thanks to its high viscosity, glycerol, which is known to better solubilize and stabilize hydrophobic proteins, can both play the role of anticonvective medium and allow employing bare silica capillaries, as it considerably reduces EOF. The good concordance with separations obtained by the conventional CIEF implementation indicated the adequacy of this system. Furthermore, this system appeared to be a promising alternative to conventional aqueous gel CIEF for hydrophobic protein characterization under native conditions. The set-up of the coupling between this original glycerol-water CIEF and ESI-MS was investigated in this work and evaluated with a standard mixture of six proteins.

EXPERIMENTAL SECTION

Chemicals and reagents

The CIEF kit comprising an aqueous gel, phosphoric acid, sodium hydroxide, carrier ampholytes pH 3–10 and protein markers ribonuclease A (Rnase, $pI = 9.45$, Mr 13 676 Da), carbonic anhydrase II (CA II, $pI = 5.9$, Mr 29 080 Da), β -lactoglobulin A (β -Lac, $pI = 5.1$, Mr 18 357 Da) was obtained from Beckman Instruments (Fullerton, CA, USA). α -chymotrypsinogen A type II (α -Tryp, bovine pancreas $pI = 8.3$, Mr 25 661 Da), myoglobin (Myo, horse heart $pI = 6.3$, Mr 16 946 Da), trypsin inhibitor (TI, type I-S soy bean $pI = 4.5$, Mr 19 982 Da), glycerol, acetic acid and formic acid were purchased from Sigma-Aldrich-Fluka (St.-Quentin Fallavier, France). Methanol of Normapure grade and lysine were from Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France) and glutamic acid and ammonia from Merck (Darmstadt, Germany). Water used throughout was produced by an Alpha Q system (Millipore, Bedford, MA, USA).

CE apparatus

CE was performed with an HP^{3D}CE instrument (Agilent Technologies, Massy, France) equipped with a UV absorbance DAD. This apparatus automatically realizes all the steps of the analytical protocols, including capillary conditioning, sample introduction, voltage application and diode array detection, and allows running unattended method sequences. Separations were realized in 50 μm id (360 μm od) x 100 cm or 80 cm bare fused-silica capillaries (Photonlines, Marly-le-Roi, France). New capillaries were conditioned by successive flushes with 1 M and 0.1 M NaOH and then with water under a pressure of 93.5 kPa for 15 min each. The temperature in the capillary cassette was set at 25°C. The acquisition rate was 10 points/s. Between runs, capillaries were rinsed with water for 3 min, 10 mM HCl for 10 min and finally water for 5 min. Capillaries were rinsed with water and dried by air when not in use.

MS detection

An Agilent Series 1100 MSD single quadrupole mass spectrometer (Agilent Technologies, Massy, France) equipped with an orthogonal ESI source was used in the

positive ionization mode. In the optimized conditions, nitrogen was used as nebulising gas (NG) at a temperature of 100°C (pressure 55 kPa) and as drying gas (DG) at 350°C (flow rate, 7 L.min⁻¹). Optimized ESI and skimmer voltage were 3500 V and 10 V, respectively. Peak width and dwell time were set to 0.3 min and 880 ms, respectively. CE-MS coupling was carried out using a SL coaxial ESI interface (Agilent Technologies). The sheath liquid (50:50 v/v MeOH-H₂O mixture containing 1% v/v acetic acid) was delivered by an Agilent series 1100 isocratic HPLC pump (flow rate, 6 μL.min⁻¹, in the optimized conditions).

CIEF-MS protocols

For the glycerol-water CIEF system, the separation was performed in bare fused-silica capillaries. Glycerol was diluted with water in proportions 30:70, 20:80 or 10:90 v/v. The separation electrolyte was made up with the carrier ampholyte mixture pH 3–10 (0.5 to 2 % v/v) supplemented in the glycerol-water medium. The proteins to separate were added to this electrolyte at concentrations between 0.019 and 0.228 mg/mL. Prior to loading, the electrolyte was vortexed for 10 s and centrifuged for 10 min at 5000 rpm to homogenize and avoid air bubbles. According to cases, anolytes were 30 mM glutamic acid (pH 3.35), 50 mM formic acid (pH 2.5), or 50 mM formic acid// 1 mM glutamic acid (pH 2.35) in the glycerol-water mixture ; catholytes were 100 mM ammonia (pH 11.2), 100 mM ammonia / 50 mM lysine (pH 11.6) or 100mM ammonia /1 mM lysine (pH 10.6) in the glycerol-water mixture. By doing so, anolyte and catholyte viscosity was the same as that of the separation electrolyte, which prevented dispersion during the mobilization step due to viscosity differences. For a 80 cm length, the capillaries were flushed for 3 min at 950 mbar with the catholyte and next the ampholytes/proteins mixture was injected over a capillary length equal to 40 cm (taking into account the viscosity of the mixture). Unless otherwise specified, the focusing step was achieved by applying a voltage of 30 kV for 6 min. Mobilization to cathodic side was performed under a 50 mbar pressure, while maintaining focusing voltage applied, until all proteins were detected.

RESULTS AND DISCUSSION

CIEF separations are usually performed with neutral coated fused-silica capillaries in aqueous anticonvective gels. In a previous paper, we demonstrated that glycerol, a very viscous solvent, was a promising alternative to conventional aqueous gels for CIEF separations⁵². A 30:70 (v/v) glycerol-water medium appeared as a good compromise for performing CIEF in a bare fused-silica capillary, as it strongly reduced EOF. Moreover, as glycerol is known to help stabilize any kind of proteins and solubilize hydrophobic ones, this mixture appeared interesting for hydrophobic protein characterization, under their native form⁵². As one of the main constraints for coupling classical CIEF to MS detection via an ESI interface is the presence of gel in the separation medium, the coupling of glycerol-water CIEF with MS seemed a promising way and was therefore investigated. It has been previously shown that addition of glycerol to electrospray of protein solutions results in an increase in the number of charge states in the gas-phase, related to the high surface tension of glycerol⁵³. Furthermore, such addition at levels up to 43% did not measurably affect the intensity of ESI signal. When glycerol-water mixtures with 10 to 30% glycerol were employed during this study, no clogging of the MS transfer capillary was observed and no specific washing had to be performed between runs. The second main constraint for an on-line CIEF-ESI-MS coupling is to maintain the electric contact for the CE separation, although the outlet vial is replaced by the ESI interface, so as to perform a real unattended “on-line” coupling providing better efficiency and reproducibility. The general configuration selected during this study for CIEF-ESI-MS was as follows : (1) SL consisted in a 50:50 (v/v) MeOH-H₂O mixture containing 1% v/v acetic acid, so as to help for positive ionization of the proteins, as the positive ionization mode is more sensitive than the negative ionization mode ; (2) a discontinuous electrolyte filling was performed in a 100 cm length separation capillary : the 60 cm closest to the interface were filled with the catholyte and the 40 cm closest to the capillary inlet were filled with the proteins/ampholyte mixtures. The lengths selected for the partial filling have been optimized in CIEF-UV with respect to total analysis time and peak efficiencies. The inlet vial contained the anolyte and the electrophoretic separation was performed under positive voltage (Figure 1).

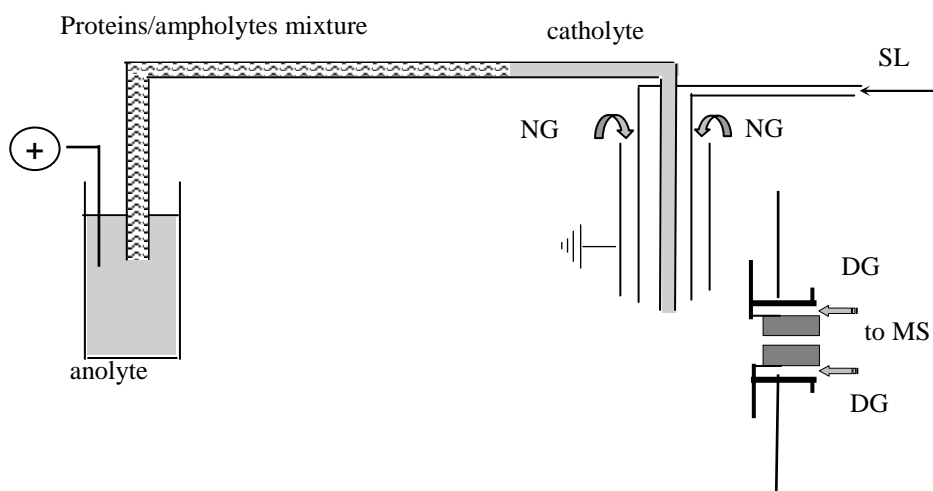


Figure 1 : Schematic representation of the on-line glycerol/water CIEF-ESI-MS protocol developed in this work for separation in bare fused-silica capillaries.
 SL: sheath liquid, NG: nebulizing gas. DG: drying gas.

This configuration allows an actual on-line coupling, i.e. no discontinuity in electric field application took place during the entire process. Furthermore, the fact that the length of the protein/ampholytes mixture is shorter than the total capillary length permitted shorter detection times for the pH gradient zone, and thus globally shorter analysis time. Likewise, the contact between the pH gradient zone and the catholyte was not located at the interface, which improved the electrospray stability. After the focusing step (under a 30 kV voltage), a 50 mbar pressure was applied, while keeping the same voltage to move the entire content of the capillary to the detector. This original configuration was optimized with respect to anolyte and catholyte composition, ampholyte concentration, glycerol content, so as to verify the compatibility of the various components entering the interface with the SL. Some parameters inherent to the interface, i.e. SL flow rate, NG pressure and DG temperature, were also optimized with respect to sensitivity and resolution of the overall analytical process. The study was performed with a mixture of model proteins, ribonuclease A (Rnase, $pI = 9.45$), α -chymotrypsinogen A type II (α -Tryp, $pI = 8.3$), myoglobin (Myo, $pI = 6.3$), carbonic anhydrase II (CA II, $pI = 5.9$), β -lactoglobulin A (β -Lac, $pI = 5.1$), trypsin inhibitor (TI, $pI = 4.5$). During the study, it was observed that myoglobin altered after a one-day dilution in the glycerol/water medium, leading to an unexplained shift in M_r from 16946 to 17564 Da..

Anolyte and catholyte composition

Anolyte and catholyte must be compatible with on-line MS detection, which is not the case for the ones mostly employed in classical CIEF, i.e. phosphoric acid and sodium hydroxide, respectively. In the few papers allowing for on-line MS detection, acetic acid was employed as anolyte^{23, 29, 34, 37} and ammonium acetate²⁹ or ammonium hydroxide^{23, 37} as catholyte³⁷. In this study, different acidic and basic solutions that were compatible with MS detection and could provide a correct frontier with the 3 -10 pH gradient were tested, the separation being discussed with respect to the time span of the pH gradient zone and resolution: formic and glutamic acid as anolytes, and NH₃ and lysine as catholytes (Table 1).

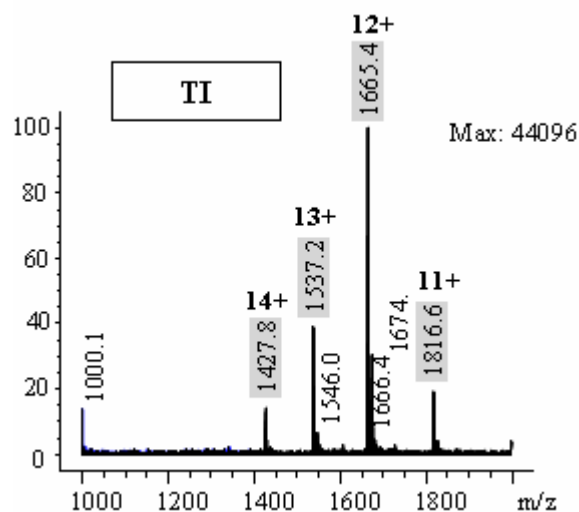
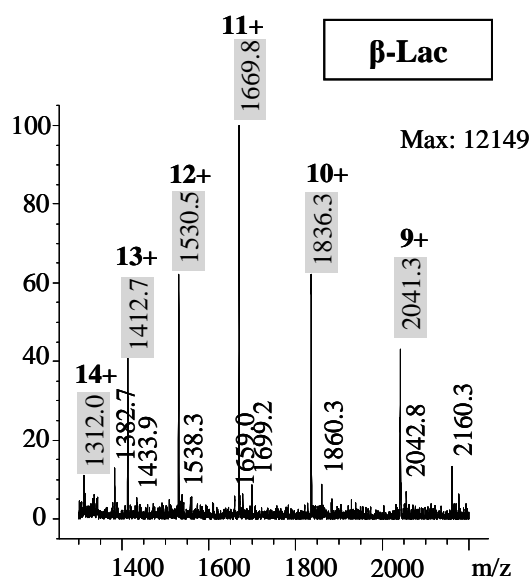
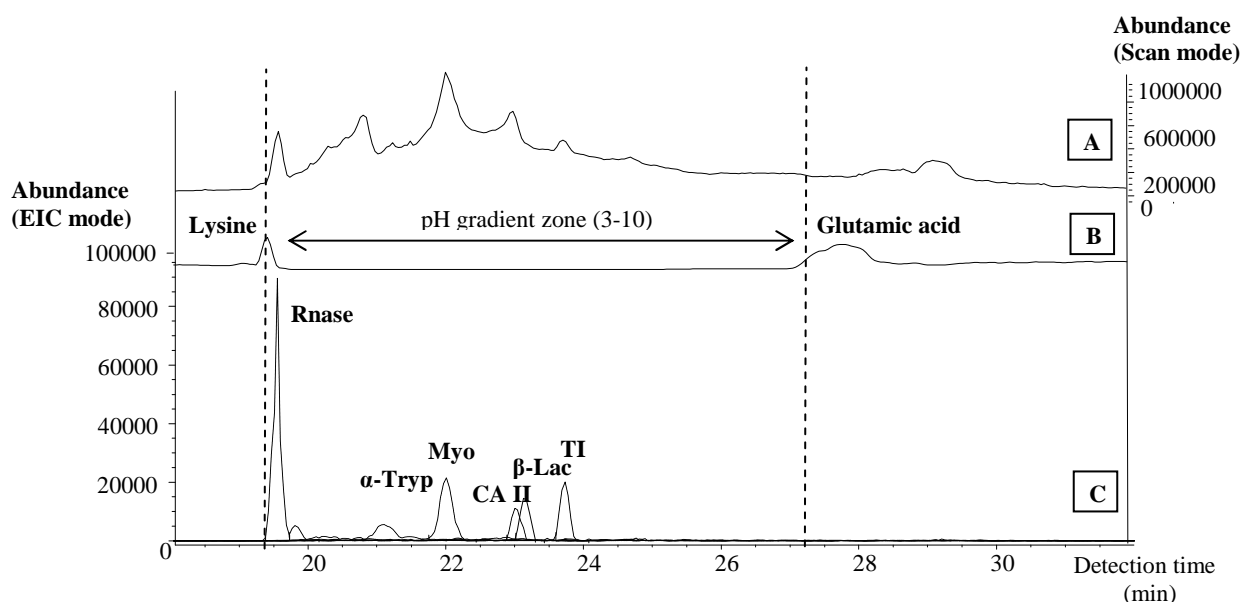
Anolyte	Catholyte	Detection times of the pH gradient frontiers (min)		Time span of the pH gradient zone (min)	Rs (CA II/ β -Lac)
		cathodic	anodic		
50 mM formic acid (pH 2.5)	100 mM NH ₃ (pH 11.2)	28	40	12	0.64
30 mM glutamic acid (pH 3.35)	100 mM NH ₃ (pH 11.2)	57	75	18	0.45
30 mM glutamic acid (pH 3.35)	100 mM NH ₃ / 50 mM lysine (pH 11.6)	24	32	8	0.76
50 mM formic acid / 1 mM glutamic acid (pH 2.35)	100 mM NH ₃ / 1 mM lysine (pH 10.6)	23	31	8	0.65

Table 1. Time span of the pH gradient zone and peak resolution between CA II and β -Lac (differencing by 0.8 unit in pI) for different compositions of anolyte and catholyte.

Experimental conditions : see Figure 2, except for anolyte and catholyte nature and capillary length (100 cm).

The detection times include the focusing and mobilizing steps, thus corresponding to the overall analysis times. As compound velocities passing through the detector can be considered identical, the time span can be directly correlated to the spatial span in the capillary. As glutamic acid (*Mr* 146.2) and lysine (*Mr* 147.1) are easily detectable by MS, they were finally added in small quantity in the anolyte and catholyte respectively, so as to visualize the limits of the pH gradient zone. 50 mM formic acid / 1 mM glutamic acid (pH 2.35) and 100 mM NH₃ / 1 mM lysine (pH 10.6) were retained as anolyte and catholyte, respectively, as they provided short analysis time, for similar resolutions, and low MS noise. Figure 2 presents both the overall scan mode MS signal (Fig. 2A), the single ion monitoring

(SIM) mode signal allowing for the detection of the limits of pH gradient zone (Fig 2B) and the extracted ion current (EIC) signal (Fig. 2C) for each protein, indicating a very good resolving power of the MS detector for the 6 model proteins within 5 min, due to the specific MS detection. The mass spectra of the proteins are also presented in Figure 2. For these model proteins, the EIC signals were two to three times lower than the ones obtained in SIM mode; nevertheless, the EIC mode allows to identify an unlimited number of protein peaks in a single run, provided that there was no ionization suppression for proteins detected simultaneously. This on-line protocol thus appears as a powerful tool for fast analysis of both hydrophilic and hydrophobic proteins, through their characterization in terms of pI and molecular mass.



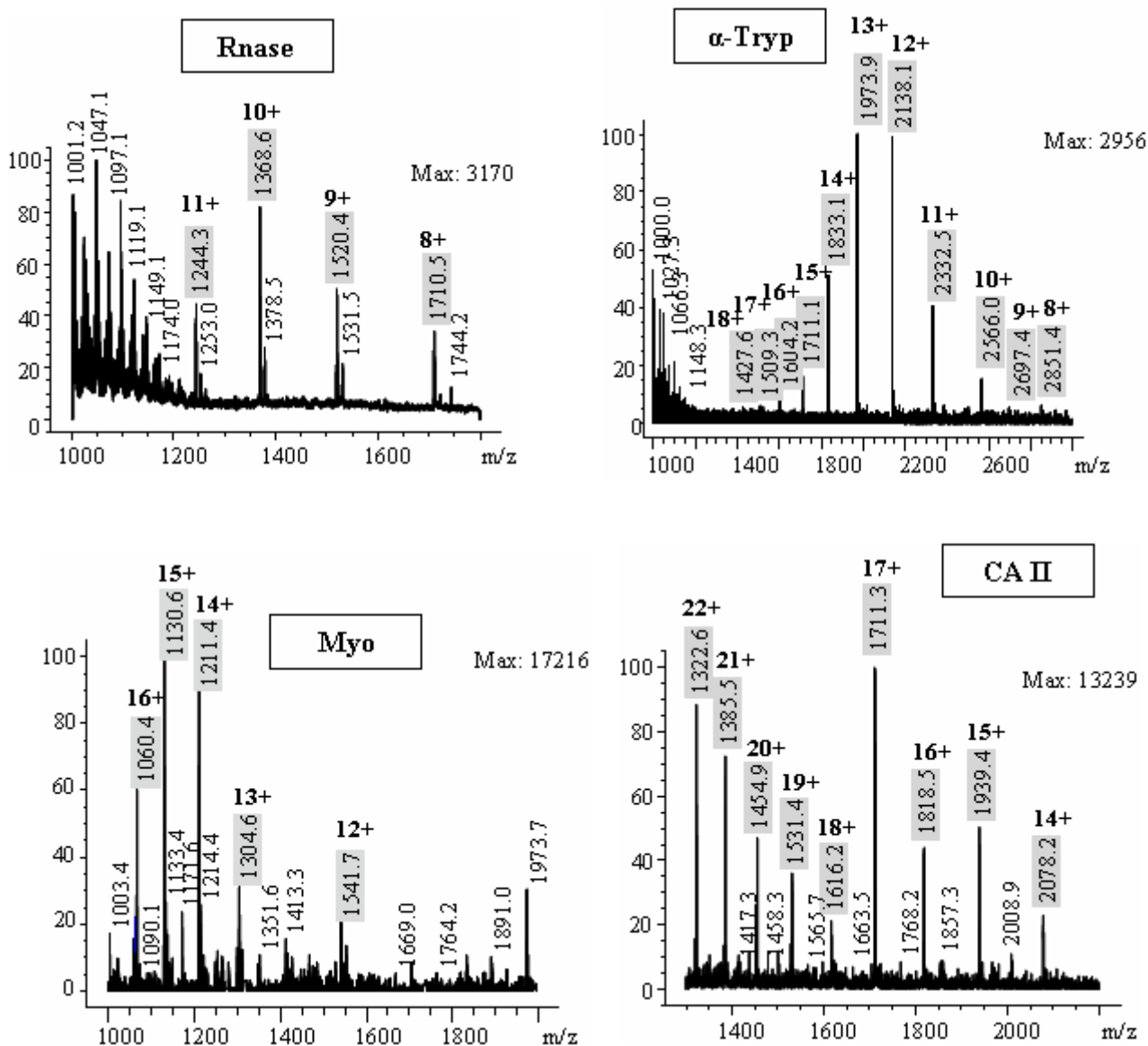


Figure 2 : On-line CIEF-ESI-MS and extracted MS spectra of six model proteins.

(A) Scan mode (m/z 1000-2500) electropherogram ; (B) SIM mode (m/z 148) electropherogram ; (C) EIC mode electropherogram : Rnase (m/z 1369), α -Tryp (m/z 2139), Myo (m/z 1211), CA II (m/z 1940), β -Lac (m/z 2041), TI (m/z 1666). Mass spectra of the six model proteins extracted from the average scan under the peak in Fig. 2A.

Bare fused-silica capillary, 50 μ m ID x 80 cm. Separation electrolyte: Beckman ampholyte mixture, pH 3-10 (1.5% v/v) in 30:70 v/v glycerol-water mixture, containing Rnase (0.22 mg/mL), α -Tryp (0.037 mg/mL), Myo (0.037 mg/mL), CA II (0.037 mg/mL), β -Lac (0.037 mg/mL), TI (0.037 mg/mL). Anolyte: 50 mM formic acid / 1 mM glutamic acid (pH 2.35) in 30:70 v/v glycerol-water mixture. Catholyte: 100 mM NH_3 / 1 mM lysine (pH 10.6) in 30:70 v/v glycerol-water mixture. Focusing : 30 kV for 6 min. Cathodic mobilization: 50 mbar, 30 kV. Cassette temperature: 25°C.

MS conditions : sheath liquid: water-methanol (1:1, v/v) with 1% (v/v) acetic acid ; flow rate : 6 μ L/min. Nebulizing gas : nitrogen (100°C, 55 kPa). Drying gas: nitrogen (350°C, 7 L/min). Positive ionization mode. ESI voltage: 3500 V. Skimmer voltage : 10V.

Ampholyte concentration and focusing time

The ampholytes were introduced in the separation capillary at various concentrations, ranging from 0.5 to 2% (v/v) and the focusing time, i.e. the time allowed for the focusing step, was varied from 6 to 13 min. Table 2 presents the results in terms of the time span of the pH gradient zone and peak intensity for two proteins, CA and TI.

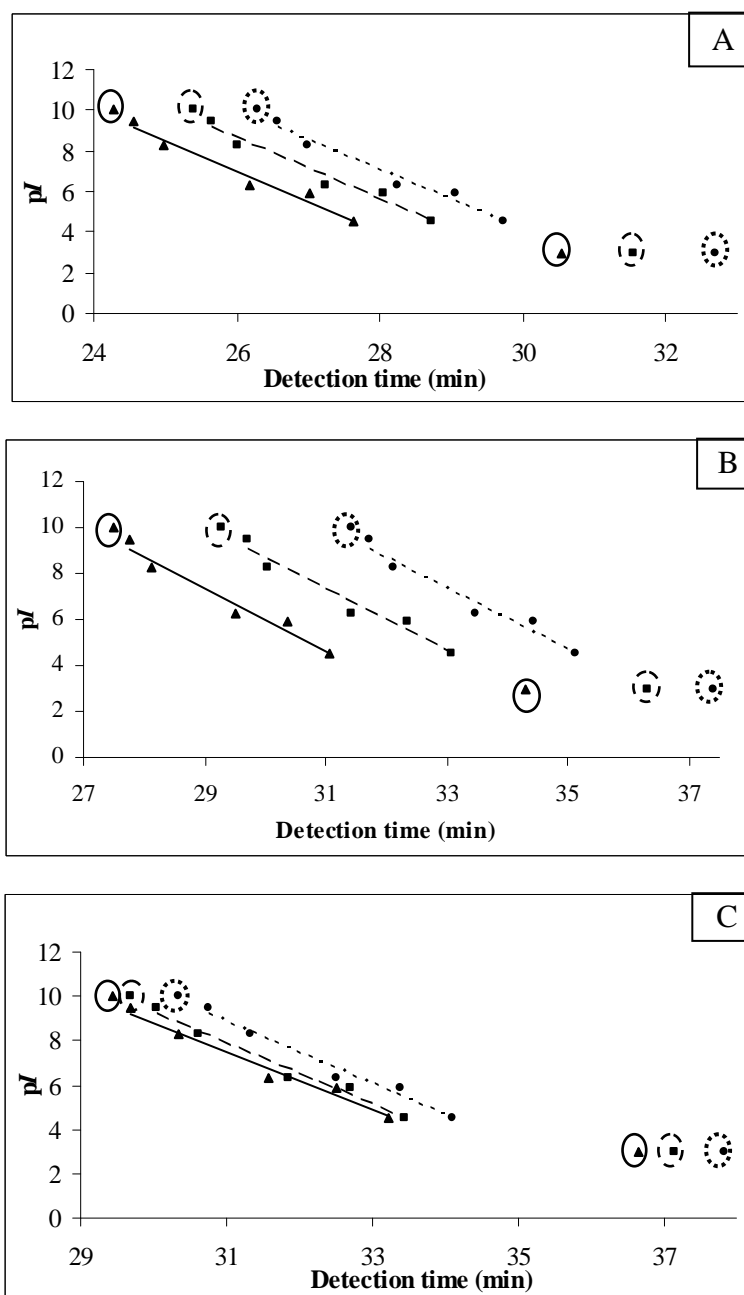
Peak intensities (MS detection) (%) *							Detection times of the pH gradient frontiers (min) (Times span of the pH gradient zone in min)			
% ampholyte	CA II			TI			% ampholyte	Focusing time (min)		
	6	10	13	6	10	13		6	10	13
0.5	100	23.8	7.4	100	61.5	77.8	0.5	31.4 to 39.9 (8.5)	32.7 to 41.4 (8.7)	33.1 to 41.1 (8)
1	97.9	53.3	60	49.6	100	100	1	29.4 to 36.7 (7.3)	29.7 to 37.2 (7.5)	30.3 to 37.9 (7.6)
1.5	85.6	100	100	70.1	97.5	90.2	1.5	28 to 35 (7)	29.5 to 36.5 (7)	31.4 to 37.6 (6.2)
2	50.9	6.5	64.5	51.6	16.2	83	2	24 to 30.5 (6.5)	25.5 to 31.5 (6)	26.5 to 32.7 (6.2)

* 100 corresponds to the highest peak intensity

Table 2. Time span of peak intensities and pH gradient zone for CA II and TI as a function of ampholyte concentration and focusing time.
Experimental conditions : see Figure 2

Whatever the focusing time, a maximum was obtained for each protein peak intensity and efficiency, while varying the ampholyte content. The influence of ampholyte concentration was already studied²¹ and it was reported that an increase in ampholyte concentration led to a decrease in peak intensity, a decrease in protein charge state on the mass spectrum and an increase in protein migration times. In the present study, the existence of an intensity maximum indicates that a compromise should be found between separation performances, favored by high ampholyte concentration, and detection performances, favored by low ampholyte concentration. The observed maximum appeared to depend on the protein nature through the protein ionization rate and ampholyte concentration. When determining the time span of the pH gradient zone (Table 2), it appeared that the lower the ampholyte concentration, the larger the pH gradient zone and the higher the detection time. Upon increasing the focusing time, the increase in overall analysis time is markedly lower than the increase in focusing time. Indeed, during focusing, the pH gradient zone is moving slowly to

the capillary outlet, as a result of the residual EOF and suction effect existing under this CE-MS configuration⁵⁴. Figure 3 shows the plot of pI in terms of detection time for 5 model proteins, indicating a good linearity whatever the experimental conditions.



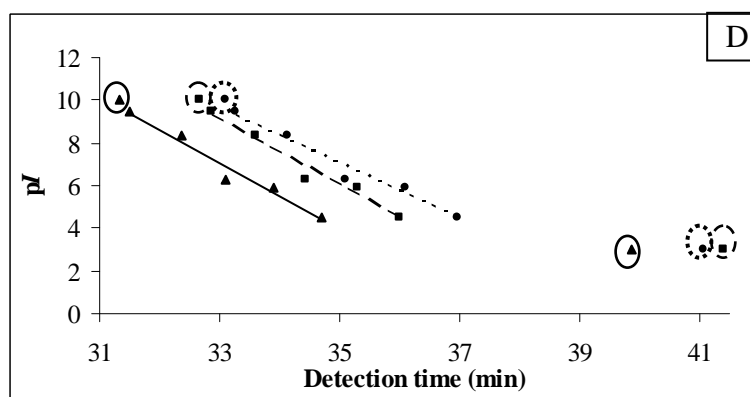


Figure 3 : Protein pI as a function of detection time for various ampholyte concentrations and focusing times.

Experimental conditions : see Figure 2, except for focusing time (6 min (▲), 10 min (■), 13 min (●)) and ampholyte concentration : 2% (A), 1.5% (B), 1% (C), 0.5% (D).

Least-squares regression straight lines : (A) 6 min : $y = -1,48x + 45,5$ ($R^2 = 0,97$) ; 10 min : $y = -1,48x + 47,2$ ($R^2 = 0,97$) ; 13 min : $y = -1,46x + 47,9$ ($R^2 = 0,97$) ; (B) 6 min: $y = -1,36x + 46,9$ ($R^2 = 0,97$) ; 10 min: $y = -1,34x + 48,8$ ($R^2 = 0,96$) ; 13 min: $y = -1,34x + 51,2$ ($R^2 = 0,96$) ; (C) 6 min: $y = -1,33x + 48,8$ ($R^2 = 0,97$) ; 10 min: $y = -1,38x + 50,7$ ($R^2 = 0,98$) ; 13 min: $y = -1,39x + 52,2$ ($R^2 = 0,97$) ; (D) 6 min: $y = -1,56x + 58,5$ ($R^2 = 0,97$) ; 10 min: $y = -1,54x + 59,9$ ($R^2 = 0,97$) ; 13 min: $y = -1,31x + 52,6$ ($R^2 = 0,97$).

The limits of pH gradient zone are also indicated in Figure 3 as surrounded points. It has to be noted that the pH values of the anolyte and catholyte are *ca* 0.6 pH unit lower and higher, respectively, than the pH gradient limits of the carrier ampholyte mixture. The surrounded points featuring the basic frontier correctly fit the regression straight line, whereas the points featuring the acidic frontier are apart from this line, corresponding to much higher detection times. One explanation could be that the basic frontier was going past the detector first, whereas the acidic frontier could be more perturbed due to the longer influence of pressure application, as it went past the detector last. The shift for the acidic frontier was observed for all the analytes tested in this study, which could also indicate a possible distortion of the pH gradient zone on the acidic pH side, may be due to the presence of more ampholytes in this pH region. Finally, a 6 min focusing time was considered optimum as it provided satisfactory results in less total analysis time. As far as the ampholyte concentration was concerned, the mass spectra of the ampholytes may interfere with the protein spectra. In the glycerol/water medium used in this work, they were mainly detected in the 800 to 1200 m/z and in the 1000 to 1400 m/z range in the basic and acidic region of the pH gradient, respectively. So, their interferences could be more pronounced for the acidic proteins. Nevertheless, the ratios of the higher peak abundance of the more acidic protein, TI, to the ampholyte, that are detected at different m/z values (see Figure 2), were 1.2, 1.5, 4.3 and 19

for 2, 1.5, 1 and 0.5 % ampholytes concentration, respectively. However, at 1.5% ampholyte concentration, TI was well detected either in the SIM mode or in the EIC mode. Finally, a 1.5% ampholyte concentration seemed to be a good compromise with respects to the signal to noise ratio for all six proteins tested.

Glycerol concentration

The CIEF protocol developed previously⁵² dictates a 30% glycerol content in water (v/v) so as to take advantage of both the anticonvective effect due to a high viscosity and a low EOF. As the capillary in CIEF-MS is around three times longer than in classical CIEF-UV arrangement, reducing the glycerol content could be a sound way to reduce the analysis time, by lowering viscosity and enhancing EOF. The glycerol content in the separation media was therefore revisited. Upon increasing glycerol content from 10 to 30 %, both peak intensity and efficiency increased (see maximum abundance for Rnase in Figure 4, for example). In effect, by increasing viscosity, focusing could be more efficient in leading to a thinner, concentrated protein zone. The increase in glycerol content in the medium also favored an increase in the number of charges in gas-phase, as shown for Rnase ions (Figure 4): from 10 to 30% glycerol, the abundance ratio between the peaks corresponding to 10+ and 9+ charge states increased from 0.82 to 1.17. Furthermore, the time span of the pH gradient zone were 9 to 13 min, 13 to 18 min and 23 to 30 min for 10, 20 and 30% glycerol, respectively, and higher efficiencies were obtained for the highest glycerol concentration. This indicates that the higher the glycerol content, the larger the pH gradient zone and the longer the total analysis time (within an acceptable time range), that helps for better protein focusing.

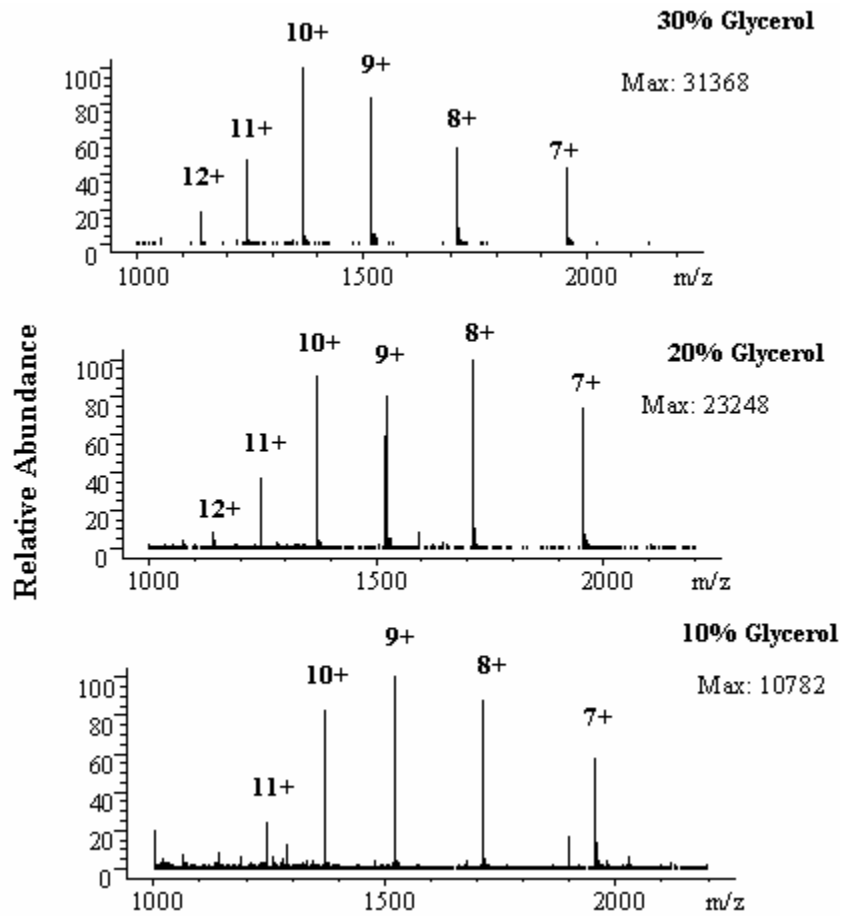


Figure 4 : Representative mass spectra of Ribonuclease A (0.22 mg/mL) at different glycerol concentrations.

Experimental conditions : see Figure 2, except for glycerol concentration.

Protein *pI*s were plotted as a function of protein detection time for the three preceding glycerol/water proportions (Figure 5). The slope of the curve is smaller for the higher glycerol content, allowing for an easier *pI* determination when an unknown protein has to be characterized. So, 30% glycerol appeared again as the best compromise as regards intensity, efficiency and precision on *pI* determination.

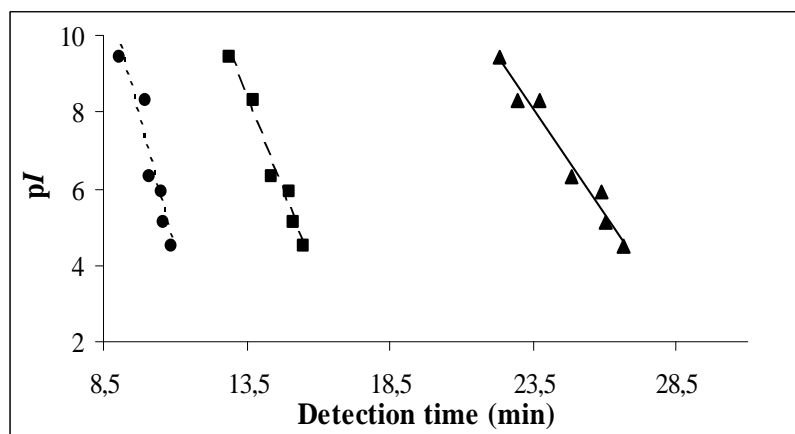


Figure 5 : Protein pI as a function of detection time for various glycerol concentrations.

Experimental conditions: see Figure 2, except for glycerol concentration : 10% (●), 20% (■), 30% (▲).

Least-squares regression straight lines: (●): $y = -2,81x + 35,2$ ($R^2 = 0,90$); (■) : $y = -1,95x + 34,7$ ($R^2 = 0,97$) ; (▲): $y = -1,09x + 33,8$ ($R^2 = 0,97$);

ESI interface parameters

First of all, the DG temperature was varied between 200 and 350°C. The highest protein peak intensities were obtained for 350°C, indicating that protein ionization/desorption was better completed at the highest DG temperature without protein degradation. Upon varying NG pressure between 40 and 70 kPa, a maximum in protein peak intensity and efficiency was obtained at 55 kPa (Table 3).

NG pressure (kPa)	Peak intensity (%)				
	Rnase	α -Tryp	CA II	β -Lac	TI
41.5	61	61	89	46	36
55	100	87	100	100	100
69	20	100	25	65	71

* 100 corresponds to the highest peak intensity

Table 3. Protein peak intensities as a function of NG pressure.

Experimental conditions: see Figure 2.

Furthermore, the slopes of the plots of pI versus detection time remained identical on varying NG pressure (Figure 6), which indicates that the length of the pH gradient within the capillary was not affected by this parameter. Figure 6 also shows that, the higher the NG pressure, the smaller the detection time, as can be anticipated from the increase in suction effect due to NG⁵⁴. Thus a NG pressure of 55 kPa appeared as a good compromise between a higher ionization/desorption efficiency and a shorter time allowed for focusing, that are expected on increasing NG pressure (as long as the spray remains stable).

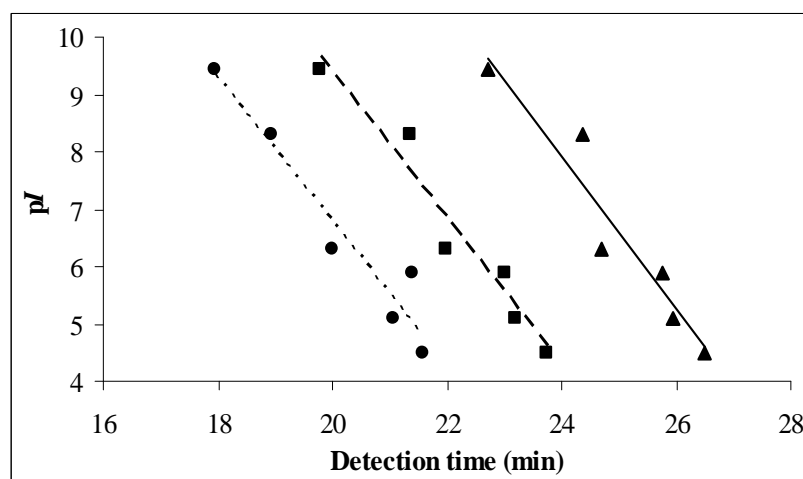


Figure 6 : Protein pI as a function of detection time for various NG pressures.

Experimental conditions : see Figure 2, except for NG pressure : 41.5 kPa (\blacktriangle), 55 kPa (\blacksquare), 69 kPa (\bullet).

Least-squares regression straight lines : (\blacktriangle) : $y = -1,26x + 31,9$ ($R^2 = 0,93$) ; (\blacksquare) : $y = -1,27x + 34,7$ ($R^2 = 0,95$) ; (\bullet) : $y = -1,34x + 40,0$ ($R^2 = 0,92$).

The SL flow rate was then varied between 4 and 8 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$: maximum peak intensities were obtained at 6 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ for α -Tryp; β -Lac and TI, and at 8 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ for Rnase (Table 4). In the ESI interface configuration, SL flow rate has been shown to be a parameter significantly influencing suction, dilution and ionization/desorption efficiency^{54, 55}. In current conditions, SL flow rate tends to increase suction effect, but to a lower extent than NG pressure. In the present case, no influence of SL flow rate on detection time was observed, which can be understood considering the specially high medium viscosity and capillary length. Besides, SL flow rate is the main parameter influencing dilution effect, as dilution results from the mixing of the BGE with the SL at the interface, in the presence of the NG. Ionization/desorption efficiency is known to first increase and next decrease on increasing SL,

and to depend on protein nature. Eventually, protein peak intensities reflect both the influence of dilution and ionization/desorption efficiency.

SL ($\mu\text{L}/\text{min}$)	Rnase		α -tryp		CA II		β -Lac		TI	
	Peak height (%)	N (%)	Peak height (%)	N (%)	Peak height (%)	N (%)	Peak height (%)	N (%)	Peak height (%)	N (%)
4	37	94	32	98	82	98	50	83	26	68
6	100	72	100	100	82	97	100	100	100	100
8	77	100	58	70	100	100	51	76	83	88

* 100 corresponds to the highest peak intensity

Table 4. Protein peak intensities as a function of SL flow rate.
Experimental conditions: see Figure 2.

Conclusions

ESI-MS offers many advantages over traditional UV detection for CIEF separations. The coupling of both instruments combines resolving power with high precision mass determination. Although not providing physical separation according to molecular mass, CIEF-MS thus appears a valuable alternative to a 2D-PAGE separations, as it also actually provides information on pI and molecular mass, but with added potential advantages including better ease of automation, greater speed and direct mass measurements and likely enhanced sensitivity. In this context, a new original protocol intended for on-line CIEF-MS of all types of proteins is presented herein. To our knowledge, this automated on-line coupling allies for the first time (i) an effective electric continuity during the whole analysis by a partial filling of the capillary with 60:40 (cm/cm) catholyte / protein-ampholyte mixture ; (ii) an anticonvective medium, a. 30:70 glycerol/water (v/v), that is compatible with MS detection and that allows for hydrophobic protein solubilization and (iii) consistency with unmodified bare fused-silica capillaries, as the glycerol/water medium strongly reduces EOF, which precludes the use of expensive and short-lifetime coated fused-silica capillaries. The anolyte and catholyte composition were selected to be compatible with MS detection and to allow for the localization of the pH gradient zone, by adding MS markers. Further optimization with respect to peak intensity and efficiency, total analysis time and precision on pI determination

was performed by investigating ampholyte concentration, focusing time, glycerol content, DG temperature, NG pressure and SL flow rates. This new protocol should be an effective tool in proteome characterization for samples of intermediate complexity, providing a means for the identification of a number of hydrophilic and hydrophobic proteins. As the feasibility of employing glycerol/water medium and bare fused-silica capillary in CIEF-MS was demonstrated in this work, in the future this new protocol could be applied to the coupling of CIEF to more sophisticated MS analyzers, such as Fourier transform ion cyclotron resonance (FTICR)^{12, 56}, with a view to improve sensitivity.

References

- (1) Rodriguez-Diaz, R.; Zhu, M.; Wehr, T. *Electrophoresis* **1997**, *18*, 2134.
- (2) Righetti, P.G.; Gelfi, C.; Conti, M. J. *Chromatogr. B* **1997**, *699*, 91
- (3) Chen, S.-M.; Wiktorowicz, J. E. *Anal. Biochem.* **1992**, *206*, 84.
- (4) Hjerten, S.; Liao, J.-L.; Yao, K. *J. Chromatogr.* **1987**, *387*, 127.
- (5) Rodriguez-Diaz, R.; Zhu, M.; Wehr, T. *J. Chromatogr. A* **1997**, *772*, 145.
- (6) Mazzeo, J.R.; Krull, I.S. *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 2852.
- (7) Caslavská, J. ; Molteni, S. ; Chemlik, J. ; Slais, K., Matulík, F.; Thormann, W. *J. Chromatogr. A* **1994**, *680*, 549.
- (8) Kilar, F.; Vegvari, A.; Mod, A. *J. Chromatogr. A* **1998**, *813*, 349.
- (9) Hoffman, O. ; Che, D., Cruickshank, K.A. ; Muller, U.R. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 678.
- (10) Mosher, R.A.; Saville, D.A.; Thormann, W. *The dynamics of Electrophoresis*, VCH Publishers, Weinheim, **1992**.
- (11) Yang, L.; Tang, Q. ; Harrata, A.K. ; Lee, C.S. *Anal. Biochem.* **1996**, *243*, 140.
- (12) Yang, L. ; Lee, C.S. ; Hofstadler, S.A. ; Pasa-Tolic, L.; Smith, R.D. *Anal. Chem.* **1998**, *70* 3235.
- (13) Jensen, P.K. ; Pasa-Tolic, L. ; Peden, K.K.; Martinovic, S.; Lipton, M.S.; Anderson, G.A.; Tolic, N.; Wong, K.-K.; Smith, R.D. *Electrophoresis* **2000**, *21*, 1372.
- (14) Minarik, M. ; Foret, F. ; Karger, B.L. *Electrophoresis* **2000**, *21*, 247.
- (15) Foret, F. ; Muller, O. ; Thoren, J. ; Götzinger, W.; Karger, B.L. *J. Chromatogr. A* **1996**, *716*, 157.
- (16) Chartogne, A. ; Gaspari, M. ; Jespersen, S. ; Buscher, B., Verheij, E., Van der Heijden, R., Tjaden, U., van der Greef, J., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2002**, *16*, 201.
- (17) Mao, Y., Zhang, X., *Electrophoresis* **2003**, *24*, 3289.
- (18) Yu, W.; Yan, L.; Deng, C.; Zhang, X. *Electrophoresis* **2006**, *27*, 2100.
- (19) Martinovic, S. ; Berger, S.J. ; Pasa-Tolic, L. ; Smith, R.D. ; *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5356.
- (20) Silvertand, L. H. H. ; Sastre Torano, J. ; van Bennekom, W. P. ; de Jong, G. J. ; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1204*, 157.
- (21) Tang, Q. ; Harrata, A.K. ; Lee, C.S. *Anal. Chem* **1995**, *67*, 3515.
- (22) Tang, Q. ; Harrata, A.K. ; Lee, C.S. *Anal. Chem* **1996**, *68*, 2482.
- (23) Clarke, N.J. ; Naylor, S. *Biomedical Chromatogr.* **2002**, *16*, 287.
- (24) Liu, T. ; Shao, X.-X. ; Zheng, R. ; Xia, Q.-C. *Acta Biochim. Biophys. Sinica* **2002**, *34*, 423.

- (25) Kuroda, Y.; Yukinaga, H.; Kitano, M.; Noguchi, T.; Nemati, M.; Shibukawa, A.; Nakagawa, T.; Matsuzaki, K. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *37*, 423.
- (26) Tang, Q.; Harrata, A.K.; Lee, C.S. *J. Mass Spectrom.* **1996**, *31*, 1284.
- (27) Wei, J.; Yang, L.; Harrata, A.K.; Lee, C.S. *Electrophoresis* **1998**, *19*, 2356.
- (28) Tang, Q.; Harrata, A.K.; Lee, C.S. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 3177.
- (29) Zhang, Q.C.-X.; Xiang, F.; Pasa-Tolic, L.; Anderson, G.A.; Veenstra, T.D.; Smith, R.D. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1462.
- (30) Mohan, D.; Pasa-Tolic, L.; Masselon, C. D.; Tolic, N.; Bogdanov, B.; Hixson, K. K.; Smith R. D.; Lee, C. S. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 4432.
- (31) Zhou, F.; Johnston, M.V. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 2734.
- (32) Storms, H.F.; Van der Heijden, R.; Tjaden, U.R.; Van der Greef, J. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 3461.
- (33) Storms, H.F.; Van der Heijden, R.; Tjaden, U.R.; Van der Greef, J. *J. Chromatogr. B* **2005**, *824*, 189.
- (34) Lamoree, M.H.; Tjaden, U.R.; Van der Greef, J. *J. Chromatogr. A* **1997**, *777*, 31.
- (35) Lamoree, M.H.; Van der Hoefer, R.A.M.; Tjaden, U.R.; Van der Greef, J. *Mass Spectrom.* **1998**, *33*, 453.
- (36) Storms, H. F.; Van der Heijden, R.; Tjaden, U. R.; Van der Greef, J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 3491.
- (37) Yang, L.; Lee, C.S.; Hofstadler, S.A.; Smith, R.D. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4945.
- (38) Zhou, F.; Johnston, M.V. *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1383.
- (39) Zhou, F.; Hanson, T. E.; Johnston, M.V. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 7145.
- (40) Chen, J.; Balgley, B. M.; DeVoe, D. L.; Lee, C. S. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 3145.
- (41) Wang, W.; Guo, T.; Song, T.; Lee, C. S.; Balgley, B. M. *Proteomics* **2007**, *7*, 1178.
- (42) Wang, W.; Guo, T.; Rudnick, P. A.; Song, T.; Li, J.; Zhuang, Z.; Zheng, W.; DeVoe, D. L.; Lee, C. S.; Balgley, B. M. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 1002.
- (43) Martinovic, S.; Pasa-Tolic, K.L.; Masselon C.; Jensen, P.K.; Stone, C.L.; Smith, R.D. *Electrophoresis* **2000**, *21*, 2368.
- (44) Jensen, P.K.; Harrata, A.K.; Lee, C.S. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 2044.
- (45) Simo, C.; Elvira, C.; Gonzalez, N.; San Roman, J.; Barbas, C.; Cifuentes, A. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 2056.
- (46) Ullsten, S.; Zuberovic, A.; Wetterhall, M.; Hardenborg, E.; Markides, K.E.; Bergquist, J. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 2090.
- (47) Li, M.; Liu, L.; Wu, J.T.; Lubman, D. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2451.

- (48) Kelly, J.F. ; Ramaley, L. ; Thibault, P. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 51.
- (49) Liu, T. ; Li, J.D. ; Zeng, R.; Shao, X.X., Wang, K.Y.; Xia, Q.C. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5875.
- (50) Lai, C.C.; Her, G.R. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**, *14*, 2012.
- (51) Soga, T. ; Ueno, Y. ; Naraoka, H.; Ohashi, Y. ; Tomita, M.; Nishioka, T. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 2233.
- (52) Busnel, J.M. ; Varenne, A. ; Descroix, S. ; Peltre, G. ; Gohon, Y. ; Gareil, P. *Electrophoresis* **2005**, *26*, 3369.
- (53) Iavarone, A.T. ; Williams, E.R., *International J. Mass Spectrom.* **2002**, *219*, 63.
- (54) Mokaddem, M., Gareil, P., Belgaied, J.E., Varenne, A. *Electrophoresis* **2008**, *29*, 1957-1964.
- (55) Mokaddem, M., Gareil, P., Belgaied, J.E., Varenne, A. *Electrophoresis* **submitted**
- (56) Jensen, P. K. ; Pasa-Tolic, L. ; Anderson, G.A. ; Horner, J.A. ; Lipton, M.S. ; Bruce, J.E. ; Smith, R.D. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 2076.

C-Conclusion

L'ESI-MS présente des avantages majeurs comparativement à la détection UV, traditionnellement utilisée lors de séparations par CIEF. Le couplage entre ces deux instruments analytiques permet d'obtenir simultanément une résolution élevée et une détermination précise des masses moléculaires des composés analysés. Le couplage CIEF/ESI-MS apparaît donc comme une alternative de choix à la séparation 2D-PAGE, sachant qu'elle fournit d'une part des informations sur les *pI* et les masses moléculaires, mais présente également des avantages potentiels supplémentaires, notamment la facilité d'automatisation de la méthode, des temps d'analyses beaucoup plus courts et permet d'accéder directement aux masses moléculaires. Dans ce contexte, nous avons donc mis en place un nouveau protocole intégré « original », qui permet d'améliorer le couplage de la CIEF avec la spectrométrie de masse, pour l'analyse de tout type de protéines. Au moment de la rédaction de cette thèse et à notre meilleure connaissance, ce couplage automatisé en une seule étape, allie pour la première fois :

- une continuité électrique, durant tout le processus d'analyse, grâce à un remplissage partiel du capillaire : catholyte / mélange protéines-ampholytes dans les proportions 60:40 (cm/cm),
- un gel anticonvectif, glycérol/eau 30:70 (v/v), compatible avec la détection MS, et permettant la solubilisation des protéines hydrophiles et hydrophobes,
- l'utilisation de capillaires en silice vierge non modifiés, sachant que le milieu glycérol/eau réduit fortement le flux électroosmotique, se passant ainsi de l'utilisation de capillaires greffés couteux et à faible durée de vie.

La composition du catholyte et de l'anolyte a été optimisée, afin d'être compatible avec la détection MS et de permettre la localisation de la zone du gradient de pH, par l'ajout de marqueurs MS. D'autres facteurs ont également été optimisés tels que la concentration des ampholytes, le temps de focalisation, la teneur en glycérol, la température du gaz séchant, la pression du gaz nébulisant, ainsi que le débit du liquide additionnel, tenant compte de l'intensité des pics et de leur efficacité, du temps d'analyse total et de la précision pour la détermination des *pI*. Ce nouveau protocole devrait être un outil efficace pour la caractérisation de mélange de protéines de complexité moyenne, offrant l'avantage de pouvoir analyser simultanément un mélange de plusieurs protéines hydrophobes et hydrophiles. Au cours de ce travail nous avons donc démontré la faisabilité d'un couplage CIEF/ESI-MS en

milieu glycérol/eau avec l'utilisation d'un capillaire en silice vierge. Dans le futur, ce nouveau protocole pourrait être appliqué au couplage de la CIEF avec des analyseurs MS plus sophistiqués, tel que l'analyseur FTICR [12, 53].

D-Références

- (1) Rodriguez-Diaz, R.; Zhu, M.; Wehr, T. *Electrophoresis* **1997**, *18*, 2134-2144
- (2) Righetti, P.G.; Gelfi, C.; Conti, M. *J. Chromatogr. B* **1997**, *699*, 91-104
- (3) Chen, S.-M.; Wiktorowicz, J. E. *Anal. Biochem.* **1992**, *206*, 84-90
- (4) Hjerten, S.; Liao, J.-L.; Yao, K. *J. Chromatogr.* **1987**, *387*, 127-138
- (5) Rodriguez-Diaz, R.; Zhu, M.; Wehr, T. *J. Chromatogr. A* **1997**, *772*, 145-160
- (6) Mazzeo, J.R.; Krull, I.S. *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 2852-2857
- (7) Caslavská, J. ; Molteni, S. ; Chemlik, J. ; Slais, K., Matulík, F.; Thormann, W. *J. Chromatogr. A* **1994**, *680*, 549-559
- (8) Kilar, F.; Vegvari, A.; Mod, A. *J. Chromatogr. A* **1998**, *813*, 349-360
- (9) Hoffman, O. ; Che, D., Cruickshank, K.A. ; Muller, U.R. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 678-686
- (10) Mosher, R.A.; Saville, D.A.; Thormann, W. *The dynamics of Electrophoresis*, VCH Publishers, Weinheim, **1992**.
- (11) Yang, L.; Tang, Q. ; Harrata, A.K. ; Lee, C.S. *Anal. Biochem.* **1996**, *243*, 140-149.
- (12) Yang, L. ; Lee, C.S. ; Hofstadler, S.A. ; Pasa-Tolic, L.; Smith, R.D. *Anal. Chem.* **1998**, *70* 3235-3241
- (13) Jensen, P.K. ; Pasa-Tolic, L. ; Peden, K.K.; Martinovic, S.; Lipton, M.S.; Anderson, G.A.; Tolic, N.; Wong, K.-K.; Smith, R.D. *Electrophoresis* **2000**, *21*, 1372-1380.
- (14) Minarik, M. ; Foret, F. ; Karger, B.L. *Electrophoresis* **2000**, *21*, 247-254
- (15) Foret, F. ; Muller, O. ; Thoren, J. ; Göttinger, W.; Karger, B.L. *J. Chromatogr. A* **1996**, *716*, 157-166
- (16) Chartogne, A. ; Gaspari, M. ; Jespersen, S. ; Buscher, B. Verheij, E., van der Heijden, R., Tjaden, U., Van der Greef, J., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2002**, *16*, 201-207.
- (17) Mao, Y., Zhang, X., *Electrophoresis* **2003**, *24*, 3289-3295
- (18) Yu, W.; Yan, L.; Deng, C.; Zhang, X. *Electrophoresis* **2006**, *27*, 2100-2110
- (19) Martinovic, S. ; Berger, S.J. ; Pasa-Tolic, L. ; Smith, R.D. ; *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5356-5360.
- (20) Silvertand, L. H. H. ; Sastre Torano, J. ; van Bennekom, W. P. ; de Jong, G. J. ; *J. Chromatogr. A* **2008**, *1204*, 157-170.
- (21) Tang, Q. ; Harrata, A.K. ; Lee, C.S. *Anal. Chem* **1995**, *67*, 3515-3519.
- (22) Tang, Q. ; Harrata, A.K. ; Lee, C.S. *Anal. Chem* **1996**, *68*, 2482-2487
- (23) Clarke, N.J. ; Naylor, S. *Biomedical Chromatogr.* **2002**, *16*, 287-297

- (24) Liu, T. ; Shao, X.-X. ; Zheng, R. ; Xia, Q.-C. *Acta Biochim. Biophys. Sinica* **2002**, *34*, 423-432.
- (25) Kuroda, Y.; Yukinaga, H.; Kitano, M.; Noguchi, T.; Nemati, M.; Shibukawa, A.; Nakagawa, T.; Matsuzaki, K. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *37*, 423-428.
- (26) Tang, Q.; Harrata, A.K.; Lee, C.S. *J. Mass Spectrom.* **1996**, *31*, 1284-1290.
- (27) Wei, J. ; Yang, L. ; Harrata, A.K. ; Lee, C.S. *Electrophoresis* **1998**, *19*, 2356-2360.
- (28) Tang, Q. ; Harrata, A.K. ; Lee, C.S. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 3177-3182.
- (29) Zhang, QC.-X. ; Xiang, F. ; Pasa-Tolic, L. ; Anderson, G.A. ; Veenstra, T.D. ; Smith, R.D. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1462-1468.
- (30) Mohan, D. ; Pasa-Tolic, L. ; Masselon, C. D. ; Tolic, N. ; Bogdanov, B. ; Hixson, K. K. ; Smith R. D. ; Lee, C. S. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 4432-4440.
- (31) Zhou, F. ; Johnstone, M.V. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 2734-2740.
- (32) Storms, H. F., van der Heijden, R., Tjaden, U. R., van der Greef, J., *Electrophoresis* **2004**, *25*, 3461-3467
- (33) Storms, H. F., van der Heijden, R., Tjaden, U. R., van der Greef, J., *J. Chromatogr. B* **2005**, *824*, 189-200
- (34) Lamoree, M.H. ; Tjaden, U.R. ; Van der Greef, J. *J. Chromatogr. A* **1997**, *777*, 31-39.
- (35) Lamoree, M.H. ; van der Hoefer, R.A.M. ; Tjaden, U.R. ; Van der Greef, J. *Mass Spectrom.* **1998**, *33*, 453-460.
- (36) Storms, H. F. ; Van der Heijden, R. ; Tjaden, U. R. ; Van der Greef, J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 3491-3497
- (37) Yang, L.; Lee, C.S.; Hofstadler, S.A.; Smith, R.D. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4945-4950.
- (38) Zhou, F.; Johnston, M.V. *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1383-1388.
- (39) Zhou, F.; Hanson, T. E. ; Johnston, M.V. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 7145-7153.
- (40) Chen, J. ; Balgley, B. M. ; DeVoe, D. L. ; Lee, C. S. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 3145-3152.
- (41) Wang, W. ; Guo, T. ; Song, T. ; Lee, C. S. ; Balgley, B. M. *Proteomics* **2007**, *7*, 1178-1187.
- (42) Wang, W. ; Guo, T. ; Rudnick, P. A. ; Song, T. ; Li, J. ; Zhuang, Z. ; Zheng, W. ; DeVoe, D. L. ; Lee, C. S. ; Balgley, B. M. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 1002-1009.
- (43) Martinovic, S. ; Pasa-Tolic, KL. ; Masselon C. ; Jensen, P.K. ; Stone, C.L. ; Smith, R.D. *Electrophoresis* **2000**, *21*, 2368-2375.
- (44) Jensen, P.K. ; Harrata, A.K. ; Lee, C.S. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 2044-2049.
- (45) Simo, C. ; Elvira, C. ; Gonzalez, N.; San Roman, J.; Barbas, C.; Cifuentes, A. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 2056-2064.

- (46) Ullsten, S. ; Zuberovic, A. ; Wetterhall, M. ; Hardenborg, E.; Markides, K.E.; Bergquist, J. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 2090-2099.
- (47) Li, M. ; Liu, L. ; Wu, J.T. ; Lubman, D. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2451-2456
- (48) Kelly, J.F. ; Ramaley, L. ; Thibault, P. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 51-60.
- (49) Liu, T. ; Li, J.D. ; Zeng, R.; Shao, X.X., Wang, K.Y.; Xia, Q.C. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5875-5885.
- (50) Lai, C.C.; Her, G.R. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**, *14*, 2012-2018.
- (51) Soga, T. ; Ueno, Y. ; Naraoka, H.; Ohashi, Y. ; Tomita, M.; Nishioka, T. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 2233-2239
- (52) Busnel, J.M. ; Varenne, A. ; Descroix, S. ; Peltre, G. ; Gohon, Y. ; Gareil, P. *Electrophoresis* **2005**, *26*, 3369.
- (53) Jensen, P. K. ; Pasa-Tolic, L. ; Anderson, G.A. ; Horner, J.A. ; Lipton, M.S. ; Bruce, J.E. ; Smith, R.D. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 2076.

Conclusion générale

Depuis cette dernière décennie le couplage CE/ESI-MS a connu un engouement accru et ce dans divers domaines d'applications, car il permet d'avoir un mode de détection très sensible et sélectif, et d'apporter une information sur la structure chimique des analytes. C'est dans ce contexte que nos travaux se sont portés sur l'étude du couplage de l'électrophorèse capillaire avec la spectrométrie de masse, *via* une interface à électronébulisation (CE/ESI-MS), qui est l'interface la plus couramment employée, et en particulier la compréhension des phénomènes à l'interface et le développement de nouvelles méthodologies pour des échantillons complexes et pour les séparations par focalisation isoélectrique.

Dans un premier temps, nous nous sommes penchés sur l'étude des phénomènes inhérents à l'interface à électronébulisation à liquide additionnel coaxial, la plus communément utilisée pour la mise en place d'un couplage CE/ESI-MS. Une étude approfondie a été réalisée sur l'effet de succion apparaissant avec cette interface triple entrée à liquide additionnel coaxial. Il est apparu que cet effet était non seulement généré par le mélangeage des trois fluides de l'interface à la pointe du capillaire (c'est-à-dire gaz nébulisant, liquide additionnel et électrolyte de séparation), et dépendait des vitesses respectives de chacun d'eux, mais également par la position du capillaire au niveau de l'aiguille d'interface ou encore la température du gaz séchant. Il a été démontré au cours de cette étude que l'effet de succion était principalement influencé par le débit du gaz nébulisant. Cependant, la position du capillaire de séparation, le débit de liquide additionnel, et le flux d'électrolyte ont tout de même un impact, moins important, mais significatif sur ce phénomène. Une étude approfondie sur l'effet de dilution a également été réalisée. Cet effet est dû au mélange, à l'interface, entre l'électrolyte de séparation et le liquide additionnel, à des débits sensiblement différents, en présence de gaz nébulisant. Cet effet de dilution semble être légèrement inférieur à ce qui pouvait être prévu par le rapport théorique des débits d'électrolyte de séparation et de liquide additionnel. Finalement, la géométrie du cône de Taylor est un paramètre important ayant une influence sur les effets de succion et de dilution. Cette géométrie semblerait dépendre principalement du profil et de la vitesse des fluides émergeant à l'interface.

Dans un second temps, nous avons mis en place une méthodologie pour l'analyse simultanée d'un mélange de composés cationiques et polyanioniques, par couplage CE/ESI-MS. Une des problématiques principales du couplage de l'électrophorèse capillaire avec la spectrométrie de masse avec une source à électronébulisation réside dans le maintien du contact électrique pour la séparation électrophorétique. En l'absence de flacon d'électrolyte à la sortie du capillaire de CE, un écoulement minimum de liquide est nécessaire entre la CE et la MS, afin de maintenir le contact électrique de manière continue. Cette condition est le plus souvent rencontrée lors de la séparation en polarité positive dans un capillaire en silice vierge, pour l'analyse de composés cationiques et pour l'analyse de composés anioniques de faible mobilité électrophorétique, pouvant être entraînés vers l'interface à électronébulisation. Lors de l'analyse des anions de mobilité électrophorétique supérieure à la mobilité électroosmotique en valeur absolue, séparés classiquement en polarité négative, une déplétion en électrolyte à l'extrémité de sortie du capillaire empêcherait le contact électrique de se faire. Dans ce contexte, nous avons proposé des techniques alternatives qui permettraient d'analyser simultanément par couplage CE/ESI-MS des composés cationiques et anioniques de mobilité électrophorétique très élevée en valeur absolue. Pour cela, la paroi interne des capillaires de CE a été modifiée (type DB-1 ou Polybrène) et une pression hydrodynamique a parfois été ajoutée à la tension de séparation, afin de contre-balancer l'écoulement électroosmotique cathodique résiduel. Ces deux stratégies peuvent être appliquées à pratiquement toutes sortes de mélanges complexes, permettant d'analyser simultanément, par couplage CE/ESI-MS, tous les composés anioniques et presque tous les composés cationiques, avec des temps d'analyse raisonnables (en moins de 30 minutes) et avec une bonne résolution.

Finalement, nous avons mis en place un nouveau protocole « original », permettant le couplage CIEF/ESI-MS, pour l'analyse de tout type de protéines. Cette méthodologie permet (i) d'avoir une continuité électrique, durant tout le processus d'analyse, grâce à un remplissage partiel du capillaire : catholyte / mélange protéines-ampholytes dans les proportions 60:40 (cm/cm), (ii) d'utiliser un milieu anticonvectif, glycérol/eau 30:70 (v/v), compatible avec la détection MS, et permettant la solubilisation des protéines hydrophiles et hydrophobes, et (iii) l'emploi de capillaires en silice vierge non modifiés, sachant que le milieu glycérol/eau réduit fortement l'écoulement électroosmotique, évitant ainsi l'utilisation de capillaires greffés coûteux et à faible durée de vie. Ce couplage a permis d'obtenir simultanément une résolution élevée et une détermination précise des masses moléculaires des composés analysés. Le couplage CIEF/ESI-MS apparaît donc comme une alternative de choix

à la séparation 2D-PAGE, sachant qu'elle fournit d'une part des informations sur les pI et les masses moléculaires, mais présente également des avantages potentiels supplémentaires, notamment la facilité d'automatisation de la méthode, des temps d'analyses beaucoup plus courts et l'accès direct aux masses moléculaires. Ce nouveau protocole CIEF/ESI-MS devrait être un outil efficace pour la caractérisation de mélange de protéines de complexité moyenne, offrant l'avantage de pouvoir analyser simultanément un mélange de plusieurs protéines hydrophobes et hydrophiles. Dans le futur, ce nouveau protocole pourrait être appliqué au couplage de la CIEF avec des spectromètres de masse plus sophistiqués de haute performance.

Ainsi, ces travaux ont montré en même temps le grand potentiel de ce couplage CE/ESI-MS, mais aussi les contraintes et les paramètres influençant ces contraintes. Après avoir réussi à mettre en œuvre un couplage en ligne de la focalisation isoélectrique capillaire avec la spectrométrie de masse *via* une interface à électronébulisation, il serait intéressant d'appliquer ce couplage CIEF/ESI-MS pour l'analyse d'un mélange réel de protéines hydrophiles et hydrophobes de complexité moyenne. Parmi les différents modes de séparation électrophorétiques, la CZE et la CIEF ont été le plus souvent couplées à la spectrométrie de masse. Il serait intéressant de poursuivre l'effort sur le développement de couplages originaux et faciles de mise en œuvre pour les autres modes de séparation électrophorétiques, et en particulier pour la CGE, couplage qui a été très peu décrit du fait de l'incompatibilité des gels classiques avec la spectrométrie de masse, qui pourrait être envisagée par exemple avec un remplissage partiel du capillaire par un gel.

Résumé

Au cours de ce travail nous avons étudié les phénomènes de succion et de dilution pouvant avoir lieu à l'interface d'électronébulisation dans un couplage en l'électrophorèse capillaire et la spectrométrie de masse (CE/ESI-MS). Il a été montré l'influence de différents paramètres, dont les débits de mélangeage des trois fluides émergeant de l'aiguille d'interface et la géométrie de l'interface, qui modifient le cône de Taylor. Dans le cadre de l'analyse de mélanges complexes, une stratégie de séparation simultanée de composés cationiques et polyanioniques par couplage CZE/ESI-MS a ensuite été mise en œuvre. Enfin un nouveau protocole de couplage CIEF/ESI-MS a été développé, présentant des avantages nouveaux : (i) une automatisation simple et totale du couplage, (ii) l'analyse de protéines hydrophiles et hydrophobes et (iii) l'emploi de capillaires peu coûteux.

Summary

During this work we have studied suction and dilution phenomena which may occur at the electrospray interface between capillary electrophoresis and mass spectrometry coupling (CE/ESI-MS). The influence of various parameters was emphasized, among which the flow rate of the three mixing fluids emerging from interface and the geometry of the interface, which modifies the Taylor cone. As far as complex mixtures are concerned, a strategy of simultaneous separation of cationic and polyanionic compounds by CZE/ESI-MS was elaborated. Finally, a new protocol of coupling CIEF/ESI-MS was developed, presenting new advantages: (i) an easy automation of the coupling, (ii) the analysis of hydrophilic and hydrophobic proteins and (iii) the use of low-cost capillaries.