



HAL
open science

Développement d'outils miniaturisés pour l'analyse de traces dans les matrices biologiques

Valérie Thibert

► **To cite this version:**

Valérie Thibert. Développement d'outils miniaturisés pour l'analyse de traces dans les matrices biologiques. Chimie analytique. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2011. Français. NNT : . pastel-00650138

HAL Id: pastel-00650138

<https://pastel.hal.science/pastel-00650138>

Submitted on 9 Dec 2011

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 DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

ED 388

Spécialité : Chimie Analytique

Présentée par

Mlle Valérie THIBERT

Pour obtenir le grade de docteur de l'Université Pierre et Marie Curie

**Développement d'outils miniaturisés pour l'analyse de
traces dans les matrices biologiques**

Thèse dirigée par Mme Valérie PICHON

Soutenance le 18 novembre 2011

Devant le jury composé de :

Mme. Marianne FILLET
M. Christian STAUB
Mme. Marie-Claire HENNION
Mme. Eliane SOUTEYRAND
M. Marc DEVEAUX
Mme. Valérie PICHON

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Directrice de thèse

Remerciements

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Sciences Analytiques Bioanalytiques et Miniaturisation de l'Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles, sous la direction du Professeur Valérie Pichon à qui j'exprime mes remerciements pour m'avoir accueillie dans le cadre de cette thèse au sein du laboratoire, pour le temps qu'elle a dédié à mes travaux de recherche au cours de la thèse et pour la confiance qu'elle m'a accordée pendant ces trois années. Je tiens également à remercier madame Florence Hugon qui m'a encadrée pendant ces trois ans de thèse.

Je remercie aussi le Professeur Marie-Claire Hennion, directrice du laboratoire pour son accueil dans le laboratoire et pour ses précieux conseils.

Je remercie messieurs Jérôme Vial et Alain Jardi pour leur aide lors de l'utilisation d'approches statistiques.

Je remercie monsieur Marc Deveaux de Toxlab pour l'accès à des échantillons réels, ainsi que pour ses conseils en analyse médico-légale et pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie également madame Marianne Fillet, madame Eliane Souteyrand et monsieur Christian Staub pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie madame Nadège Pantoustier pour ces conseils en polymérisation par précipitation.

Je remercie mademoiselle Fairouz Benayad Chérif, monsieur Denis Cottinet et monsieur Patrice Legeay pour leur contribution à ce travail.

Merci à Ramia, Benjamin, Wassim, Bruno, Charlotte, Sonia, Youcef, Oussama, Stéphanie et à tous mes collègues du laboratoire par leur amitié et les bons moments passés ensemble.

A Rodrigo pour son amour et son soutien quotidien.

A ma famille qui m'a soutenue et encouragée le long de ma thèse.

Table des matières

Remerciements	I
Table des matières	III
Résumé	1
Abstract	3
Liste des publications et des communications	5
Introduction	7
Chapitre I : Les outils conventionnels et miniaturisés pour l'analyse de traces dans des milieux biologiques	11
Introduction.....	11
I.1 Présentation des molécules d'intérêt	11
I.1.1 La cocaïne : origine, utilisation et toxicité.....	12
I.1.2 Métabolisme et pharmacocinétique de la cocaïne dans le corps humain.....	14
I.1.3 Propriétés physico-chimique de la cocaïne et de ses métabolites	15
I.1.4 Description des matrices biologiques d'étude pour la cocaïne	16
I.2 Les outils conventionnels pour l'analyse de traces dans des milieux biologiques....	21
I.2.1 Méthodes de séparation.....	21
I.2.2 La spectrométrie de masse	24
I.2.3 Le traitement de l'échantillon	34
I.3 Miniaturisation	60
I.3.1 Intérêts de la miniaturisation.....	60
I.3.2 Miniaturisation des systèmes d'extraction.....	61
I.3.3 Miniaturisation des systèmes séparatifs.....	69
I.3.4 Intégration de l'étape d'extraction dans le système analytique	80
Conclusions.....	88
Chapitre II : Analyse de la cocaïne par SPE-LC sur puce couplée à la spectrométrie de masse	91
Introduction.....	91
II.1 Principe de fonctionnement du système étudié.....	91
II.1.1 Description des puces et de l'instrumentation utilisées.....	91
II.1.2 Optimisation des paramètres de la détection par spectrométrie de masse... 96	
II.2 Développement de la méthode d'analyse.....	98
II.2.1 Développement de la méthode de séparation avec la trappe ionique	98
II.2.2 Essais préliminaires d'optimisation de la SPE en ligne.....	103

II.3 Développements de la méthode SPE/LC sur puce couplée à un triple quadripôle	109
II.3.1 Performances de la méthode développée associée à un triple quadripôle.	109
II.3.2 Stabilité du système d'analyse.....	110
II.3.3 Modification des conditions de séparation	111
II.3.4 Prise en charge des effets de mémoire.....	111
II.3.5 Performances de la méthode.....	112
II.3.6 Comparaison à la LC-MS conventionnelle.....	113
II.3.7 Performance de la SPE/LC/MS sur puce en mode isocratique.....	114
II.4 Application à l'analyse d'échantillons biologiques	117
II.4.1 Analyse de la cocaïne dans les cheveux	117
II.4.2 Analyse de la cocaïne dans l'urine	119
Conclusions.....	128
Chapitre III : Développement d'un polymère à empreintes moléculaires pour l'extraction sélective de la cocaïne et application à des matrices biologiques	131
Introduction.....	131
III.1 Méthodes d'analyse de la cocaïne et de ses métabolites	131
III.1.1 Analyse par LC-UV.....	131
III.1.2 Analyse par LC-MS.....	133
III.2 Synthèse d'un MIP sélectif pour la cocaïne.....	134
III.2.1 Discussion sur le choix des conditions de synthèse du MIP	134
III.2.2 Développement d'un protocole d'extraction sélectif sur le MIPth en milieu organique	139
III.2.3 Caractérisation du MIP UV obtenu par voie photochimique.....	146
III.3 Caractérisation du MIP UV en milieu organique	149
III.3.1 Étude de la capacité du MIP UV	149
III.3.2 Étude de la répétabilité intercartouches.....	150
III.3.3 Étude de la rétention sélective de l'ecgonine méthylester (EME)	151
III.4 Développement d'une extraction sélective en milieu aqueux et hydro-organique	153
III.4.1 Étude de la rétention sur MIP UV en milieu hydro-organique	153
III.4.2 Étude de la rétention sur MIP UV en milieu aqueux pur	154
III.4.3 Évaluation de différentes conditions de synthèse pour la synthèse de MIP	157
III.4.4 Conclusions	166
III.5 Applications du MIP dans des milieux réels	166
III.5.1 Application à l'extraction sélective de cocaïne et de BZE d'extraits de cheveux.....	167
III.5.2 Application du MIP dans le sérum.....	170
III.5.3 Extraction de la cocaïne sur MIP d'échantillons urinaires.....	176

Conclusions.....	187
Chapitre IV : Miniaturisation des polymères à empreintes moléculaires	189
Introduction.....	189
IV.1 Synthèse de particules de MIP.....	189
IV.1.1 Différentes approches pour l’obtention de particules de MIP	190
IV.1.2 Mise au point de la synthèse de NIP par précipitation.....	205
IV.1.3 Synthèse par précipitation et caractérisation d’un MIP	216
IV.1.4 Conclusions	223
IV.2 Synthèse de MIP en format monolithe dans des capillaires	224
IV.2.1 Choix des conditions de synthèse	224
IV.2.2 Optimisation de la synthèse	229
IV.2.3 Couplage d’un monolithe imprimé en ligne avec la nanoLC	238
Conclusion	250
Conclusion et perspectives	253
Abbréviations :	255
Annexes.....	259
Annexe 1 : Paramètres optimisés pour la trappe ionique.....	259
Annexe 2 : Méthodes d’analyse utilisées dans ces travaux	260
Annexe 3 : Etude des volumes morts des puces utilisées	264
Annexe 4 : Préparation de différents échantillons biologiques	266
Annexe 5 : Protocole de synthèse en bloc	268
Annexe 6 : Protocoles d’extraction liquide liquide	270
Annexe 7 : Protocole de synthèse d’un MIP par précipitation	272
Annexe 8 : Utilisation du microscope électronique à balayage.....	273
Annexe 9 : Protocole de synthèse de MIP in situ dans un capillaire	275
Liste des figures et des tableaux.....	277
Liste des figures	277
Liste des tableaux.....	283
Références :	287

Résumé

L'analyse de traces dans les fluides biologiques est fréquemment précédée d'une étape d'extraction afin de limiter la présence d'interférents. Ainsi, l'extraction sur phase solide (SPE) est souvent utilisée en amont des techniques séparatives, mais son manque de sélectivité peut conduire à des co-extractions de composés interférents nuisant à l'analyse. L'utilisation d'outils basés sur une reconnaissance moléculaire tels que les immunoadsorbants (IS), utilisant des anticorps, ou les polymères à empreintes moléculaires (MIP) qui sont des polymères synthétiques avec des cavités complémentaires de la molécule empreinte en taille, forme et fonctionnalité, peut apporter de la sélectivité à l'analyse. La miniaturisation d'un système de séparation permet d'augmenter la sensibilité des analyses. Ainsi, le couplage d'une extraction miniaturisée sur MIP présente un intérêt par sa sélectivité. Celui-ci a donc été étudié pour l'extraction de la cocaïne et ses métabolites, la benzoylecgonine (BZE) et l'ecgonine méthylester (EME), comme molécules modèles, dans diverses matrices biologiques.

Les performances d'une puce commerciale intégrant un canal d'enrichissement, un canal de séparation et une aiguille métallisée pour la formation d'un électrospray ont été initialement évaluées. La méthode d'analyse développée a montré d'excellents résultats en termes de sensibilité (limites de quantification de quelques dizaines de pg mL^{-1}), et a donc été appliquée à l'analyse de traces de cocaïne et de BZE dans l'urine et les cheveux. Malgré les bons résultats obtenus, le manque de spécificité de l'étape d'extraction a finalement limité le potentiel de la méthode miniaturisée, d'où l'intérêt d'y intégrer un outil sélectif.

Pour confirmer la faisabilité d'un MIP sélectif pour la cocaïne, des synthèses en format conventionnel ont été étudiées. Après optimisation de la synthèse et des protocoles d'extraction, une excellente sélectivité a été obtenue en milieu organique pour la cocaïne et ses métabolites. Cependant, en milieu hydro-organique ou aqueux pour la BZE n'a pas été retenue. Le MIP a par la suite été appliqué avec succès à l'extraction sélective de la cocaïne d'extraits de cheveux, de sérum et d'urine. Pour mettre à profit le potentiel sélectif du MIP pour les trois molécules ciblées, une étape préalable d'extraction liquide-liquide a été appliquée sur un échantillon urinaire, ce qui a permis de mettre de nouveau en évidence le potentiel du MIP pour la purification en milieu complexe.

La dernière partie de ce travail a consisté à synthétiser un MIP sélectif pour la cocaïne dans un format miniaturisé. La première approche a reposé sur la synthèse de microparticules de MIP par précipitation. Plusieurs paramètres clés de la synthèse ont été étudiés afin d'obtenir des particules de NIP et de MIP de tailles proches de $3 \mu\text{m}$. Malheureusement, le MIP ainsi obtenu ne s'est pas avéré sélectif vis-à-vis de la cocaïne et ses métabolites, ni dans un milieu organique ni dans un milieu aqueux. La deuxième approche a consisté en la synthèse de monolithes de MIP dans des capillaires de silice ($100 \mu\text{m}$ d.i.). Divers paramètres ont été étudiés pour l'obtention d'un monolithe de MIP avec une morphologie appropriée au couplage avec la nanochromatographie en phase liquide. Le MIP ainsi sélectionné a présenté une meilleure affinité pour la cocaïne que le NIP correspondant en milieu acétonitrile, et sa synthèse s'est avérée répétable en termes de morphologie et de sélectivité. Un couplage a donc été effectué et, si ce dispositif nécessite encore une étude plus approfondie, des résultats très encourageants ont été obtenus pour l'extraction en ligne de la cocaïne d'échantillons urinaires dopés.

Abstract

An initial extraction procedure is usually needed for the trace analysis of biological fluids to reduce the amount of interfering compounds. Thus, solid phase extraction (SPE) is often applied before the separation, but its lack of selectivity can lead to the co-extraction of interfering compounds compromising the analysis. In order to increase the selectivity of the analysis, selective tools, based on molecular recognition, can be used such as immunosorbents, using antibodies, or molecularly imprinted polymers (MIP). MIP are synthetic polymers possessing cavities which are complementary in size, shape and functionality of the imprint molecule. Sensitivity, speed and efficiency of the analysis can be improved by downscaling the separation system, therefore, miniaturization of the extraction with a MIP can be interesting to couple it with the separation on the same miniaturized device. MIP miniaturisation was thus studied for the extraction from biological matrices of cocaine and its main metabolites, benzoylecgonine (BZE) and ecgonine methyl ester (EME) as model molecules.

The performances of a chip with an enrichment channel, a separation channel and a metalized nanospray tip were initially assessed. The optimized analysis method showed excellent results in terms of sensitivity (limits of quantification of a few pg mL^{-1}). It was therefore successfully applied to cocaine and BZE trace analysis in urine and hair extracts. Nevertheless, the lack of selectivity of the SPE limited the potential of the chip analysis, stressing the need for the integration of a selective tool for the extraction.

The feasibility of a MIP selective for cocaine and its metabolites was evaluated on a conventional format. After the optimization of the synthesis and the extraction protocol, an excellent selectivity was obtained in organic, hydro-organic and aqueous media for cocaine and EME, but BZE was not retained in aqueous and hydro-organic media. Selective cocaine extraction from hair extracts, serum and urine was successfully obtained. The MIP could not retain cocaine metabolites in serum, while a preliminary liquid-liquid extraction allowed their selective extraction from urine samples prior to analysis.

The last part of this work was dedicated to the synthesis of a miniaturized cocaine-selective MIP. The first approach consisted in the synthesis of MIP microparticles by precipitation polymerization. Many synthesis key parameters were studied to obtain MIP and NIP microspheres of about $3\ \mu\text{m}$ in diameter. Unfortunately, the obtained MIP microspheres were not selective for cocaine and its metabolites neither in organic nor in aqueous media. The second approach consisted of monolithic MIP synthesized in situ on silica capillaries ($100\ \mu\text{m}$ i.d.). Various parameters were studied to obtain a MIP monolith with a morphology appropriate to its coupling with liquid nanochromatography. The selected MIP exhibited a higher affinity for cocaine in organic media than the non imprinted polymer, and the synthesis was repeatable in terms of morphology and selectivity. The coupling was thus performed and, even though a deeper study of the device is necessary, very interesting results were obtained for the on-line extraction of cocaine from spiked urine samples.

Liste des publications et des communications

Liste des publications

« **p38 MAPK as a signal transduction component of heavy metals stress in *Euglena gracilis*** », Daniel Rios-Barrera, Alicia Vega-Segura, Valérie Thibert, José S Rodriguez-Zavala, M Eugenia Torres-Marquez, Arch Microbiol 191 (2009) 47.

« **Micropillar array chips toward new immunodiagnosis** », Hong-Yi Li, Virginie Dauriac, Valérie Thibert, Hélène Sénéchal, Gabriel Peltre, Xin-Xiang Zhang, Stéphanie Descroix, Lab Chip 10 (2010) 2597.

« **Synthesis and characterization of molecularly imprinted polymers for the selective extraction of cocaine and its metabolite benzoylecgonine from hair extract before LC-MS analysis** », Valérie Thibert, Patrice Legeay, Florence Chapuis-Hugon, Valérie Pichon, Talanta In Press 2011.

« **Determination of carbofuran in surface water and biological tissue by sol-gel immunoaffinity extraction and on-line preconcentration/HPLC/UV analysis** », Luz E. Vera-Avila, Bani P. Marquez-Lira, Marcosz Villanueva, Rosario Covarrubias, Valérie Thibert, Talanta In Press 2011.

« **Development of an on-chip LC-MS analysis for the determination of cocaine and benzoylecgonine from hair extract and urine.** », Valérie Thibert, Florence Chapuis-Hugon, Valérie Pichon, article soumis au journal Analytical and Bioanalytical Chemistry le 10/2011.

Communications orales

« *Analyse de la cocaïne et de son métabolite principal par Chip-LC-MS, en vue de l'intégration d'une étape d'extraction sélective par un polymère à empreintes moléculaires au sein de la puce* », Valérie Thibert, Valérie Pichon et Florence Chapuis-Hugon, Journée utilisateurs Agilent, France, 28 mai 2009.

« *Synthèse et caractérisation d'un polymère à empreintes moléculaires en vue de son utilisation dans un dispositif miniaturisé* », Valérie Thibert, Valérie Pichon et Florence Chapuis-Hugon, Journée de l'école doctorale 388, France, 2 juin 2009V.

« *Selective extraction and analysis by chip LC-MS of cocaine and its metabolite from urine* », Valérie Thibert, Valérie Pichon et Florence Chapuis-Hugon, HTSP (Int. Symp. on Hyphenated Techniques for sample Preparation) – HTC 11 (Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography and Hyphenated Chromatographic Analyses), Bruges, Belgique, 26-29 janvier 2010. Bourse offerte par l'Association Francophone des Sciences Séparatives (AFSEP).

« *On-chip LC-MS analysis of cocaine from hair and urine* », Valérie Thibert, Valérie Pichon et Florence Chapuis-Hugon, ISC (International Symposium on Chromatography), Valencia, Espagne, 12-16 septembre 2010.

Communications par affiche

« *Selective solid phase extraction of cocaine from hair samples by molecularly imprinted polymers* », Valérie Thibert, Patrice Legeay, Florence Chapuis-Hugon, Valérie Pichon, HTSP (Int. Symp. on Hyphenated Techniques for sample Preparation) Bruges, Belgique, 26-27 janvier 2010.

« *Selective solid phase extraction of cocaine from biological samples using molecularly imprinted polymers* », Valérie Thibert, Florence Chapuis-Hugon, Valérie Pichon, ISC (International Symposium on Chromatography), Valencia, Espagne, 12-16 septembre 2010.

« *Selective solid phase extraction of cocaine from biological samples using molecularly imprinted polymers* », Valérie Thibert, Florence Chapuis-Hugon, Valérie Pichon, Drug Analysis, Anvers, Belgique, 21-24 septembre 2010.

« *Analyse de la cocaïne à partir de matrices biologiques sur chip LC-MS* », Valérie Thibert, Florence Chapuis-Hugon, Valérie Pichon, SEP11 (9ème congrès francophone de l'AfSep sur les sciences séparatives et les couplages), Toulouse, France, 23-25 mars 2011.

Introduction

Les défis de la chimie analytique sont très importants compte tenu du grand nombre de substances à analyser dans divers domaines d'application (clinique, agroalimentaire, environnemental, toxicologique...). En effet, l'analyste se trouve aujourd'hui face à des substances de natures très différentes, présentes à des teneurs variables qui sont souvent assez faibles (ng.mL^{-1} ou pg.mL^{-1}), et dans des échantillons qui sont souvent très complexes, comme c'est le cas des échantillons biologiques. Pour faire face à ces défis, l'analyste compte avec un grand nombre d'outils performants pour la séparation tels que la chromatographie et l'électrophorèse, ainsi que des modes de détection de plus en plus sensibles et sélectifs comme c'est le cas de la spectrométrie de masse. Le couplage de la chromatographie liquide avec la spectrométrie de masse a conduit à des progrès considérables pour l'analyse de traces dans des échantillons biologiques. Cependant, le grand nombre d'interférents retrouvés dans ces matrices peut présenter une contrainte pour l'analyse car les modes d'ionisation associés à la chromatographie en phase liquide subissent souvent des effets de matrice, à savoir la suppression ou à l'augmentation des signaux, dus à la présence de certains interférents. Une attention particulière est donc à porter sur le traitement de l'échantillon pour pouvoir concentrer et purifier les analytes.

Un essor de la miniaturisation des systèmes analytiques a été observé ces dix dernières années, notamment pour l'intégration des diverses étapes de l'analyse (traitement de l'échantillon, séparation, détection) dans un seul dispositif miniaturisé (μ -TAS, *Micro Total Analysis System*). Cette tendance se justifie par la nécessité de réduire les temps d'analyse ainsi que les quantités d'échantillon utilisées, mais aussi par la possibilité d'automatisation et d'études de terrain. Des dispositifs de traitement de l'échantillon en formats miniaturisés sont couramment utilisés pour réduire les quantités d'échantillon analysées. Cependant, ces outils miniaturisés de traitement de l'échantillon sont aujourd'hui associés à des méthodes de séparation en format conventionnel. Ils ne sont donc pas intégrés dans un système analytique miniaturisé, et automatisable. La séparation chromatographique a tout de même déjà été effectuée dans des microsystèmes, mais elle a souvent été appliquée à des échantillons purs. En effet, les faibles dimensions des microsystèmes compliquent la détection des analytes car de faibles volumes sont injectés, nécessitant alors un mode de détection très sensible. En plus, le grand nombre d'interférents des matrices complexes nuit à l'analyse. Des dispositifs intégrant donc une étape de pré-traitement pour pré-concentrer et purifier l'échantillon et une étape de séparation sont préconisés. Un système sur puce intégrant un canal de pré-concentration, un canal de séparation et une aiguille de nanoélectrospray qui permet son couplage avec la spectrométrie de masse est aujourd'hui disponible. Les performances de ce système seront évaluées dans le chapitre II de ce travail pour l'analyse de la cocaïne et son

métabolite principal choisies comme molécules modèles pour l'analyse de traces dans des milieux biologiques. Seules des phases hydrophobes et pouvant donc conduire à la co-extraction de molécules interférentes sont disponibles.

Il est aujourd'hui possible de mettre en œuvre des apports plus spécifiques pour réaliser l'extraction sur phase solide. En effet, il existe des supports d'extraction développant des interactions spécifiques avec les analytes en faisant usage d'outils biologiques tels que des anticorps (immunoabsorbants) ou des aptamères (oligoabsorbants) et qui génèrent un mécanisme de rétention au cours du procédé d'extraction basé sur la reconnaissance moléculaire des analytes ciblés. Les anticorps présentent l'avantage d'avoir une affinité très importante pour leur antigènes et donc de conduire à des rendements d'extraction élevés, mais le temps et le coût de synthèse d'anticorps ciblés pour une molécule donnée sont assez élevés. En ce qui concerne les aptamères, leur affinité pour les petites molécules est souvent moins importante que celle des anticorps, mais ils permettent tout de même une extraction très spécifique. Néanmoins, la disponibilité des aptamères est encore assez restreinte et requiert de la biologie moléculaire pour leur développement. Une autre stratégie consiste à utiliser des outils biomimétiques, il s'agit des polymères à empreintes moléculaires (MIP, *Molecularly Imprinted Polymers*). Ces supports sont en effet des polymères qui possèdent des cavités ayant une complémentarité stérique et fonctionnelle de la molécule cible. Ils présentent l'avantage d'être stables chimiquement et de permettre une grande diversité d'applications et de formats. Ce type de support sélectif peut constituer un véritable apport pour le traitement de l'échantillon pour des dispositifs miniaturisés. Cependant, une mise au point de la synthèse et des procédures d'extraction à l'échelle macroscopique est tout d'abord nécessaire.

Dans le cas des molécules modèles choisies, la cocaïne et ses deux métabolites principaux, la benzoylecgonine (BZE) et l'ecgonine méthylester (EME), la faisabilité de MIP sélectifs a déjà été prouvée dans la littérature mais sans applications à des échantillons réels. Donc, dans le cadre de ce travail, l'optimisation de la synthèse d'un MIP sélectif pour la cocaïne et ces métabolites a été effectuée. Suite à la synthèse d'un MIP, sa caractérisation peut se faire dans le milieu de synthèse où les interactions spécifiques sont les plus fortes. Cette étude permet de confirmer l'apport en sélectivité du MIP pour, par la suite, pouvoir l'utiliser dans d'autres milieux. En effet, considérant que la plupart des échantillons biologiques sont aqueux, il est nécessaire de développer un protocole d'extraction dans un milieu contenant de l'eau. Dans le chapitre III de ce travail sont présentés l'optimisation de la synthèse, la caractérisation des MIP obtenus, ainsi que le développement d'un protocole d'extraction sélectif en milieu aqueux pour le support le plus prometteur, pour aboutir finalement à l'application de celui-ci à l'extraction de la cocaïne de diverses matrices biologiques.

La synthèse étudiée à l'échelle macroscopique s'est effectuée avec une polymérisation radicalaire en bloc. Le monolithe obtenu est ensuite broyé et tamisé pour l'intégrer dans des

cartouches d'extraction. Ce mode de synthèse ne convient pas pour l'introduction du MIP dans des dispositifs miniaturisés car des particules de formes et de tailles irrégulières sont obtenues. Deux approches de synthèse de MIP pour leur intégration dans des supports miniaturisés sont donc présentées dans le chapitre IV : la synthèse de particules de MIP par précipitation, et la synthèse de monolithes in situ dans des capillaires. Pour la deuxième approche, un couplage a été effectué avec la nanoLC de façon à analyser des échantillons urinaires.

Chapitre I : Les outils conventionnels et miniaturisés pour l'analyse de traces dans des milieux biologiques

Introduction

L'analyse de traces dans des milieux complexes tels que les matrices biologiques représente un vrai défi analytique de par le grand nombre de composés interférents qui s'y retrouvent à des concentrations bien supérieures à celles des composés recherchés. Ce chapitre sera consacré à la présentation des outils analytiques existants pour relever ce défi.

La première partie de ce chapitre est consacrée à la présentation des composés choisis comme modèles au cours de ce travail, c'est-à-dire la cocaïne et ses métabolites. Dans cette partie seront exposés le métabolisme de la cocaïne, ses propriétés ainsi que celles de ses métabolites et les matrices biologiques analysées.

Dans une seconde partie, les méthodes conventionnelles d'analyse quantitative de traces de la cocaïne et ses métabolites dans des matrices biologiques seront présentées. Nous verrons que la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse est devenu un outil incontournable dans ce domaine mais qu'il présente des limitations à cause de la complexité des échantillons analysés. Pour cette raison, des outils de traitement de l'échantillon seront aussi présentés puisqu'ils sont souvent nécessaires avant l'analyse.

Finalement, dans la troisième partie de ce chapitre, seront abordés les outils miniaturisés pour l'analyse de traces dans des milieux complexes, notamment pour le traitement de l'échantillon mais aussi pour la séparation chromatographique. En effet, la miniaturisation des systèmes analytiques est actuellement en développement car elle apporte plusieurs avantages pour l'analyse par rapport aux systèmes conventionnels.

I.1 Présentation des molécules d'intérêt

L'analyse de traces ($\mu\text{g.L}^{-1}$) ou d'ultratraces (ng.L^{-1}) dans des matrices biologiques constitue un vrai défi analytique. La difficulté réside dans la complexité des matrices étudiées ainsi qu'au niveau des très faibles concentrations de certains composés recherchés dans ces milieux. Pour ce travail, les molécules choisies comme molécules modèles pour le développement de nouveaux outils analytiques dans des milieux biologiques sont la cocaïne et ses métabolites.

I.1.1 La cocaïne : origine, utilisation et toxicité

La cocaïne (Figure I- 1(A)) est un alcaloïde contenu principalement dans la plante *Erythroxylum coca* qui pousse en abondance du côté Est de la cordillère des Andes au Pérou et en Bolivie. Les anciennes civilisations se servaient de cette plante lors de cérémonies religieuses. En effet, les feuilles de coca servaient comme anesthésiant local lors de trépanations rituelles. Après la conquête espagnole de l'Amérique du Sud, les mineurs locaux utilisaient les feuilles de coca comme un stimulant leur permettant d'accroître leurs performances physiques et de diminuer leurs besoins de se nourrir et de se reposer [1]. D'ailleurs, les Indiens des Andes utilisent les feuilles de coca (Figure I- 1(B)) depuis des centaines d'années pour lutter contre la fatigue et les troubles liés à l'altitude.



Figure I- 1 : La cocaïne : structure chimique (A), feuilles de coca (B), cristaux de chlorhydrate de cocaïne (C), « cailloux » de cocaïne base ou « crack » (D) (adaptée de [2]).

Ce n'est qu'à la deuxième moitié du XIX^{ème} siècle que l'utilisation de la cocaïne va changer. En effet c'est à ce moment-là, en 1855, que le chimiste allemand Friedrich Gaedcke isole la cocaïne [3], puis que l'autrichien Albert Niemann, en 1861, perfectionne sa purification et note ses effets anesthésiants [4]. À cette période, l'extrait des feuilles de coca a trouvé divers usages : anesthésiant local, traitement contre la dépression, contre l'addiction à la morphine ou agent dopant. La cocaïne est devenue un ingrédient populaire dans des produits tels que le vin, des pastilles et du thé, commercialisés notamment par Mariani. Aux États-Unis d'Amérique (USA), en réponse aux lois de prohibition sur l'alcool, John Pemberton a même développé une formule de Coca-Cola qui contenait de la cocaïne. Cette boisson est finalement retirée du marché en 1903 et ce n'est qu'en 1914 qu'apparaît une réglementation pour la distribution, la vente et l'utilisation de la cocaïne aux USA. Cette loi nommée « Harrison Act », accorde le droit aux pharmaciens et aux physiciens de distribuer de la cocaïne [5]. Dès lors, l'usage illicite de la cocaïne s'est renforcé en particulier pendant les années 70, et de nos jours, la cocaïne est l'une des drogues les plus utilisées dans le monde.

La cocaïne se présente sous deux formes différentes [1]:

- Le chlorhydrate de cocaïne. Il s'agit d'une poudre blanche cristalline (Figure I- 1(C)) obtenue après extraction des feuilles de coca puis précipitation par de l'acide chlorhydrique. Sous cette forme, la cocaïne peut être insufflée (« sniffée ») ou injectée par voie intraveineuse après dissolution dans de l'eau.

- La cocaïne sous forme basique. Elle est généralement obtenue par précipitation à chaud du chlorhydrate de cocaïne par une base, souvent par du bicarbonate de sodium, puis par extraction avec des solvants organiques. La base se présente sous forme de « cailloux » (Figure I- 1(D)) après évaporation et on l'appelle communément « crack ». Le crack est consommé sous forme fumée.

La cocaïne présente une toxicité pour le système nerveux central. En effet, elle stimule la libération de neurotransmetteurs, comme la dopamine et la sérotonine dans la fente synaptique. Ces neurotransmetteurs vont générer une réponse physiologique lors de l'activation des neurones postsynaptiques. Cette réponse est régulée normalement par la réabsorption des neurotransmetteurs par les neurones présynaptiques. Cependant, la cocaïne bloque la recapture de dopamine et de sérotonine, ce qui empêche cette régulation et se traduit par un effet stimulant [4]. L'excès de sérotonine pourrait être lié à l'addiction à la cocaïne et à son effet de récompense. Par contre, c'est l'excès de dopamine qui semble être à l'origine des symptômes du système nerveux central tels que l'euphorie, une assurance accrue, la vivacité, l'agressivité, la désorientation, l'insomnie et les hallucinations. La durée et l'intensité de ces effets peuvent varier en fonction de la voie d'administration. La cocaïne présente aussi une toxicité pour le système cardiovasculaire qui est liée à ses propriétés de vasoconstricteur et de bloqueur des canaux de sodium. Elle provoque donc des effets à court terme, tels que l'augmentation du rythme cardiaque, de la température et de la fréquence respiratoire, et à long terme, des arythmies ventriculaires, de l'hypertension, des infarctus et d'autres complications cardiovasculaires.

La cocaïne commercialisée illicitement présente une pureté moyenne de 40 %, elle contient donc un certain nombre de contaminants qui peuvent aggraver son effet toxique [1]. Parmi ces contaminants, on trouve des produits dérivés de sa fabrication, des adultérants, des diluants, d'autres alcaloïdes naturels et des produits issus de la dégradation chimique de la cocaïne lors des traitements de purification de cet alcaloïde [5]. Parmi les diluants utilisés on trouve du sucre, du talc, et de l'amidon de maïs. Les adultérants sont ajoutés à la cocaïne pour promouvoir la puissance de son effet. Parmi ces adultérants on trouve souvent des anesthésiants locaux tels que la benzocaïne, la lidocaïne ou la procaine, le lévamisol, la phénacétine ou des toxiques tels que la strychnine [1]. Finalement, l'abus d'alcool en parallèle à la consommation de cocaïne génère du cocaéthylène (COCAE) (les voies métaboliques étant discutées dans la partie suivante) qui a les mêmes effets que la cocaïne sur la pression du sang, le rythme cardiaque et l'euphorie, mais son effet est plus long et s'ajoute aux effets de

l'alcool. Par conséquent, le taux de mortalité des individus consommant simultanément les deux drogues est plus élevé.

I.1.2 Métabolisme et pharmacocinétique de la cocaïne dans le corps humain

Dans le corps humain, la cocaïne est rapidement métabolisée par des voies enzymatiques et non enzymatiques (Figure I- 2). Sa durée de demi-vie varie entre 0,7 et 1,5 heures et la quasi-totalité de la dose est éliminée après seulement quelques heures [1]. Les doses habituelles de cocaïne varient entre 20 et 100 mg et sa présence en quantité détectable dans le sang est seulement de 4 à 6 heures [6]. Entre 1 % et 9 % de la cocaïne est éliminée dans les urines sous sa forme originale, milieu dans lequel elle peut être détectée entre 24 et 36 heures après la prise. La pharmacocinétique de la cocaïne dépend de divers facteurs comme sa forme chimique, le mode de consommation, la génétique et la consommation simultanée d'alcool. On distingue deux voies métaboliques principales que sont l'hydrolyse, ayant lieu dans le sang et les tissus, et l'oxydation qui se produit principalement au niveau du foie. Les principaux métabolites de la cocaïne sont la BZE et EME, obtenus par hydrolyse.

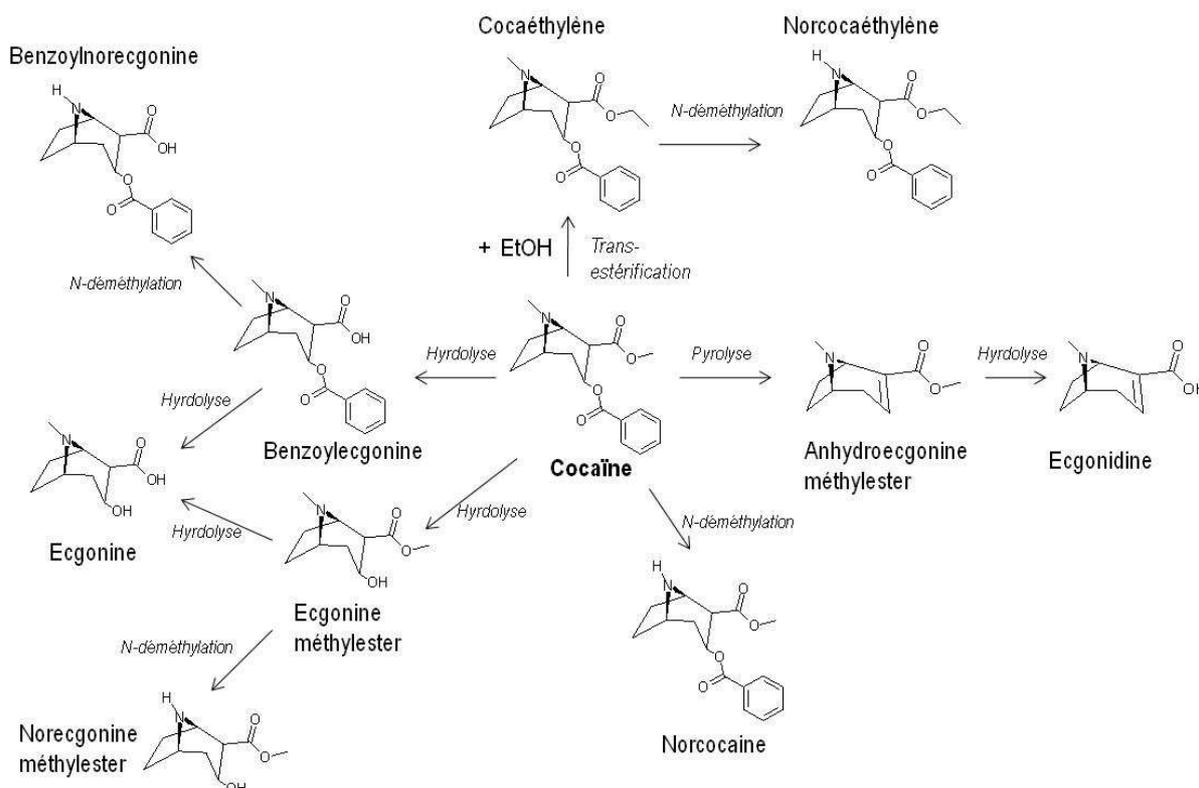


Figure I- 2 : Schéma des principales routes métaboliques de la cocaïne dans le corps humain (adapté de [5]).

La formation de la BZE résulte du clivage de la liaison du méthyl-ester de la cocaïne par hydrolyse chimique en milieu basique, ou par hydrolyse enzymatique par des carboxyl-

estérases hépatiques [7]. Ce métabolite n'a pas d'effets sur le système nerveux central mais il a des propriétés de vasoconstricteur. La BZE est le métabolite principal détecté dans les urines et dans le sang et pour lequel les durées de détection sont de un à deux jours pour l'urine, et de 48 heures pour le sang [6]. Sa durée de demi-vie est d'environ 5 heures [8]. Elle est excrétée dans les urines et représente entre 35 % et 54 % de la dose administrée [9]. L'autre métabolite principal de la cocaïne, l'EME, se forme lors de l'hydrolyse enzymatique du groupe benzoyle ester de la cocaïne par des estérases hépatiques et des cholinestérasas plasmatiques [7]. Ce métabolite est inactif comme la BZE et sa durée de demi-vie est d'environ 8 heures [8]. Il est excrété dans les urines à un pourcentage entre 32 % et 49 % de la dose administrée [9]. Ces deux métabolites peuvent produire de l'ecgonine (ECG) par hydrolyse qui se trouve dans les urines avec un pourcentage entre 1 % et 10 % de la dose initiale.

Quand la cocaïne est consommée en parallèle avec de l'alcool, du cocaéthylène est produit par trans-estérification enzymatique catalysée par une carboxy-estérase hépatique [3]. Cette enzyme semble être la même que celle qui catalyse la formation de BZE [7]. Le COCAE a le même effet toxique que la cocaïne mais sa durée de demi-vie est plus longue, environ 150 minutes, ce qui prolonge son effet stimulant [1]. Il se trouve dans l'urine à un niveau de 0,7 % de la dose administrée [10]. Lors de la consommation de la cocaïne sous forme fumée, de l'anhydroecgonine méthylester (AEME) est produite par pyrolyse qui à son tour peut se métaboliser en ecgonidine. L'AEME retrouvée dans les liquides biologiques sert de marqueur de la consommation de cocaïne sous forme fumée et sa proportion dépend des conditions dans lesquelles la cocaïne est fumée [4].

La cocaïne peut subir une N-déméthylation, il s'agit donc d'une oxydation dont le produit est la norcocaïne (NORCOC). Ce métabolite a des effets similaires à ceux de la cocaïne et il est produit dans des quantités inférieures à 5 % de la dose administrée. La BZE, l'EME et le COCAE peuvent aussi subir une oxydation pour former de la norbenzoylecgonine (NORBENZ), du norecgonine méthylester et du norcocaéthylène (NORCOCAE) respectivement [1]. Enfin, des réactions d'arylhydroxylation enzymatique peuvent avoir lieu sur les cycles aromatiques de la BZE et de la cocaïne [11]. Les métabolites ainsi obtenus sont minoritaires, ceux qui ont déjà été identifiés sont la p- et m-hydroxycocaïne, et la p- et m-hydroxybenzoylecgonine (pHBZE et mHBZE).

I.1.3 Propriétés physico-chimique de la cocaïne et de ses métabolites

La cocaïne est un ester formé de méthyl-ecgonine et d'acide benzoïque. Elle possède une fonction amine tertiaire qui agit comme une base faible dont le pKa est de 8,6 [5]. Le

logarithme de son coefficient de partage octanol/eau ($\log P_{\text{oct}}$) est de 2,31 [12]. Ses métabolites sont constitués du même squelette de base que la cocaïne et tous les métabolites comportent par conséquent une fonction amine tertiaire ou secondaire, dans le cas des métabolites N-déméthylés. Les pK_a de la fonction amine de la cocaïne et de ses principaux métabolites sont assez proches comme on peut l'observer dans le Tableau I- 1. Il s'agit donc de bases faibles qui sont principalement protonées dans les conditions physiologiques ($\text{pH} = 7,4$ pour le sang). Les métabolites pour lesquels la fonction méthylester de la cocaïne a subi une hydrolyse (BZE et ECG sur le Tableau I- 1) sont des composés zwitterioniques car ils possèdent une fonction acide carboxylique en plus de la fonction amine. Il s'agit d'acides moyens qui se trouvent sous forme déprotonée au pH physiologique.

Composé	pK_a	$\text{Log } P_{\text{oct}}$
<i>Cocaïne</i>	8,6 ^[5]	2,31 ^[12]
<i>Benzoylécgonine</i>	2,25 ^[12] et 11,2 ^[12]	1,29 ^[12]
<i>Ecgonine méthylester</i>	9,3 ^[13] et 14,2 ^[13]	- 0,23 ^[14]
<i>Ecgonine</i>	2,8 ^[5] et 9,1 ^[5]	- 0,81 ^[15]
<i>Cocaéthylène</i>	9,04 ^[14]	3,61 ^[14]
<i>Norcocaïne</i>	9,02 ^[14]	2,78 ^[14]
<i>Anhydroécgonine méthylester</i>	8,3 ^[16]	1,12 ^[15]

Tableau I- 1 : Valeurs des pK_a de la cocaïne et de ses principaux métabolites ainsi que de leurs coefficients de partage octanol/eau ($\log P_{\text{oct}}$). En rouge : pK_a de la fonction amine.

L'hydrophobie de la cocaïne et ses métabolites peut être estimée par la valeur de leurs constantes de partage octanol/eau (P_{oct}) même si ces valeurs évoluent à cause des propriétés acido-basiques de ces molécules ionisées au pH des échantillons biologiques. Dans tous les cas, parmi les métabolites de la cocaïne on observe qu'il y a une grande diversité de polarités puisque les valeurs de $\log P_{\text{oct}}$ vont de - 0,81 à 3,61. Le mélange de la cocaïne et ses deux métabolites principaux, la BZE et l'EME, constitue un modèle intéressant d'analyse dans les matrices biologiques puisque les trois molécules ont des polarités différentes et qu'elles présentent des propriétés acido-basiques variées.

I.1.4 Description des matrices biologiques d'étude pour la cocaïne

L'analyse de la cocaïne et de ses métabolites peut se faire dans diverses matrices biologiques. Les plus couramment étudiées sont l'urine, le sang, la salive et les cheveux, mais la cocaïne a déjà été quantifiée dans d'autres matrices telles que les poils, la sueur, les ongles, le méconium, le sébum, le sperme, les dents, le foie ou les muscles [5]. L'analyse de stupéfiants se fait généralement en deux étapes : une étape de dépistage (« screening ») pour identifier les substances dopantes présentes et une étape de confirmation et de quantification si le dépistage est positif [17]. Dans le Tableau I- 2 sont présentées des quantités usuellement retrouvées

dans les principales matrices biologiques ainsi que les seuils de positivité pour le dépistage et la confirmation qui leur sont associés.

Matrice biologique	Composé principalement recherché	Quantités retrouvées chez des consommateurs	Seuils de positivité pour le dépistage (D) et/ou la confirmation (C)
Urine	BZE	Cocaïne : 0,04-8,42 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ [18] BZE : 1,72-12,38 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ [18] EME : 0,161-25,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ [19]	D : 300 ng.mL^{-1} [20]
Sang	Cocaïne et BZE	Cocaïne : 2-62 ng.mL^{-1} [21] BZE : 48-1949 ng.mL^{-1} [21] EME : 2-78 ng.mL^{-1} [21]	D : 50 ng.mL^{-1} [20] C : 5 à 10 ng.mL^{-1} [20]
Cheveux	Cocaïne	Cocaïne : 500-216.10 ³ pg.mg^{-1} [22] BZE : 100-33.10 ³ pg.mg^{-1} [22] EME : 100-12.10 ³ pg.mg^{-1} [22]	D : 500 pg.mg^{-1} [22] C : 0500 pg.mg^{-1} [22]
Salive	Cocaïne et BZE	Cocaïne : 4-11110 ng.mL^{-1} [23] BZE : 5-11471 ng.mL^{-1} [23] EME : 4-1520 ng.mL^{-1} [23]	D : 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ [24] C : 8 $\mu\text{g.L}^{-1}$ [24]

Tableau I- 2 : Seuils de positivité et quantités usuelles de cocaïne et de ses deux métabolites principaux, BZE et EME, dans les matrices biologiques couramment analysées.

1.1.4.1 L'urine

En général, l'urine est utilisée pour l'étape de dépistage de la cocaïne. Il s'agit effectivement d'une matrice facile à obtenir de façon non invasive, dont les critères de validation de l'analyse sont établis, pour laquelle les concentrations de drogues et/ou de quelques métabolites sont élevées et qui est disponible en grande quantité [3]. L'urine est composée principalement d'eau, d'ions tels que du sodium, du potassium, des chlorures, du magnésium, du calcium, des phosphates, des sulfates, ou de l'ammonium, et de quelques molécules organiques comme l'urée, la créatinine et l'acide urique. On peut aussi trouver en faible quantité du glucose, des acides gras, des enzymes, des hormones, et des pigments. Comme il a été précisé dans la partie précédente, la durée de demi-vie de la cocaïne est courte et on ne retrouve que 1% à 9% de celle-ci dans les urines. Pour une meilleure conservation des échantillons d'urine, il convient de réduire l'hydrolyse alcaline de la cocaïne en diminuant le pH autour de 5 ou en conservant l'échantillon à très basse température, par exemple à -20°C [25]. Comme la BZE a une durée de demi-vie plus importante que celle de la cocaïne et que 35% à 45% de la dose initiale se retrouve sous cette forme métabolisée, c'est plutôt ce métabolite qui est recherché dans cette matrice biologique. La BZE met entre 3 et 5 jours à être éliminée des urines. Quant au temps d'élimination totale de la cocaïne, il dépend de divers facteurs dont la dose administrée, la fréquence d'utilisation, et les caractéristiques individuelles du consommateur, entre autres. Le dépistage se fait en général par des

immunoessais ciblant la BZE avec un seuil de positivité de 300 ng.mL^{-1} [1]. L'inconvénient principal de la matrice urine réside dans le fait qu'elle est facilement adultérable puisqu'elle peut être diluée ou substituée avant son analyse [26].

1.1.4.2 Le sang, le plasma et le sérum

Souvent, après l'étape de dépistage, c'est le sang, le plasma ou le sérum qui sont utilisés pour la quantification de drogues telles que la cocaïne. Cette matrice biologique est assez complexe puisqu'elle contient des ions, des protéines, des lipides, du glucose, des vitamines, des hormones et des gaz. Elle requiert donc un important traitement de l'échantillon [27]. Son analyse est donc plus coûteuse que celle de l'urine, de plus, son prélèvement est traumatique, ce qui explique son utilisation principalement en quantification et pas en dépistage. La cocaïne, la BZE, l'EME et le COCAE peuvent être quantifiés dans le sang. La cocaïne peut être détectée dans le sang entre 4 et 6 heures après la prise, et la fenêtre de détection de la BZE peut aller jusqu'à 48 heures. Comme la cocaïne est rapidement hydrolysée dans ce milieu, des conditions particulières doivent être prises pour la conservation de l'échantillon pour éviter sa dégradation une fois prélevé [4]. Néanmoins, l'étude du sang apporte un certain nombre d'avantages car ce n'est pas une matrice adultérable contrairement à l'urine. Il est relativement homogène car son pH, et les quantités de protéines et autres molécules qui le composent, varient faiblement, il permet une quantification juste après la consommation et avant l'action du métabolisme, et, à différence de l'urine, il permet une bonne interprétation du degré d'influence du produit sur le comportement [20].

1.1.4.3 Les cheveux

Outre ces fluides biologiques, il est aussi possible d'analyser la cocaïne dans les cheveux et de suivre ainsi la consommation de cocaïne à plus long terme grâce à une fenêtre de détection qui est assez longue. D'ailleurs, l'utilisation de cet alcaloïde par des anciennes civilisations péruviennes a été confirmée par l'analyse de cheveux de momies vieilles de plusieurs centaines d'années [28]. La composition de cette matrice est variable et constituée d'eau, de protéines, de lipides et de minéraux [29]. Le cheveu commence à pousser au niveau du follicule pileux qui est entouré d'un important réseau sanguin. À la base du cheveu, on trouve des réseaux de cellules nommées kératinocytes et mélanocytes. L'incorporation de la cocaïne dans les cheveux se fait par diffusion passive de la drogue des capillaires sanguins vers les cellules en croissance des bulbes pileux. Comme les cheveux poussent assez rapidement, environ 1 cm par mois, il est possible d'établir une évolution de la consommation de la drogue par une analyse segmentaire du cheveu. Les trois principaux paramètres qui ont une

influence sur l'incorporation de la drogue sont le contenu en mélanine qui est un pigment des cheveux, la lipophilie et la basicité de la drogue [22]. En effet, les cheveux foncés ont un degré d'oxydation de la mélanine important et retiennent davantage les drogues que les cheveux clairs. Pour ce qui en est des propriétés chimiques de la drogue, les molécules les plus lipophiles peuvent pénétrer les membranes cellulaires plus facilement que les molécules hydrophiles. De plus, la mélanine a une importante affinité pour les molécules basiques, et le pH des mélanocytes est plus acide que celui du plasma. Ce sont donc plutôt les drogues basiques et lipophiles qui s'accumulent dans les cheveux [22]. La cocaïne et ses métabolites sont tous des composés basiques, mais la plus grande lipophilie de la cocaïne fait que c'est cette dernière qui est principalement incorporée dans les cheveux. Un mécanisme alternatif d'incorporation se fait par diffusion de la sueur ou des sécrétions de sébum vers le cheveu, ainsi que par déposition de sources externes telles que la fumée ou la poussière. Ainsi, pour déterminer la consommation de cocaïne, il est important de s'affranchir de cette source externe par des méthodes de décontamination. En cas de doutes sur l'origine de la cocaïne détectée dans les cheveux, il est aussi possible d'analyser des rapports de métabolites [30, 31], ce qui est recommandé par la « Society of Hair Testing » lors d'une analyse quantitative [32]. La matrice cheveux est plus difficile à adultérer que la matrice urine, cependant, il existe des produits cosmétiques utilisés pour éliminer les drogues à la surface des cheveux. De plus, les produits de coloration et de décoloration altèrent la quantité de mélanine du cheveu entraînant une diminution des drogues fixées sur celui-ci. Finalement, si la personne n'a pas de cheveux, l'analyse peut se faire à partir des poils, mais la quantité d'échantillon est alors assez réduite.

1.1.4.4 La salive

Une autre matrice biologique alternative à l'urine est la salive. Celle-ci est constituée principalement d'eau mais contient aussi quelques ions (sodium, potassium, chlorure et bicarbonate) et des protéines (des enzymes telles que l'amylase et de la mucine). Comme dans le cas des cheveux, son prélèvement est non traumatique et il y a moins de risques de substitution que les urines [24]. La salive est une matrice qui s'avère utile pour la détermination de l'utilisation récente d'un stupéfiant. En effet, la fenêtre de détection pour la cocaïne dans la salive est de 5 à 12 heures après prise d'une dose unique [6]. Dans le cas de la BZE, la détection dans la salive est possible pendant 12 à 24 heures après la prise. La concentration de drogue libre dans la salive dépend des propriétés chimiques de la drogue ainsi que de la salive elle-même. C'est la membrane lipidique des cellules épithéliales qui séparent la salive du système circulatoire qui permet le passage des drogues dans celle-ci [33]. Les drogues peuvent être acheminées vers la salive par transport actif, par diffusion à travers les pores de la membrane lipidique, ou par diffusion passive assistée par un gradient de concentration. La concentration salivaire en cocaïne représente 4 à 5 fois la concentration

plasmatique, ce qui permet d'établir une corrélation entre la quantité rencontrée dans la salive et le niveau d'intoxication de l'individu [4]. L'inconvénient principal de l'analyse de drogues dans la salive est la faible quantité d'échantillon disponible. En effet, la plupart des dispositifs pour collecter la salive ne permettent pas d'obtenir plus de 1 mL d'échantillon. Pour augmenter le volume de salive, il est possible de stimuler la salivation, cependant, ceci change son pH, ce qui peut changer la concentration de drogues qu'on y retrouve [33]. Enfin, lors de l'analyse de drogues dans la salive il faut prendre en compte la contamination des échantillons par les aliments ou boissons ingérés avant le prélèvement [24].

1.1.4.5 La sueur

Une autre matrice biologique d'intérêt pour l'analyse de la consommation récente de cocaïne est la sueur. En général ces échantillons sont recueillis par des patchs commerciaux associés à un numéro d'identification unique pour diminuer les risques de substitution. Ce patch peut être appliqué dans une zone de transpiration intense pour une période de 5 à 10 jours pendant lesquels des drogues s'y accumulent [29]. Ceci permet le contrôle de la consommation de drogues pendant quelques jours. Les drogues sont incorporées dans la sueur par divers mécanismes comme la diffusion passive du sang vers les glandes sudoripares et la migration à travers la peau [34]. La concentration des drogues dans la sueur dépend de la transpiration individuelle, de l'emplacement et de la durée du port du patch. En général c'est la cocaïne que l'on retrouve majoritairement dans la sueur, mais l'analyse de métabolites peut être utile pour la confirmation de l'analyse lorsque ces métabolites ne peuvent être que formés dans l'individu lui-même et ne proviennent pas de l'environnement.

1.1.4.6 Autres matrices biologiques

D'autres matrices biologiques ont été utilisées pour l'analyse de la cocaïne mais elles sont beaucoup moins courantes. Une alternative aux cheveux pour l'analyse de la cocaïne à long terme sont les ongles [35]. Traditionnellement on utilise l'urine pour évaluer le degré d'exposition d'un fœtus durant la grossesse, mais comme la fenêtre de détection y est très courte, il peut s'avérer intéressant d'analyser le méconium, qui sont les premières selles du nouveau-né, les cheveux du nouveau-né ou de la mère, le liquide amniotique ou le cordon ombilical [36].

1.1.4.7 Matrices environnementales

L'analyse de drogues dans des matrices environnementales telles que les eaux usées [37], les eaux traitées [38] ou les eaux de surface [39] s'est développée depuis quelques années. En effet, il est possible de faire des estimations de la consommation de drogues d'une population à un faible prix et de façon anonyme grâce à l'analyse des niveaux de concentration des drogues et de leurs métabolites dans l'environnement [40]. Cependant, contrairement aux échantillons biologiques, les niveaux de concentration dans les eaux sont souvent dans le domaine des ultratracés (ng.L^{-1}), surtout pour le cas des eaux de surface ou des eaux traitées.

Ces matrices environnementales sont plus ou moins complexes et à différence des fluides biologiques, de plus grands volumes d'échantillons doivent être traités compte tenu des faibles concentrations retrouvées. D'ailleurs, la gamme de concentrations retrouvées dans ces matrices va de 77 ng.L^{-1} de BZE et 6 ng.L^{-1} de cocaïne. pour les eaux de surface, jusqu'à 810 ng.L^{-1} de BZE et 79 ng.L^{-1} de cocaïne pour les eaux usées [37].

En conclusion, la cocaïne et ses métabolites présentent une large gamme de polarités et elles sont étudiées dans diverses matrices à des concentrations de traces, et leur analyse a une importance capitale dans les domaines cliniques, toxicologiques, environnemental et de santé publique en général. Ceci souligne l'intérêt d'utiliser de telles molécules comme molécules modèles lors de l'évaluation de nouveaux outils analytiques. Un des points importants résidera aussi dans la comparaison des outils développés aux outils actuellement utilisés et présentés ci-après.

I.2 Les outils conventionnels pour l'analyse de traces dans des milieux biologiques

Cette partie est consacrée à la présentation des méthodes d'analyse quantitative de la cocaïne et de ses métabolites comme la chromatographie ou l'électrophorèse. Il existe parallèlement des bioessais utilisés pour le dépistage de la cocaïne et d'autres petites molécules dans des matrices biologiques, mais ils ne seront pas présentés ici car ils n'entrent pas dans le cadre du travail réalisé.

I.2.1 Méthodes de séparation

1.2.1.1 La chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse (GC) est une méthode de séparation utilisée principalement pour l'étude de composés gazeux ou volatils. L'échantillon à analyser est vaporisé à l'entrée de la colonne chromatographique qui renferme une phase stationnaire liquide ou solide. La phase mobile est un gaz vecteur, en général de l'hélium, de l'hydrogène ou de l'azote, et la séparation se fait par les différences des interactions développées entre les composés et la phase stationnaire et leur différence de volatilité. Cette méthode peut être facilement couplée à la spectrométrie de masse, ce qui lui confère un fort potentiel pour l'analyse de traces de composés volatils dans des échantillons complexes. La GC était, il y a une dizaine d'années, la méthode de séparation la plus utilisée pour l'analyse de la cocaïne et ses métabolites dans des matrices biologiques, la détection de ces composés se faisant principalement par spectrométrie de masse (MS) [19, 21, 34, 35, 41-47], mais aussi par des détecteurs thermoioniques à azote/phosphore (NPD) [48, 49]. La cocaïne, le COCAE et l'EME sont assez volatils et ils peuvent être analysés directement sans avoir besoin de les dériver. Dans le cas des autres métabolites, leur volatilité est faible et il est donc forcément nécessaire de les dériver avant leur analyse par GC [3].

Finalement, la GC reste encore une méthode couramment utilisée pour le dépistage et la confirmation de la cocaïne dans les matrices biologiques. Elle présente divers avantages comme son importante sensibilité, la facilité de couplage avec la MS, le faible prix de l'instrumentation, et donc sa disponibilité dans nombreux laboratoires d'analyse, et le fait qu'il s'agit d'une technologie mature pour l'analyse de drogues. Cependant, lors de l'analyse d'échantillons biologiques, le traitement de l'échantillon est souvent très important, et la dérivation des métabolites polaires rajoute une étape supplémentaire donc du temps, une source d'incertitude et un coût supplémentaires. La chromatographie en phase liquide (LC) peut séparer une gamme de polarités plus large sans nécessiter la dérivation des composés étudiés. L'essor de cette technique est considérable pour l'analyse de traces dans des milieux biologiques, surtout grâce aux progrès réalisés ces dernières années au niveau de son couplage avec la spectrométrie de masse.

1.2.1.2 La chromatographie en phase liquide

La LC est une méthode de séparation basée sur la distribution des composés analysés entre une phase mobile liquide et une phase stationnaire. La chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) est la méthode de choix pour l'analyse de traces dans des matrices biologiques. En effet, elle offre un large choix de phases stationnaires et permet donc la séparation de mélanges assez complexes avec des molécules de poids moléculaires, de

polarités et de propriétés acido-basiques variés. L'HPLC peut être couplée à plusieurs détecteurs, mais les plus couramment utilisés en bio-analyse sont les détecteurs ultraviolets (UV) et les spectromètres de masse.

Dans le cas de l'analyse de la cocaïne et de ses métabolites, la séparation se fait généralement par partage à polarité de phase inversée, où la phase mobile est plus polaire que la phase stationnaire et donc les interactions des analytes avec la phase stationnaire sont du type hydrophobe. Les phases utilisées le plus couramment sont des particules de silice greffées avec des groupements octadécyl (C18) [30, 50, 51] et octyle (C8) [52, 53], mais quelques applications sont basées sur l'utilisation de phases greffées phényle [54, 55], hexyle (C6) [56], pentafluorophényle [57], ou cyanopropyle [58]. On note aussi l'utilisation de phases stationnaires particulières polymériques en poly(styrène-divinylbenzène) [59]. Considérant la nature polaire de certains métabolites de la cocaïne, il est aussi possible de les séparer sur des phases stationnaires polaires et plus particulièrement par chromatographie à interactions hydrophiles (HILIC). Cependant, les applications relatives à l'utilisation du mode HILIC sont rares, et elles ne concernent que l'analyse dans les cheveux [60] et dans les eaux traitées [61]. En ce qui concerne la détection, elle peut se faire par fluorescence [51, 59, 62], par UV [52, 63, 64] et par MS [21, 30, 36, 41, 50, 53, 61, 65, 66]. Les deux méthodes optiques ne sont pas adaptées à certains métabolites de la cocaïne qui ont perdu le groupement chromophore ester de benzyle, c'est le cas de l'EME, l'ECG et l'AEME entre autres. Ainsi, la MS apparaît comme une méthode de détection de choix pour l'analyse de la cocaïne et ses métabolites dans les matrices biologiques par sa sensibilité et sa sélectivité, en plus de se présenter comme un outil de confirmation à fort potentiel.

De plus, dans le domaine de la bioanalyse, apparaît un besoin d'analyses rapides et performantes en raison du nombre souvent élevé d'échantillons à analyser [67]. En ce qui concerne la séparation, deux approches sont utilisées en LC pour réduire les temps d'analyse de la cocaïne et ses métabolites. Il s'agit de la chromatographie en phase liquide à ultra haute performance (UHPLC), et de l'utilisation de colonnes de séparation monolithiques. L'UHPLC est basée sur l'utilisation de particules de phase stationnaire de diamètre inférieur à 2 μm sous haute pression qui permettent en effet d'accélérer la séparation tout en gardant une bonne efficacité et donc un grand pouvoir séparatif. L'UHPLC est souvent utilisée pour l'analyse de la cocaïne et ses métabolites en parallèle avec d'autres drogues [68, 69]. La séparation peut aussi être réalisée sur des monolithes qui sont des phases stationnaires homogènes et continues, de structure bimodale, à savoir avec des macropores ($> 50 \text{ nm}$) qui leur confèrent une grande perméabilité, et des mésopores (2-50 nm) qui génèrent une surface de contact importante permettant d'assurer une bonne rétention des analytes. Ainsi, de par leur grande perméabilité, les monolithes permettent l'utilisation de débits élevés tout en conservant une bonne efficacité, ce qui permet de réduire fortement les temps d'analyse. Leur application avec la MS est plus délicate à cause des hauts débits de phase mobile. Donc pour leur

couplage à la MS il est nécessaire de diviser le flux après séparation pour diminuer le débit de phase mobile. Pour la cocaïne et ses métabolites, des phases monolithiques ont été utilisées pour l'analyse d'eau traitée par HPLC-MS [12] et pour l'analyse de plasma par HPLC-UV [70].

1.2.1.3 L'électrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire (CE) est une technique basée sur la séparation de composés dans un champ électrique. Elle permet des séparations efficaces, rapides et à partir de faibles volumes d'échantillons et de solvants, car les volumes sont réduits par le format capillaire. Un des désavantages principaux de la CE est sa faible sensibilité en UV. En effet, les faibles dimensions des capillaires ne permettent pas d'avoir des cellules de détection avec de longs chemins optiques. De plus, des protéines peuvent s'adsorber aux parois des capillaires, et la grande quantité d'interférents retrouvés dans les matrices biologiques peut nuire à l'analyse des composés ciblés. D'importants progrès ont été réalisés néanmoins dans ce domaine notamment pour le couplage de méthodes de préparation de l'échantillon ainsi que pour le couplage de détecteurs suffisamment sensibles comme le détecteur à fluorescence induite par laser (LIF) ou la MS [71]. La CE connaît donc actuellement un essor considérable dans le domaine de l'analyse de drogues dans des matrices biologiques, et grâce aux avancées technologiques actuelles, elle sera probablement un outil plus courant pour l'analyse de traces dans des matrices biologiques. Le nombre d'applications existantes pour l'analyse de la cocaïne et ses métabolites dans des matrices biologiques est assez réduit, la méthode utilisée étant la CE de zone. Des applications ont été réalisées pour l'analyse de la cocaïne et autres drogues dans les cheveux avec une détection UV [72], et pour l'analyse de la cocaïne et plusieurs de ses métabolites dans l'urine avec une détection MS [65].

1.2.2 La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est devenue un outil incontournable en association avec les techniques séparatives pour l'analyse de traces dans des échantillons complexes. En effet ses apports en sensibilité et en sélectivité font de cette technique de détection la plus utilisée actuellement en analyse de matrices biologiques.

1.2.2.1 Principe

La MS est une technique analytique basée sur la mesure des rapports masse sur charge (m/z) des ions détectés. Elle permet non seulement la quantification des molécules cibles, mais elle fournit aussi d'importantes informations sur la structure des molécules. En effet, la MS permet d'obtenir la masse moléculaire des composés ionisés, la masse des fragments de ces composés et parfois même leur formule brute. Le spectromètre de masse est formé de différentes parties [73] :

- Un système d'introduction de l'échantillon qui peut se faire directement par infusion dans le système, ou via un support solide lors de l'utilisation de méthodes de désorption, ou par couplage avec une méthode de séparation comme la GC, la LC ou la CE. Le choix dépend de la nature de l'échantillon et la méthode d'ionisation utilisée.

- Une source d'ionisation qui sert à former des ions. Les ions peuvent être produits en phase gazeuse par ionisation directe de l'échantillon ou en phase liquide par nébulisation puis désolvatation des ions formés. Le choix de la méthode dépend principalement de la nature de l'échantillon, mais surtout du type d'analyse réalisée.

- Un analyseur qui permet de séparer les ions formés en fonction de leurs rapports m/z . Cette séparation peut se faire grâce à l'action d'un champ électrique, ou par l'action d'un champ magnétique, ou encore par une combinaison des deux. Il existe plusieurs types d'analyseurs qui se différencient par le mécanisme de séparation qu'ils utilisent, par leur géométrie et par la résolution en masse qu'ils permettent d'atteindre.

- Un détecteur qui mesure le courant électrique généré par les ions provenant de l'analyseur, ce qui permet de déterminer l'abondance de chaque ion avec un rapport m/z donné.

1.2.2.2 Sources d'ionisation

La source d'ionisation permet de faire le couplage entre la méthode de séparation et la MS. Le choix de cette source d'ionisation dépend entre autres de la nature de l'échantillon et de la méthode d'injection utilisée. Dans cette partie sont exposées les sources adaptées au couplage de la MS avec la LC.

1.2.2.2.1 L'ionisation par électrospray (ESI)

Le processus d'ionisation lors de la formation d'un électrospray est assez complexe, mais il s'agit principalement de la formation d'un brouillard de gouttelettes chargées puis désolvatées [74]. Ces gouttelettes se forment normalement sous l'action conjuguée d'un gaz nébuliseur (azote) à température élevée et de l'application d'un champ électrique entre l'aiguille d'électrospray et le capillaire d'entrée du spectromètre de masse. En effet, le champ électrique

appliqué provoque la migration d'ions avec la même polarité vers la pointe de l'aiguille d'où la surface du liquide est éjectée en formant un « cône de Taylor ». Une fois que les gouttelettes chargées sont formées, elles perdent des molécules de solvant par évaporation et leur taille va donc diminuer de plus en plus jusqu'à ce que la tension superficielle de la goutte soit plus faible que la répulsion électrostatique due aux charges de même signe qui se trouvent au sein de la gouttelette (Figure I- 3). À ce moment-là, la gouttelette éclate pour former de nouvelles gouttelettes de plus en plus petites, c'est ce que l'on appelle des explosions coulombiennes. À la fin de cette série d'explosions, il ne reste plus qu'une molécule chargée solvatée. Ces ions solvatés sont séchés par la suite dans le capillaire d'entrée du spectromètre de masse à l'aide d'un gaz séchant qui est souvent utilisé à une température élevée (environ 300 °C) pour améliorer le séchage. Les ions sont ensuite focalisés vers l'intérieur du spectromètre de masse au niveau du *skimmer* ; une tension, couramment appelée tension de cône, est appliquée pour cette focalisation.

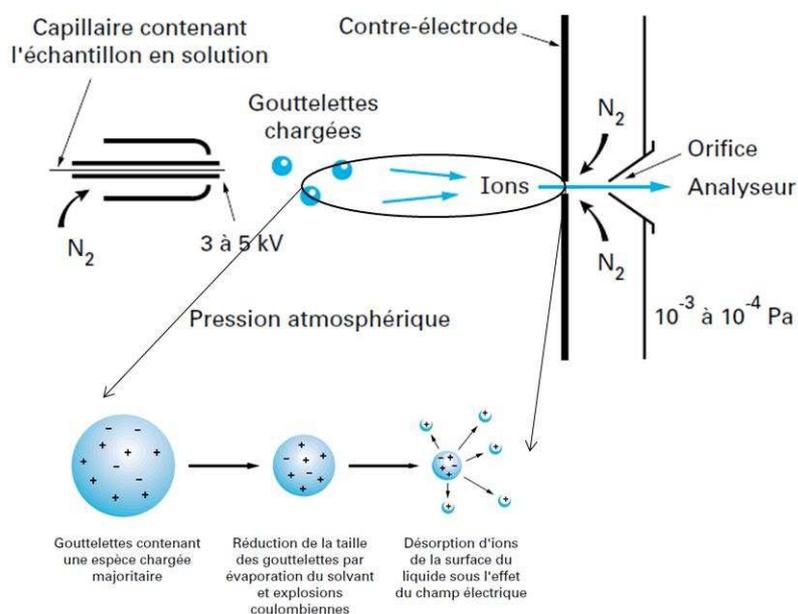


Figure I- 3 : Principe de l'électrospray (adapté de [74]).

L'ESI est une technique d'ionisation très douce qui permet d'analyser une large variété de composés organiques, inorganiques et biologiques. Elle peut être utilisée pour l'ionisation de petites molécules à condition qu'il soit possible de les protoner ou de les déprotoner. Le mode d'ionisation dépend de la polarité du champ électrique appliqué pour former le spray. En mode d'ionisation positif, les ions principalement formés sont du type $[M+H]^+$, tandis qu'en mode négatif il s'agit d'ions du type $[M-H]^-$. Des espèces multichargées ainsi que des adduits peuvent aussi être formés lors de l'utilisation de l'ESI.

Plusieurs facteurs jouent un rôle important pour l'ionisation des molécules analysées en particulier les propriétés physico-chimiques de celles-ci, telles que le pKa et le nombre de

sites protonables, mais aussi les propriétés de la phase mobile comme le type de solvant utilisé, son pH et l'ajout d'additifs acides ou basiques. D'ailleurs, quelques sels doivent être bannis pour la LC-MS, comme les phosphates car ils diminuent le rendement d'ionisation et ils peuvent en plus se déposer dans la chambre d'ionisation et obturer l'entrée du spectromètre de masse. La réponse générée par l'ESI est proportionnelle à la concentration de l'analyte, ce qui permet de miniaturiser le système sans perdre de sensibilité [75].

1.2.2.2 L'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI)

La nébulisation est aussi utilisée dans une source APCI. Un aérosol est formé dans le système nébuliseur grâce à un flux coaxial d'azote, puis il est ensuite vaporisé par un apport de chaleur dans une chambre chauffée à des températures élevées (jusqu'à 500°C) nommée vaporiseur. L'utilisation de débits élevés ainsi que du flux coaxial d'azote évitent la dégradation des molécules malgré la haute température du vaporiseur [75]. Il est possible d'avoir quelques ions provenant de la solution qui se retrouvent ensuite en phase gazeuse, mais la plupart des ions sont formés par ionisation chimique. En effet, l'utilisation d'une décharge (3-6 kV) apportée par une aiguille à décharge Corona produit un courant d'électrons ionisants qui ionisent les molécules qui se trouvent dans l'air ambiant comme le N₂ ou l'eau, et forment un plasma. Ces molécules ionisées réagissent avec les analytes pour les ioniser à leur tour principalement sous forme de [M+H]⁺ en mode positif ou [M-H]⁻ en mode négatif. L'APCI peut être utilisée pour des composés de polarité moyenne avec des masses moléculaires en dessous des 1000 Da et qui ne soient pas thermolabiles. L'APCI est donc complémentaire de l'ESI. La différence principale entre ces deux sources est que l'ionisation se fait en phase gazeuse pour l'APCI tandis qu'elle se fait en phase liquide pour l'ESI, ce qui permet d'utiliser avec l'APCI des solvants qui ne sont pas favorables pour l'ionisation. Ces deux modes d'ionisation diffèrent aussi par leur signal, puisque la réponse lors de l'utilisation de l'APCI ne dépend pas de la concentration de l'analyte mais plutôt de la quantité d'ions engendrés par les réactions dans la source ; elle dépend donc de la quantité d'analyte injectée.

1.2.2.3 La photo-ionisation à pression atmosphérique (APPI)

L'APPI est une méthode d'ionisation à pression atmosphérique plus récente et proche de l'APCI. Au lieu d'utiliser une décharge Corona pour induire l'ionisation en phase gazeuse, l'APPI utilise un rayonnement UV intense (lampe à krypton) pour provoquer l'ionisation. L'énergie utilisée pour l'APPI n'est pas suffisante pour ioniser les constituants de l'air ou les solvants utilisés couramment en HPLC, il est donc souvent nécessaire d'ajouter des composés dopants (toluène, acétone) qui sont photoionisables et permettent de transmettre l'énergie du rayonnement au solvant ou aux analytes par transfert de charge. L'APPI est adaptée à l'analyse de molécules peu polaires avec des masses moléculaires moyennes. Elle est donc complémentaire de l'ESI et l'APCI. Le nombre d'applications de l'APPI est croissant, mais

cette technique reste néanmoins plus délicate à mettre en œuvre car le choix de l'agent dopant ainsi que sa concentration doivent être évalués pour chaque application [76].

En conclusion, pour l'analyse de la cocaïne et ses métabolites par LC-MS dans des fluides biologiques, il est possible d'utiliser des sources d'ionisation ESI ou APCI puisqu'elles sont adaptées à l'ionisation de molécules de faible poids moléculaire et plutôt polaires. Cependant, l'ESI semble être utilisée plus souvent que l'APCI, probablement car son domaine d'application en termes de polarité permet d'étudier des molécules plus polaires.

1.2.2.3 Les analyseurs utilisés en LC-MS

Une fois les ions formés, ils sont transférés de la source vers l'analyseur qui se trouve sous un vide poussé pour éviter les chocs entre particules qui pourraient dévier leur trajectoire ou provoquer leur dissociation. Les analyseurs permettent de séparer les ions provenant de la source en fonction de leur rapport m/z . Les principes de séparation des ions diffèrent en fonction du type d'analyseur utilisé. Pour ce faire, il est possible d'utiliser un champ magnétique qui peut être variable (spectromètres de masse à secteur magnétique) ou fixe (résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier), ou un champ électrique qui peut lui aussi être fixe (spectromètre de masse à temps de vol ou TOF) ou variable (quadripôle ou piège à ions). Ces analyseurs se différencient aussi par la résolution en masse qu'ils peuvent permettre d'atteindre, celle-ci étant en effet définie par le rapport $m/\Delta m$. La résolution traduit donc la capacité du système à séparer deux ions dont les rapports m/z sont proches et elle estime l'erreur commise sur la mesure de la masse. Dans le cadre de l'analyse de traces dans des matrices biologiques, les analyseurs du type filtre quadripolaire, piège à ions et TOF sont les plus souvent utilisés.

1.2.2.3.1 Les filtres quadripolaires

Un quadripôle est formé de quatre barres cylindriques ou hyperboliques parallèles et équidistantes sur lesquelles peuvent être appliquées des différences de potentiel (Figure I- 4). Les barres métalliques jouent donc un rôle d'électrodes. Les barres opposées sont reliées deux à deux et soumises à des tensions électriques où une des composantes est une tension alternative à haute fréquence et l'autre est une tension continue. L'application de ces tensions crée un champ quadripolaire entre les quatre électrodes et les ions qui entrent dans ce champ selon l'axe z subissent une force qui les fait osciller dans les plans x et y [77]. Les trajectoires des ions qui entrent dans le quadripôle sont définies par les équations de Mathieu qui dépendent des valeurs des tensions appliquées aux électrodes, ainsi que de la fréquence de la tension alternative, de la distance entre les électrodes, et des caractéristiques de l'ion (masse

et charge). Pour que les ions traversent le quadripôle et arrivent au détecteur, leur trajectoire doit être stable, ce qui correspond à un couple de valeurs de tension défini. Les autres ions sont déviés de leur trajet et se déchargent par contact avec les barres du quadripôle, sans être détectés.

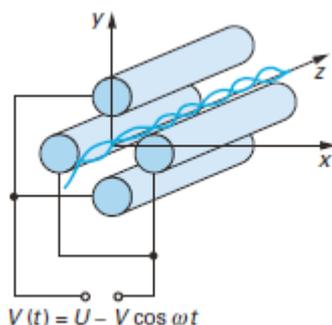


Figure I- 4 : Schéma représentant un filtre quadripolaire (adapté de [73]).

Le quadripôle peut être utilisé soit en mode balayage (« scan »), soit en mode de filtrage sélectif (« Single Ion Monitoring », SIM). Le mode scan permet de détecter tous les ions obtenus dans un domaine de m/z défini. En mode SIM, l'acquisition se fait pour un ou plusieurs rapports de m/z définis par l'utilisateur. Ce deuxième mode confère de la sélectivité à l'analyse et permet d'obtenir de meilleures sensibilités pour une analyse quantitative. Cette sélectivité est un avantage important pour l'analyse de traces dans des milieux complexes tels que les échantillons biologiques. En plus, la facilité de mise en œuvre, la simplicité de fonctionnement et le faible coût du filtre quadripolaire par rapport aux autres analyseurs font de cet analyseur le plus utilisé actuellement dans l'analyse par spectrométrie de masse.

1.2.2.3.2 Le triple quadripôle

Il est possible d'associer plusieurs quadripôles en série pour fragmenter les ions provenant de la source au niveau de l'analyseur. Dans le cas du triple quadripôle, deux quadripôles (Q_1 et Q_2) sont utilisés en tant que filtres de masse, et un troisième quadripôle (q), placé entre Q_1 et Q_2 , dans lequel on peut introduire un gaz de collision, est employé comme une cellule de collisions (Figure I- 5). Dans la cellule de collision, les ions sélectionnés par Q_1 en fonction de leur rapport m/z entrent en collision avec les molécules de gaz. L'énergie de collision dépend de l'énergie cinétique des ions qui, lors des collisions, est transformée en énergie interne et qui peut être amplifiée par l'application d'une tension dans la cellule de collision. Ces collisions peuvent alors induire une dissociation des ions et former des fragments qui vont dans Q_2 . Ce quadripôle fonctionne comme un filtre quadripolaire où sont balayés ou sélectionnés les fragments, ou ions fils pour aller ensuite dans le détecteur.

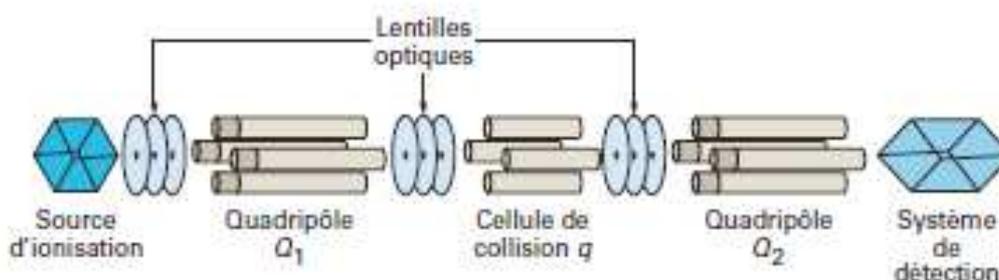


Figure I- 5 : Schéma de principe du triple quadripôle (adapté de [73]).

La configuration du triple quadripôle permet de détecter des ions fils provenant d'un ion parent défini (« product ion scan »), mais il est aussi possible de retrouver un ion parent à partir d'un ion fragment connu (« precursor ion scan »). Si une différence de masse entre les quadripôles Q_1 et Q_2 est fixée, il est possible de détecter tous les ions parents susceptibles de perdre cette masse dans la cellule de collision (« constant neutral loss »). De la même façon, il est possible de détecter le gain d'un groupement neutre, mais cela implique une certaine réactivité des ions au niveau de la cellule de collision. Finalement, si un ion fils défini provenant d'un ion parent défini (transition) est détecté, l'analyse peut gagner en sélectivité et donc en sensibilité. Ce mode de détection est appelé SRM (« Single Reaction Monitoring ») lorsqu'on étudie une seule transition, ou MRM (« Multiple Reaction Monitoring ») quand plusieurs transitions sont suivies.

1.2.2.3.3 Le piège à ions

Le piège à ions, ou trappe ionique, est basé sur les mêmes principes fondamentaux que le quadripôle, mais la géométrie cylindrique du piège à ions fait que le champ quadripolaire généré isole les ions au sein du piège. Le piège à ions est constitué de deux électrodes hyperboliques, nommées électrodes chapeau, et d'une électrode annulaire. Les électrodes chapeau sont perforées pour permettre l'entrée des ions provenant de la source puis la sortie des ions vers le détecteur. Un potentiel de radiofréquence est appliqué au niveau de l'électrode annulaire pour créer un champ quadripolaire qui permet de piéger les ions. Les ions ont alors un mouvement oscillant qui peut être défini par les équations de Mathieu et qui dépend des tensions appliquées au niveau des électrodes, de leur fréquence et du rapport m/z . Les ions sont ensuite éjectés vers le détecteur lors de l'application d'un potentiel à une fréquence correspondant à la fréquence caractéristique de l'ion, ou lorsque les potentiels sont balayés dans tout le domaine de fréquence. Pour mieux confiner les ions au centre de la trappe, un gaz inerte (He, Ar) à faible pression peut être intégré dans le piège à ions. La modulation des tensions de l'appareil permet non seulement d'isoler les ions mais aussi de les fragmenter par collision avec le gaz inerte. À la différence du triple quadripôle, les étapes d'isolement puis de fragmentation se produisent dans le temps et pas dans l'espace, il est donc

possible d'obtenir des spectres de fragmentation qui peuvent aller théoriquement jusqu'à MS^n . D'ailleurs il est possible d'aller jusqu'à un niveau de fragmentation de MS^{4-5} sans trop perdre de sensibilité.

Le piège à ions est avantageux d'un point de vue coût, par sa facilité de fonctionnement et par sa taille qui est relativement petite par rapport à d'autres analyseurs de masse. Le principal inconvénient de cet analyseur est qu'il est limité du point de vue de sa capacité de stockage d'ions, ce qui est un vrai problème lors de l'injection d'échantillons complexes car le système analytique peut rapidement se retrouver saturé [76]. De plus, le temps d'injection des ions dans le piège à ions est assez long, ce qui ne permet pas de travailler à de très hauts débits avec cet instrument.

1.2.2.3.4 L'analyseur à temps de vol (TOF)

Avec cet analyseur, les ions sont tout d'abord accélérés par l'application d'un champ électrique, puis ils entrent dans une zone libre de champ appelée tube de vol et la séparation des ions se base alors sur leur différence de temps de vol. La séparation des ions va donc dépendre de la vitesse qu'ils auront acquise lors de la phase d'accélération. Les ions ayant un rapport m/z plus petit seront les premiers à atteindre le détecteur. Connaissant les dimensions de l'instrument ainsi que l'énergie cinétique des ions, il est possible de calculer le rapport m/z de l'ion étudié. Pour ce type d'analyseur, la distribution dans l'espace ainsi que la distribution des énergies cinétiques des ions à l'entrée de l'accélérateur peuvent générer des problèmes en termes de résolution puisque deux ions identiques ayant une différence de position spatiale ou d'énergie cinétique à l'entrée de l'analyseur n'ont pas la même énergie cinétique en sortie de l'accélérateur et leur temps de vol est donc différent. L'utilisation d'un réflecteur électrostatique ainsi que la focalisation du faisceau d'ions à l'orthogonale du tube de vol permettent de pallier ce problème et confèrent au TOF une résolution très élevée et par conséquent une très grande sensibilité [77]. En plus de sa grande résolution, le TOF a une très bonne stabilité et sa transmission est excellente. La grande rapidité de balayage de cet analyseur facilite son couplage avec la chromatographie rapide. Finalement, le TOF n'a théoriquement pas de limite pour le domaine de masses transmises. La technologie utilisée pour la fabrication d'un TOF, et en particulier l'électronique nécessaire pour avoir une bonne résolution, font que cet analyseur est encore très cher par rapport aux quadripôles ou aux pièges à ions.

1.2.2.4 Limitations des spectromètres de masse : les effets de matrice

Le développement d'instruments performants dans le domaine du couplage de la HPLC avec la MS fait que cette méthode est aujourd'hui la plus utilisée pour l'analyse de traces dans des milieux complexes. En effet, l'HPLC-MS, et plus particulièrement l'utilisation de méthodes d'analyse en tandem, apporte une grande sélectivité et donc une très grande sensibilité qui sont deux caractéristiques nécessaires à l'analyse de traces dans des milieux biologiques. Il serait donc en théorie possible de réduire, voire d'éliminer les étapes de préparation de l'échantillon ainsi que les temps de séparation chromatographique lors de l'utilisation d'un spectromètre de masse en tandem. Cependant, même si la co-élution de composés interférents ne génère pratiquement jamais de signaux parasites lors de la détection en MS², ces interférents peuvent altérer l'efficacité de l'ionisation des analytes cibles en conduisant alors à des quantifications erronées. Ce phénomène est connu sous le nom d'effets de matrice et il se traduit par une suppression ou une amplification du signal. Le mécanisme par lequel se produisent ces effets de matrice n'est pas totalement élucidé, mais il semblerait que ce phénomène soit lié à une compétition entre les ions du composé cible et des composés non-volatils de la matrice pour accéder à la surface des gouttelettes formées lors de la nébulisation [78]. Une étude a montré que les principaux mécanismes affectant l'ionisation interviennent en phase liquide [79]. Cette étude a comparé les effets de suppression d'ions en ESI ou en APCI et a montré que l'ESI est beaucoup plus affectée que l'APCI. Le mécanisme de suppression d'ions n'est donc pas le même dans ces deux méthodes. Il semblerait que pour l'APCI la suppression d'ions soit surtout liée à des co-précipitations de composés non-volatils avec les analytes cibles. Pour l'ESI, la précipitation n'est pas le mécanisme principal de la perte de signal, celle-ci serait plutôt liée à un changement des propriétés de viscosité et de tension de surface de la solution qui empêcherait la formation des gouttelettes de l'électrospray. Un certain nombre de composés peuvent altérer l'ionisation des analytes, comme des protéines, des sels, des anticoagulants, et autres molécules endogènes [80].

Sachant que les effets de matrice affectent la précision des analyses ainsi que leur sensibilité, il est nécessaire de les estimer. D'ailleurs, dans les domaines de l'analyse médico-légale et clinique, l'étude des effets de matrice est obligatoire lors de la validation d'une méthode. Il est possible d'évaluer ces effets par deux méthodes : soit par addition de l'analyte après le traitement de l'échantillon, soit par infusion post-colonne [78]. Pour la technique d'addition post-traitement de l'échantillon, l'évaluation de l'effet de matrice se fait en injectant un échantillon dopé après le traitement d'échantillon et en comparant avec l'injection d'un échantillon en solution pure. L'effet de matrice se calcule en faisant la différence des deux signaux et en la divisant par le signal en milieu pur pour obtenir un pourcentage de suppression ou d'exaltation du signal. Dans le cas de la technique d'infusion post-colonne, elle consiste à infuser en sortie de la colonne analytique et juste avant l'entrée du spectromètre de masse, une solution pure dopée avec l'analyte cible à une concentration proche de celle attendue pour l'échantillon réel. Ensuite, un échantillon qui ne contient pas d'analyte cible est

injecté dans les conditions d'analyse chromatographique souhaitées et la réponse de l'analyte infusé est enregistrée. S'il n'y a pas d'effets de matrice durant l'analyse, le signal obtenu doit avoir la même allure que celui obtenu dans le cas d'une injection de phase mobile. Une étude a été réalisée pour comparer les effets de matrice obtenus pour l'analyse de plusieurs opioïdes, de la cocaïne et de leurs métabolites par HPLC-MS/MS en fonction du type d'ionisation (ESI ou APCI), de la préparation de l'échantillon (injection directe, dilution, précipitation des protéines ou SPE) et de la matrice biologique (sang, urine ou salive) [81]. Les effets de matrice ont été évalués par infusion post-colonne avec une solution contenant de la morphine à une concentration de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Un exemple de ce type d'analyse est présenté en Figure I-6.

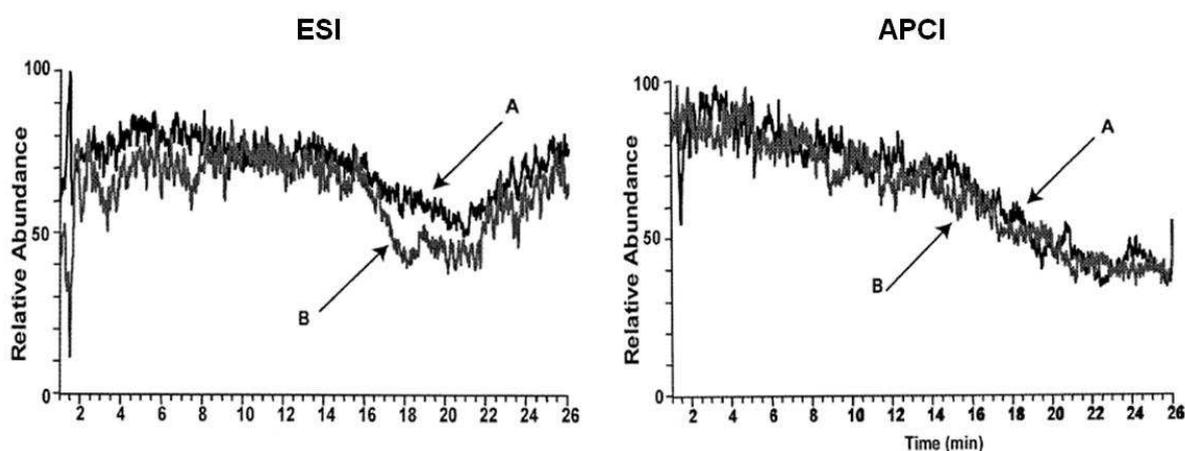


Figure I- 6 : Chromatogrammes en HPLC-MS/MS post infusion de morphine à $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ avec une ionisation par ESI ou par APCI d'une injection de phase mobile (A) et d'une injection d'un échantillon de salive après la précipitation de ses protéines avec de l'acétonitrile (B). (adapté de [81]).

Des phénomènes de suppressions d'ions ont été observées avec les deux modes d'ionisation mais ils sont beaucoup plus importants lors de l'utilisation de l'ESI. Les effets de suppressions d'ions dépendent du traitement d'échantillon utilisé. Pour cette étude les meilleurs résultats en termes de diminution des effets de matrice ont été obtenus après une simple dilution de l'échantillon, même si la SPE est souvent préconisée pour l'élimination des interférents de la matrice. En effet, la SPE permet non seulement d'éliminer les autres composants de la matrice mais aussi de pré-concentrer les analytes. Cependant, si la sélectivité du processus de rétention n'est pas suffisante, les interférents peuvent se retrouver eux aussi pré-concentrés. C'est le cas pour cette étude, d'où l'obtention d'importants effets de matrice après ce pré-traitement. Finalement, lors de la comparaison des effets de matrice obtenus en fonction de la matrice biologique étudiée, chacune des matrices a conduit à des effets de matrice, mais les temps de rétention correspondant à ces interférences et donc leur polarités ne sont pas les mêmes en fonction de la matrice étudiée. En milieu urinaire, les principales interférences sont des composés plutôt hydrophiles. Dans le cas de la salive, plus d'interférents sont présents que dans l'urine et leur nature est hydrophile et hydrophobe. Pour

le plasma, les interférents ont des polarités assez variées, comme dans le cas de la salive, mais ils sont présents en plus grande quantité. Malgré l'intérêt de l'information obtenue, il faut noter que les effets de matrice sont dépendants de la nature de l'analyte étudié. Des précautions doivent donc être prises pour corrélérer les résultats obtenus pour la morphine aux autres drogues analysées avec cette méthode.

Il existe plusieurs moyens pour réduire ou éliminer les effets de matrice. Une des solutions est de modifier la méthode de séparation pour éviter d'avoir des interférents co-élus avec les analytes cibles. Une autre option est de changer la méthode d'ionisation dans la limite du possible, l'APCI présentant en effet moins d'effets de matrice. Il faut toutefois que la méthode d'ionisation choisie soit compatible avec les composés étudiés. L'utilisation d'étalons internes choisis de façon à ce qu'ils subissent les mêmes effets de matrice que les analytes cibles est une option qui permet de prendre en compte des effets de matrice lors de la quantification. Une autre option est de réduire la quantité d'interférents soit par dilution de l'échantillon avant de l'injecter, soit en diminuant le volume d'échantillon injecté, mais cette stratégie augmente en même temps les limites de quantification. Finalement, la méthode la plus courante, et souvent la plus efficace pour prendre en charge les effets de matrice, est celle d'améliorer la préparation de l'échantillon pour éliminer la majorité des interférents.

I.2.3 Le traitement de l'échantillon

En bioanalyse, la préparation de l'échantillon est essentielle car les matrices complexes étudiées ont de nombreux constituants endogènes qui peuvent interférer avec les substances cibles. En fonction de la complexité de la matrice biologique étudiée, et des propriétés physico-chimiques des analytes d'intérêt, diverses méthodes de préparation de l'échantillon sont disponibles. Celles-ci facilitent l'identification et la quantification des analytes cibles lors de la séparation chromatographique. La préparation de l'échantillon se fait en plusieurs étapes et peut répondre à divers objectifs y compris la suppression d'interférents endogènes, l'isolement des analytes de la matrice, la concentration des analytes, ou l'amélioration de la sélectivité. Dans le cadre de ce travail, les matrices étudiées sont uniquement de nature biologique.

I.2.3.1 Précipitation des protéines

La plupart des matrices biologiques contiennent des protéines à des concentrations plus ou moins élevées. Dans le cas des échantillons sanguins, la concentration de protéines est tellement élevée qu'elle ne permet pas son analyse chromatographique directe. Les protéines

ne sont en général pas compatibles avec l'HPLC car elles peuvent s'adsorber et changer la nature de la phase stationnaire et elles peuvent précipiter dans la colonne et l'obturer. Les protéines ne sont pas volatiles donc incompatibles avec la GC. Elles interfèrent avec certains détecteurs et contribuent à la suppression d'ions en MS. La méthode la plus couramment utilisée pour éliminer en partie ces protéines consiste en leur précipitation suivie d'une étape de filtration ou de centrifugation. La précipitation des protéines est obtenue par l'ajout de composés ou solvants qui perturbent leur solubilité. En effet, la solubilité des protéines résulte de plusieurs types d'interactions : des interactions polaires avec le solvant, des interactions ioniques avec des sels, et des interactions électrostatiques de répulsion entre les molécules de même charge [82]. Les différents agents utilisés ont différents modes d'action pour induire la précipitation :

- Les solvants organiques (acétonitrile, méthanol...): ils déplacent les molécules d'eau entourant la protéine et réduisent la valeur de la constante diélectrique de la solution en favorisant ainsi des interactions électrostatiques entre les protéines, aboutissant à leur agrégation. Des détergents neutres dilués ont le même type d'effet que les solvants organiques sur la précipitation des protéines.

- Les acides (HCl, acide trichloroacétique, acide sulfosalicylique...): lors de leur ajout, les groupements amine des protéines qui se trouvent protonés à un pH inférieur à leur point isoélectrique (pI), forment des sels insolubles avec les bases conjuguées des acides utilisés.

- Les solutions de sels concentrés (sulfate d'ammonium...): lors de leur ajout à haute concentration, ils attirent des molécules d'eau pour leur hydratation en dépit des protéines qui forment donc des agrégats via des interactions hydrophobes.

- Les cations métalliques (Zn^{2+} , Cu^{2+} ...): leur ajout réduit la solubilité des protéines car ils altèrent leur pI. En effet, les cations métalliques sont en compétition avec les protons pour interagir avec les groupements acides des protéines ; les protons sont donc déplacés et le pH de la solution diminue. Le changement du pI ainsi que la diminution du pH induisent la précipitation des protéines.

Lors d'une étude de l'efficacité d'élimination des protéines dans des échantillons de plasma, il s'est avéré que les agents les plus efficaces étaient le sulfate de zinc, l'acétonitrile et l'acide trichloroacétique [82] qui ont conduit à des pourcentages supérieurs à 90% de protéines éliminées. Ces trois agents de précipitation sont en plus compatibles avec une détection en MS. Une autre étude montre que le rendement n'est pas le même en fonction de l'agent de précipitation utilisé pour l'analyse de composés pharmaceutiques dans du plasma [83]. En effet un problème assez courant lors de la précipitation de protéines est l'adsorption des analytes et donc une perte en taux de récupération de l'analyte. Dans cette étude, l'acétonitrile semble présenter de meilleurs rendements que l'acide trichloroacétique ou l'acide

perchlorique [83]. En plus d'être une méthode de préparation de l'échantillon assez simple et rapide, l'automatisation de la précipitation de protéines est actuellement possible sur des plaques 96 puits [66]. Cependant, il s'agit d'une méthode de préparation de l'échantillon qui n'est pas sélective, et donc peut nécessiter l'introduction d'étapes de préparation supplémentaires pour l'analyse quantitative puisque d'autres interférents que les protéines peuvent affecter la détection UV et l'ionisation lors d'une analyse par MS.

La précipitation de protéines a souvent été utilisée pour l'analyse de la cocaïne et de ses métabolites, notamment dans l'urine [65], le plasma/sang/sérum [50, 84, 85], le muscle [21] ou la salive [66, 86]. Dans ces différents travaux, la précipitation a été réalisée avec de l'acétonitrile, ou du méthanol, de l'acide sulfosalicylique, ou de l'acide chlorhydrique, et du sulfate de zinc. Dans certains cas, la précipitation a juste été suivie d'une filtration avant l'analyse chromatographique [21, 57, 84, 87]. Dans d'autres cas, des procédures d'extraction sur phase solide ont été utilisées [65, 66, 86].

1.2.3.2 Extraction liquide/liquide

1.2.3.2.1 Principe

L'extraction liquide-liquide (LLE) a été l'une des premières méthodes de préparation de l'échantillon à être utilisées pour l'analyse de matrices biologiques. La LLE est basée sur le partage des analytes entre deux phases liquides non miscibles qui sont en général une phase aqueuse (sang, urine, salive...) et une phase organique. Lorsque les deux phases sont en contact, un équilibre de partage de l'analyte A entre les deux phases se met en place. Pour obtenir des rendements d'extraction élevés, plusieurs paramètres peuvent être optimisés comme le pH de la phase aqueuse, la nature du solvant extractant et le volume de chacune des deux phases [88]. En général, le volume du solvant organique est plus important que celui de la phase aqueuse, tout d'abord car le rendement est théoriquement plus important, mais aussi parce que cela permet de réduire le risque d'émulsions qui est l'un des inconvénients majeurs de la LLE appliquée à des matrices biologiques. En effet, pour favoriser la diffusion du soluté au sein de chaque phase, il est nécessaire de bien mélanger les phases liquides par agitation, et ceci peut créer des émulsions qui entraînent des pertes de rendement. Pour casser une émulsion il est possible d'ajouter des sels dans la phase aqueuse, de filtrer ou de centrifuger les phases liquides. L'utilisation d'adsorbants polaires permet aussi de piéger l'échantillon aqueux pour faire de la LLE assistée par support solide. La phase organique est ensuite appliquée sur cette cartouche, l'extraction liquide-liquide s'effectuant au cours de la percolation de la fraction organique qui est ensuite récupérée [14]. La LLE assistée par support solide permet donc de simplifier et automatiser la LLE sans avoir à séparer les phases et dans un temps assez court.

Considérant que l'analyte qui se trouve initialement dans la phase aqueuse doit se solubiliser dans la phase organique, il doit se retrouver préférentiellement sous forme non ionisée. Donc le pH de la phase aqueuse doit être ajusté en fonction des propriétés de l'analyte cible. Il est aussi possible d'ajouter des réactifs qui permettent la formation de paires d'ions pour contrer les charges du composé ionisable. L'addition de sels dans la phase aqueuse peut aussi réduire la solubilité des composés dans celle-ci, favorisant le partage vers la phase organique, mais dans le cas de la LLE pour des matrices biologiques, les quantités de sels dans les échantillons sont déjà assez élevées. Finalement, le choix du solvant organique constitue le paramètre le plus important pour la LLE. Ce choix dépend de la solubilité et de la polarité du ou des analytes cibles. Un large choix de solvants est disponible. Les propriétés à tenir en compte pour ces solvants sont leur polarité, leur solubilité dans l'eau qui doit être faible, et leur point d'ébullition, qui doit aussi être faible dans le cas d'une éventuelle évaporation permettant de concentrer l'extrait. Pour la polarité du solvant, elle doit idéalement être proche de celle de l'analyte cible, ce qui permet sa solubilisation. Mais pour obtenir une meilleure sélectivité, le solvant le plus apolaire pouvant solubiliser la molécule cible doit être utilisé, réduisant ainsi l'extraction d'interférents plus polaires. Les propriétés d'un solvant organique peuvent être modifiées par l'ajout d'un solvant ayant une hydrophobie différente pour mieux solubiliser les molécules cibles. Les solvants les plus couramment utilisés sont des solvants chlorés ou des hydrocarbures.

Un des avantages principaux de la LLE pour l'analyse d'échantillons biologiques, est qu'elle permet en parallèle la dénaturation des protéines et la préconcentration des analytes lors de l'étape d'évaporation du solvant organique et de reprise avec un faible volume de solution. Il a été démontré que les extraits ainsi obtenus génèrent souvent moins d'effets de matrice lors de leur analyse par LC-MS [89]. La LLE est également une méthode facile de mise en œuvre avec un appareillage assez simple, elle reste donc une méthode largement utilisée pour l'analyse de traces dans des milieux biologiques. Cependant, par principe, la LLE est assez limitée lorsqu'il s'agit d'extraire des composés polaires de matrices biologiques aqueuses car ils ont une affinité plus importante pour l'eau que pour les solvants organiques non miscibles avec l'eau utilisés pour la LLE. En plus, dans un format classique, l'importante quantité de solvant utilisée, et l'utilisation de solvants chlorés peuvent être nocifs pour l'environnement.

1.2.3.2.2 Application à l'analyse de la cocaïne et de ses métabolites

Pour l'analyse de la cocaïne et de quelques-uns de ses métabolites la procédure de LLE consiste généralement à une alcalinisation de l'échantillon pour neutraliser les groupements amine des molécules et ainsi favoriser le partage vers le solvant organique, suivie d'une extraction dans un solvant organique et des fois même une contre-extraction dans un solvant aqueux acidifié. Plusieurs solvants ont été utilisés pour la LLE de la cocaïne et ses métabolites d'échantillons biologiques, le Tableau I- 3 présente quelques exemples.

Matrice Biologique	Analytes	pH	Solvant organique	Rapport $V_{(aq)}/V_{(org)}$	Rendement	Source
Extraits de cheveux	COC (BZE)	9	dichloromethane 1,2-dichloroethane heptane isopropanol (Toxitubes A)	2mL par Toxitube	94,9%	[59]
	COC, BZE, EME, COCAE et autres drogues	8,4	Ext 1 - chloroforme : isopropanol : n-heptane 50:17:33 Ext 2 - HCl 0,2 M Ext 3 - chloroforme	Ext1 : 2/5 Ext2 : 1/2 Ext3 : 1/1	n.m.	[44]
Plasma	COC (BZE)	8,9	isopropanol : chloroforme 1:9	1/14	98,5%	[59]
	COC, BZE, COCAE et desipramine	9,7	Ext1: hexane 0,2 % alcool isoamylique Ext2: HCl 0,1 M	Ext1 : 1/5 Ext2 : 1/35	71,4% en moyenne	[56]
	COC, BZE, NORCOC et kétamine	9	isopropanol : chloroforme 1:9	1/4	n.m.	[90]
	COC, BZE, NORCOC et COCAE	6	chloroforme	1/15	56,6% BZE 78,6% COC 61,1% NORCOC 67,0% COCAE	[91]
Salive	COC, BZE, COCAE et autres drogues	9	dichloromethane 1,2-dichloroethane heptane isopropanol (Toxitubes A)	1mL par Toxitube	69% BZE 86% COC 95% COCAE	[63]
Sérum	COC et COCAE	n.m.	hexane	1/3	81% COC 81% COCAE	[58]
	COC, BZE, NORCOC, NORBENZ	9	Isopropanol :chloroforme (A) 0:100 (B) 15:85 (C) 40:60	1/6	(A) 70% COC et NORCOC, 40% BZE et 2% NORBENZ (B) 70% COC, BZE et NORCOC, 40% NORBENZ (C) n.m.	[62]
	COC, BZE, NORCOC, NORBENZ	9	chloroforme : éthanol 87,5:12,5	1/6	COC, BZE et NORCOC (70 à 80 %) NORBENZ (34 à 40 %)	[92]
Urine (LLE assistée Extrelut NT3)	COC, BZE, EME, COCAE, NORCOC	9	Acetate d'éthyle	1/5	88% COC 71% BZE 81% EME 86% COCAE 83% NORCOC	[14]
Urine	COC	8	éther de pétrole	1,5/1	48,8%	[93]

Tableau I- 3 : LLE de la cocaïne (COC) et de ses métabolites dans des échantillons biologiques (n.m. = non mentionné).

Le solvant le plus utilisé semble être le chloroforme, mais il nécessite l'ajout d'un peu d'alcool (éthanol ou isopropanol) pour l'obtention de rendements optimaux, en particulier dans le cas des métabolites les plus polaires [62]. De plus, la BZE, par son caractère amphotère, n'est pas soluble dans le chloroforme, donc l'ajout d'un alcool permet d'augmenter sa solubilité pour pouvoir l'extraire [90]. Le pH de l'échantillon doit en plus être dans tous les cas ajusté entre 8 et 9 pour que les groupements amine de la cocaïne et de ses métabolites se retrouvent plutôt déprotonés, ce qui facilite leur extraction.

1.2.3.3 Extraction sur phase solide

I.2.3.3.1 Principe de l'extraction sur phase solide

L'extraction sur phase solide (SPE) est une méthode de préparation de l'échantillon fondée sur un principe similaire à celui de la HPLC. La SPE est en effet basée sur le partage de composés entre une phase liquide, l'échantillon (eau, urine, plasma...), et une phase solide, un adsorbant. Tout comme la LLE, la SPE permet l'extraction d'analytes cibles de matrices plus ou moins complexes, mais par rapport à la LLE, la SPE utilise moins de solvant, elle est plus rapide à mettre en œuvre, elle est plus diversifiée par la variété des adsorbants et des formats disponibles. Elle est, de plus, facilement automatisable, et permet d'obtenir souvent de meilleurs taux de récupération [94]. Le principe de la SPE est illustré dans la Figure I- 7.

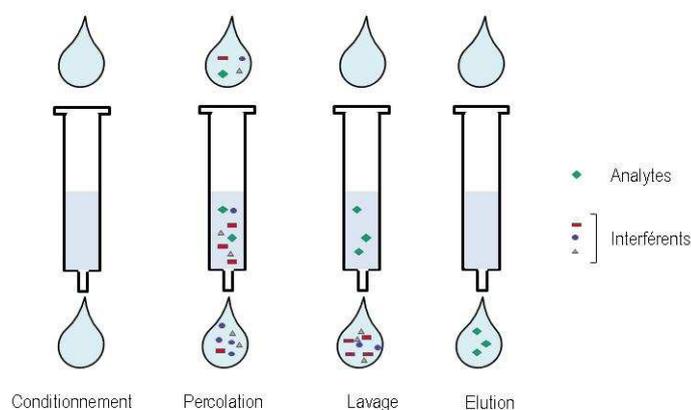


Figure I- 7 : Principe de l'extraction sur phase solide (SPE).

Le processus d'extraction comporte quatre étapes, la première étant le conditionnement de l'adsorbant. Dans cette première étape, l'adsorbant est mouillé par un solvant et les sites de rétention sont ainsi activés. En général, pour la fin du conditionnement, le solvant utilisé doit avoir des caractéristiques de polarité et de pH semblables à celles de l'échantillon à percoler [95]. La deuxième étape consiste à la percolation de l'échantillon liquide sur le support contenant l'adsorbant. Lors de cette étape, l'adsorbant utilisé doit retenir les analytes cibles et éliminer les interférents non retenus. Le volume d'échantillon à percoler est variable et dépend des facteurs d'enrichissement recherchés, du type d'échantillon utilisé et donc de sa disponibilité, et des analytes cibles. Dans le cas de l'analyse de matrices biologiques, les volumes sont assez restreints et ils sont donc de l'ordre de quelques millilitres, contrairement aux matrices environnementales, comme l'eau usée où les volumes peuvent atteindre le litre. Suite à la percolation, du fait de la complexité des matrices biologiques, quelques interférents peuvent être retenus sur l'adsorbant. Donc la troisième étape, le lavage, a pour objectif d'éliminer ces interférents faiblement retenus. Les solvants utilisés pour cette étape doivent avoir un faible pouvoir éluant pour éluer les interférents sans éluer les analytes cibles. Dans la dernière étape, l'élution, les composés cibles sont désorbés par un faible volume de solvant de force éluante suffisante pour rompre totalement les interactions entre les molécules cible et l'adsorbant.

Chacune des différentes étapes de la SPE doit être optimisée de façon à obtenir des taux de récupération optimaux avec une bonne sélectivité pour les analytes cibles. Le choix de l'adsorbant est primordial pour le succès de l'extraction. Le premier paramètre à tenir en compte est la nature de la matrice étudiée. En effet, pour les matrices biologiques de nature aqueuse, telles que le sang, l'urine et la salive, il est préférable d'utiliser des adsorbants apolaires pour lesquels l'eau est le solvant le moins éluant [95]. Le deuxième critère pour le choix de l'adsorbant est la nature du soluté. La rétention du soluté doit être forte pour obtenir des rendements proches de 100 %. Pour évaluer la rétention, l'approche la plus simple est celle d'assimiler le processus d'extraction à un processus de séparation en LC. Il est donc nécessaire de choisir un adsorbant pour lequel le facteur de rétention k de l'analyte soit élevé. Pour la suite du développement de la SPE, il est nécessaire de définir les volumes utilisés pour chaque étape ainsi que la quantité de phase stationnaire. Lors de la percolation, le volume minimal d'échantillon à percoler est donné par la concentration de l'analyte ainsi que par le niveau de concentration à atteindre pour entrer dans les limites de détection du système analytique. Cependant, à partir d'un certain volume percolé, les analytes risquent d'être élués par le solvant de percolation entraînant une chute du rendement d'extraction. Ce volume est appelé volume de fin de fixation (V_f) et il est lié aux propriétés physico-chimiques de l'analyte ainsi qu'à la nature de l'adsorbant [94]. Les volumes de percolation et de lavage doivent donc être définis en tenant compte du V_f pour éviter de l'atteindre et donc d'avoir des pertes de rendement. Un autre paramètre à tenir en compte est la capacité du support qui est en effet définie comme la quantité d'analyte qui peut être retenue sur le support d'extraction. Si lors d'une extraction la capacité est dépassée, une partie de l'analyte ne sera pas retenue. Pour éviter d'avoir ce problème, la quantité d'adsorbant peut être augmentée. Il est aussi possible de choisir une phase de même nature mais avec une surface spécifique plus importante. Dans le cadre de l'analyse de traces dans des milieux complexes, il est tout de même rare d'atteindre la capacité des supports utilisés compte tenu des faibles concentrations fixées.

1.2.3.3.2 Les modes opératoires pour la SPE

La SPE peut être réalisée de deux façons : soit totalement dissociée de l'analyse chromatographique, donc en différé, soit couplée à la méthode chromatographique, donc en ligne.

Dans un protocole de SPE en différé, la fraction d'éluion est collectée et éventuellement évaporée ou diluée de façon à être compatible avec la méthode d'analyse qui s'en suit. La phase stationnaire peut être contenue dans une cartouche, ou incorporée dans la matrice d'une membrane de filtration (disques), ou dans une plaque 96-puits, ou encore dans des embouts de pipettes [95]. Les différents formats sont présentés sur la Figure I- 8.

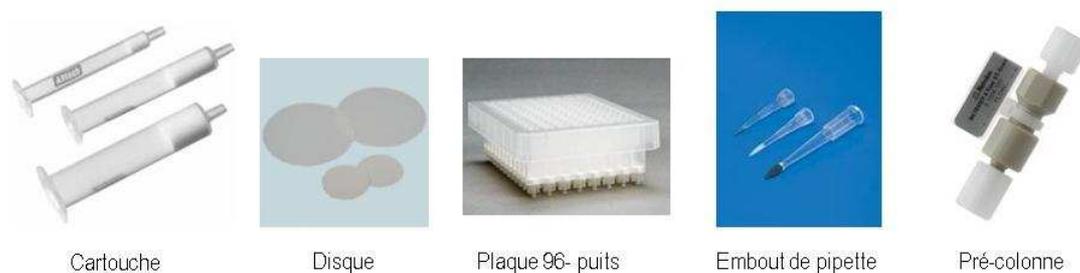


Figure I- 8 : Formats disponibles pour la SPE.

Dans le format le plus couramment utilisé la phase stationnaire est contenue dans une cartouche en polypropylène ou en verre entre deux frittés. En général, les particules de phase stationnaire ont une taille comprise entre 40 μm et 60 μm et les cartouches disponibles dans le marché ont une taille allant de 1 mL à plusieurs centaines de millilitres avec des quantités de phase allant de 30 mg à 500 mg [94, 95]. Pour l'analyse de matrices biologiques les volumes utilisés sont assez faibles, en général les cartouches les plus utilisées sont celles de 1 mL à 5 mL. Les liquides peuvent être percolés dans la cartouche par gravité, mais pour la régulation du débit il est possible d'utiliser une pression positive en poussant le liquide du haut des cartouches ou une pression négative en utilisant une pompe à vide.

Les disques sont des membranes en fibre de verre ou en polytétrafluoroéthylène (PTFE) qui contiennent des particules d'adsorbant imprégnées. Le diamètre des disques est plus grand que celui des cartouches, permettant ainsi d'utiliser des débits plus élevés. Ce format est particulièrement adapté pour l'analyse de grands volumes d'échantillon, il n'est donc pas vraiment intéressant pour l'étude dans des matrices biologiques.

La SPE a été introduite dans un format en plaque 96-puits dans les années 1990 et elle a contribué à l'obtention d'un très haut débit d'analyse souvent nécessaire dans le domaine de l'analyse de traces dans des matrices biologiques. Dans le format en plaque 96-puits, chacun des 96 réservoirs contient une faible quantité d'adsorbant (5 mg à 60 mg) et les volumes sont de 1 mL à 2 mL. La SPE dans ce format peut être réalisée d'une façon partiellement ou totalement automatisée grâce à l'utilisation de robots assurant les différentes étapes de l'extraction puis le transfert dans le système chromatographique. D'ailleurs, il existe aussi ce type de systèmes pour la prise en charge de cartouches. Le format utilisé dans des embouts de pipettes est une alternative aux plaques 96 puits. En effet, la phase stationnaire est intégrée dans des embouts de pipette et l'extraction est par la suite mise en œuvre par l'aspiration à travers le cône de la pipette. Ce type de système peut être pris en charge par des robots, et donc son utilisation est automatisable. De plus les volumes morts et les quantités de phase stationnaire y sont réduits permettant d'obtenir des faibles volumes d'élution.

La SPE en différé présente l'avantage d'avoir une grande flexibilité de formats, de quantités de phase stationnaire, de volumes à percoler et de types d'adsorbants pouvant être utilisés. De

plus, il n'existe pas de problèmes de compatibilité avec l'étape de séparation car les fractions obtenues peuvent être évaporées et reprises par la suite avec un solvant adapté à la méthode d'analyse. Cependant, la méthode en différé présente l'inconvénient d'être sujette à des risques de contamination pendant les différentes étapes, à des pertes pendant l'évaporation, et de conduire à une trop faible sensibilité due à l'injection d'une fraction de l'extrait. Ces inconvénients peuvent être évités par l'utilisation d'une méthode en ligne.

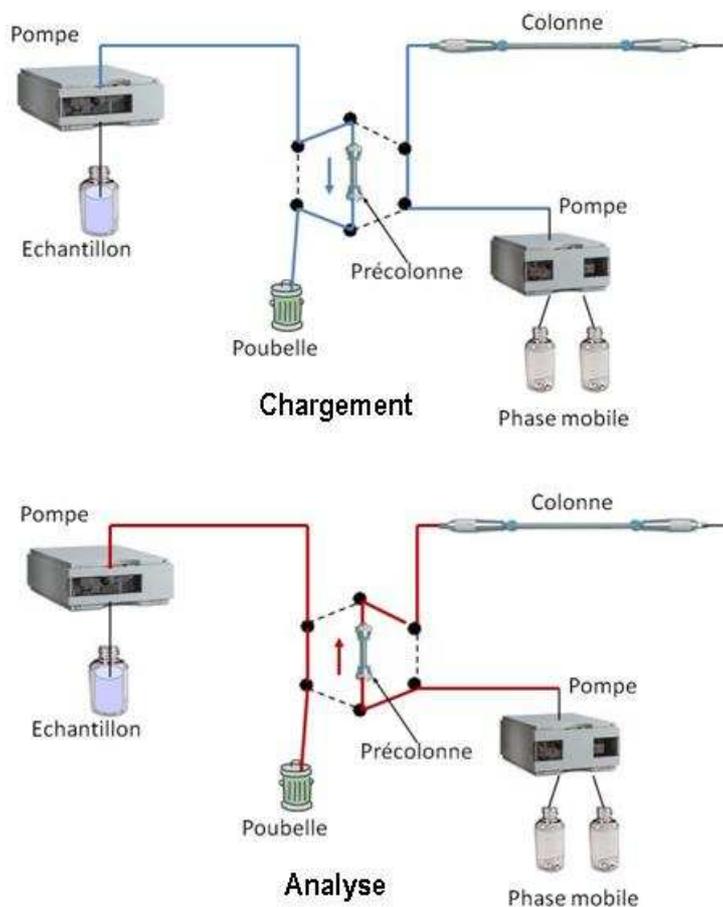


Figure I-9 : Représentation schématique du couplage an ligne. Les connexions des liquides sont représentées en bleu pour la position de chargement et en rouge pour la position d'analyse (adapté de [96]).

Le couplage en ligne de la SPE avec l'HPLC est apparu dans les années 1980. La SPE en ligne est basée sur la commutation de colonnes d'enrichissement et d'analyse par l'intermédiaire d'une vanne à 6 ou 10 voies (Figure I-9). L'adsorbant est contenu dans une pré-colonne insérée entre deux voies de la vanne de commutation. Les pré-colonnes doivent être résistantes à la pression pour supporter le couplage à une pompe HPLC et elles doivent avoir des petites dimensions pour limiter l'élargissement des pics. Le protocole d'extraction en ligne est semblable à celui réalisé en différé. Une première pompe permet de réaliser les étapes de conditionnement, percolation et lavage lorsque la vanne est en position de chargement. Les volumes sont contrôlés grâce au débit et au temps utilisés pour chaque étape.

En basculant la vanne en position d'analyse, la phase mobile est poussée par une deuxième pompe vers la pré-colonne d'enrichissement, entraînant ainsi les analytes vers la colonne analytique pour leur séparation. En général, le montage se fait en mode de rétrobalayage (back flush), donc en faisant l'élution dans le sens inverse de la percolation. Ceci permet de réduire l'élargissement des pics en plus d'assurer leur transfert rapide.

L'extraction en ligne conduit à une méthode plus sensible pour un même volume percolé que la méthode en différé car la totalité des composés extraits par le support sont analysés. Enfin, la SPE en ligne peut être totalement automatisée rendant l'analyse plus répétable. Néanmoins, le couplage en ligne de la SPE présente deux limitations. D'une part, pour éviter de réduire l'efficacité de la méthode de séparation, la quantité de phase stationnaire de la pré-colonne est assez limitée. Donc, si la rétention des analytes n'est pas suffisante, il peut être nécessaire de changer d'adsorbant. D'autre part, le couplage avec la colonne analytique nécessite d'une bonne compatibilité entre les deux phases stationnaires. En effet, la phase mobile doit assurer en même temps une désorption efficace des analytes cibles de la pré-colonne et une séparation efficace dans la colonne chromatographique. Ce type de montage est adapté à l'analyse de traces dans des matrices biologiques, mais ces échantillons apportent des contraintes supplémentaires pour la SPE en ligne car les protéines qu'ils contiennent peuvent obturer les pré-colonnes et générer de fortes pertes de charge. Il est donc nécessaire de s'affranchir de ces protéines soit par une étape supplémentaire de précipitation, soit en utilisant des adsorbants conçus pour l'élimination des protéines.

1.2.3.3.3 Les phases stationnaires utilisées pour l'analyse de matrices biologiques

La majorité des supports s'appliquent à tous types d'échantillons [94, 97], mais si de grandes quantités de phase sont utilisées pour l'analyse environnementale compte tenu des importants volumes percolés, les volumes réduits des fluides biologiques conduisent à des formats réduits [88]. Néanmoins, la présence d'interférents majeurs comme les protéines a conduit à de nouveaux développements ces dernières années pour éliminer celles-ci [98]. Quelques adsorbants utilisés pour l'analyse de la cocaïne et ses métabolites dans les fluides biologiques sont présentés par la suite. En ce qui concerne les matrices environnementales, notamment l'analyse des eaux, les teneurs de cocaïne et de ses analytes sont assez faibles ce qui nécessite de disposer de supports adaptés à la percolation de volumes importants d'échantillon [37].

Le Tableau I- 4 présente quelques applications de la SPE à l'analyse de la cocaïne et ses métabolites dans diverses matrices biologiques, ainsi que dans des eaux. Les quantités d'échantillon utilisées dépendent fortement de la nature de la matrice étudiée ainsi que de la sensibilité des détecteurs et du mode opératoire de la SPE utilisés.

Chapitre I : Les outils conventionnels et miniaturisés pour l'analyse de traces dans des milieux biologiques

Matrice	Composés	Nature, nom commercial et format de l'adsorbant	Analyse	Quantité initiale	Rendement	Source
Bile	COC, BZE et EME	Silice mixte hydrophobe (C8) et échangeur de cations. Bond Elut Certify (n.m.)	GC-FID	1 mL	74% COC, 91% BZE, 84% EME	[99]
Extraits de cheveux aqueux ou en méthanol repris en tampon aqueux	COC, BZE, COCAE et autres drogues	Silice greffée C18. Chromabond C18 (3mL, 200mg)	GC-MS	50 mg	n.m.	[46]
	COC, BZE, EME et autres drogues	Silice mixte hydrophobe (C8) et échangeur de cations. Bond Elut Certify (n.m.)	LC-MS	20-50 mg	98% COC, 99% BZE, 79% EME	[30]
Eau de surface et eaux usées	COC, BZE et autres drogues	Copolymère apolaire PS-DVB-Pyrrolidone. Oasis HLB (6mL, 200mg)	LC-MS	100 mL	eau pure: 100% BZE, 90% COC. Eau de surface: 95% BZE, 90% COC; eau usée: 92% BZE, 86% COC	[37]
	COC, BZE, COCAE et autres drogues	Mixte copolymère apolaire PS-DVB-Pyrrolidone et échangeur de cations. Strata XC (6mL, 200mg)	LC-MS	500 mL	53% BZE; 56% COC; 65% COCAE	[12]
	COC, BZE, COCAE, NORCOC, NORBENZ et autres drogues	Mixte copolymère apolaire PS-DVB-Pyrrolidone et échangeur de cations. Oasis MCX (6mL, 150mg)	LC-MS	50 mL	eau de surface: 90%COC, 70% COCAE, 103% BZE, 92% NORBENZ, 73% NORCOC Effluent: 109%COC, 78%COCAE, 120%BZE, 80%NORBENZ, 76%NORCOC Influent: 87%COC, 85%COCAE, 50%NORBENZ, 73%NORCOC	[100]
Digestat aqueux de cordon ombilical	COC, BZE et autres drogues	Mixte copolymère apolaire PS-DVB-Pyrrolidone et échangeur de cations. Strata XC (3mL, 60mg)	LC-MS	2 mL	109% COC, 86% BZE	[36]
Humeur vitrée	COC, BZE et EME	Silice mixte hydrophobe (C8) et échangeur de cations. Bond Elut Certify (n.m.)	GC-FID	200 µL	72% COC, 92% BZE, 88% EME	[99]
Extrait en acétonitrile de muscle repris en tampon aqueux	COC, BZE, EME, AEME, ECG, NORBENZ, mHBZE, COCAE, NORCOC, NORCOCAE	Silice mixte hydrophobe (C8) et échangeur de cations. Bond Elut Certify (10mL, 130mg)	GC-MS	3 g	54% COC, 93% BZE, 42% EME, 65% AEME, 15% ECG, 13% NORBENZ, 24% mHBZE, 65% COCAE, 40% NORCOC, 28% NORCOCAE	[21]
Extrait en méthanol d'ongles repris en tampon aqueux	COC, BZE et NORCOC	Silice mixte hydrophobe (C8) et échangeur de cations. Bond Elut Certify (n.m.)	GC-MS	5 mg	68% COC, 79% BZE, 80% NORCOC	[35]
Plasma	COC, BZE et autres drogues	Silice greffée C18. Chromabond C18 (3mL, 200mg)	LC-MS	1 mL	n.m.	[101]

Chapitre I : Les outils conventionnels et miniaturisés pour l'analyse de traces dans des milieux biologiques

	COC, BZE, COCAE et autres drogues	Silice mixte hydrophobe (C8) et échangeur de cations. Bond Elut Certify (n.m.)	LC-UV	1 mL	69% COC, 60% BZE, 89% COCAE	[52]
	BZE et autres drogues	Copolymère apolaire PS-DVB-Pyrrolidone. Oasis HLB (1x50mm, LPS 30µm)	LC-MS	60 µL	47% BZE	[102]
Plasma/ sérum/sang	COC, BZE, COCAE, methylECG, et autres drogues	Copolymère apolaire PS-DVB-Pyrrolidone. Oasis HLB (20x2,1mm, 25µm)	LC-MS	100 µL	n.m.	[50]
Sang	COC, COCAE, NORCOC, NORCOCAE, BZE, NORBENZ, mHBZE, pHBZE, EME, entre autres	Silice mixte hydrophobe (C8) et échangeur de cations. Clean Screen DAU (10mL, 200mg)	GC-MS	n.m.	n.m.	[19]
	COC, BZE et autres drogues	Silice mixte hydrophobe (C8) et échangeur de cations. Isolute Confirm HCX (3mL, 130mg)	LC-MS	500 µL	83% COC, 91% BZE	[87]
Salive	COC, EME, AEME et COCAE	Silice mixte hydrophobe (C8) et échangeur de cations. Isolute Confirm HCX (3mL, 130mg)	GC-MS	500 µL	n.m.	[42]
	COC, BZE, EME, COCAE et autres drogues	Silice mixte hydrophobe (C8) et échangeur de cations. Bond Elut Certify (n.m.)	LC-MS	1 mL	89% COC, 63% BZE, 30% EME, 95% COCAE	[103]
Sueur extraite d'un patch avec un tampon aqueux	COC, BZE, EME, AEME et autres drogues	Silice mixte hydrophobe (C8) et échangeur de cations. Clean Screen DAU (10mL, 200mg)	GC-MS	5 mL	à 15ng/patch: 103% COC, 91% BZE, 95% EME, 99% COCAE	[34]
Urine	COC et BZE	Silice greffée C18. Alltech ODS C18 (20x4,6mm, 35-750µm)	LC-UV	50 µL	96% COC, 95% BZE	[104]
	COC, BZE, COCAE, methylECG, et autres drogues	Copolymère apolaire PS-DVB-Pyrrolidone. Oasis HLB (pré-colonne 20x2,1mm, 25µm)	LC-MS	1 µL	n.m.	[50]
	COC, BZE et COCAE	Silice mixte hydrophobe (C8) et échangeur de cations. Li-Chrolut TSC (200mg)	LC-UV	2 mL	n.m.	[18]
	COC, BZE et autres drogues	Silice mixte hydrophobe (C8) et échangeur de cations. Bond Elut Certify (n.m.)	GC-MS	1 mL	n.m.	[43]

Tableau I- 4 : Conditions d'extraction utilisées pour le traitements de divers échantillons biologiques basés sur l'extraction sur phase solide (methylECG : méthylecgonine, n.m. : non mentionné, MS : spectrométrie de masse, FID : détecteur à ionisation de flamme, PS-DVB : polystyrène-divinylbenzène).

- Silices greffées par des greffons de chaînes n-alkyle (C8, C18)

Ces supports permettent d'extraire les composés ciblés par interactions de type hydrophobe, donc ils retiennent des molécules faiblement polaires. L'ajout d'un tampon dans l'échantillon est souhaitable lors de l'extraction de composés ionisables comme la cocaïne et ses métabolites. Ce type de support a déjà été utilisés pour l'extraction de la cocaïne et ses métabolites dans l'urine [19, 101, 104], le plasma [19, 101], et les cheveux [46], donc pour le traitement de petits volumes ne nécessitant pas alors un fort pouvoir de rétention même pour les métabolites.

- Copolymères apolaires

Souvent composés de styrène et divinylbenzène (DVB), ces polymères, par leur nature apolaire, mettent en jeu des interactions hydrophobes plus importantes que les silices greffées C18, mais aussi des interactions π - π . Ils ont l'avantage d'être plus stables par rapport au pH que les silices greffées n-alkyle et ils ont des surfaces spécifiques plus importantes donc encore un meilleur pouvoir de rétention pour des molécules polaires. Il existe parmi ce type de supports, des polymères fonctionnalisés comme l'Oasis HLB (fonction N-vinylpyrrolidone) qui sont moins hydrophobes et qui permettent une meilleure mouillabilité pour un meilleur contact avec des échantillons aqueux. D'ailleurs, ce type d'adsorbant a souvent été utilisé pour l'analyse de la cocaïne et de ses métabolites dans des milieux biologiques comme le plasma/sérum/sang [50], l'urine [50], mais aussi dans les eaux usées [37, 54], sa plus grande hydrophobie permettant la percolation de volumes d'échantillon plus élevés.

- Adsorbants à mode de rétention mixte

Il s'agit de supports qui permettent de développer deux types d'interactions : des interactions de nature hydrophobe via une matrice polymérique ou un greffon hydrophobe de type C18 et des interactions électrostatiques via la fonctionnalisation du support par des motifs acides (COO^- , ...) ou basiques (NH_3^+ , ...). Ce type de support est particulièrement adapté pour l'analyse de traces de molécules ionisables dans des milieux biologiques car il permet de concentrer les composés recherchés et d'éliminer une importante quantité d'interférents en jouant sur ces différents types d'interactions. Les supports mixtes ont largement été utilisés pour l'analyse de la cocaïne et ses métabolites avec une chimie mixte combinant des interactions hydrophobes et un échangeur de cations. De nombreuses applications existent pour le sang [19, 21, 52, 64, 87], l'urine [18, 19, 21, 43, 64, 105], les cheveux [30, 31, 51, 106], la salive [42, 64, 103, 107, 108], la sueur [34], la bile [99], l'humeur vitrée [99], le muscle [21], les ongles [35] et dans les eaux usées [12, 38, 100, 109].

- Phases stationnaires à accès restreint (RAM)

Il s'agit d'adsorbants qui associent un mécanisme d'exclusion stérique de molécules de grande taille, notamment des protéines, avec un mécanisme de partage pour la rétention de petites molécules. En effet, ces particules présentent une barrière pour les macromolécules qui peut être physique (par la taille des pores) ou chimique (par un réseau de polymère hydrophile ou de protéines en surface de la particule). La surface interne de la particule est quant à elle greffée avec des groupements qui peuvent générer des interactions hydrophobes ou électrostatiques [98]. Ce type d'adsorbant est particulièrement adapté à l'analyse de traces de petites molécules dans des échantillons biologiques puisqu'il permet l'élimination des protéines, mais à ce jour, aucune étude ne semble avoir porté sur l'utilisation de ces supports pour la cocaïne et ses métabolites. De plus, ces supports sont chers et sont disponibles uniquement sous forme de pré-colonnes pour un couplage de la SPE en ligne.

- Supports à particules de grande dimension (LPS)

Ce type d'adsorbants, comme leur nom l'indique, est formé des particules de grand diamètre (30 μm à 50 μm) qui permettent l'application de débits de phase mobile élevés sans pour autant générer de fortes pertes de charge [98]. Or, lors de l'utilisation d'un débit élevé, le flux tend vers un régime turbulent (forces d'Eddy), et ces conditions ne permettent pas la rétention des macromolécules alors que les petites molécules sont retenues par des interactions hydrophobes et/ou électrostatiques selon la nature de la phase. Des LPS ont été utilisés pour l'analyse de la BZE dans le plasma [102, 110]. Ces applications reposent sur l'utilisation d'un support Oasis et pour l'application de débits élevés et contrôlés, l'extraction a été réalisée en ligne.

- Les monolithes

Il s'agit de phases continues poreuses qui sont généralement synthétisées in situ dans une colonne, ou dans des capillaires [111]. Les monolithes sont caractérisés par un réseau poreux constitué de macropores (>50 nm) et de mésopores (2-50 nm). Les macropores donnent une grande perméabilité à ce type d'adsorbants, et donc les monolithes sont adaptés à l'utilisation de hauts débits comme les supports LPS permettant aussi d'éliminer les macromolécules. Une grande surface interne est obtenue par la présence de mésopores, ce qui permet aux monolithes d'avoir des capacités de rétention suffisantes. L'application de ce type de support en SPE remonte à la fin des années 1990, mais leur utilisation est encore assez limitée par le manque de diversité de supports commerciaux. Aucune application ne semble à ce jour porter sur l'utilisation de ces phases stationnaires pour l'analyse de la cocaïne et ses métabolites.

Malgré les progrès considérables dans le développement de phases stationnaires pour la SPE, les supports présentés jusqu'ici conduisent à une extraction des analytes basée sur des

interactions non-spécifiques et donc à la co-extraction d'interférents de polarités proches des molécules cibles, ce qui peut nuire à la détection. Dans certains cas, une extraction plus spécifique est souhaitable et il existe plusieurs types d'adsorbants permettant d'extraire les composés par un mécanisme de reconnaissance moléculaire de l'analyte pour donner lieu à une SPE très sélective.

1.2.3.4 Outils biologiques pour l'extraction sélective

Pour obtenir une meilleure sélectivité lors du traitement de l'échantillon, l'utilisation d'outils biologiques mettant en œuvre un mécanisme de rétention basé sur la reconnaissance moléculaire est envisageable. Il s'agit des anticorps, mais aussi des simples brins d'acide désoxyribonucléique (ADN) et d'acide ribonucléique (ARN) appelés aptamères qui permettent par greffage de produire des immuno- et des oligoadsorbants respectivement.

1.2.3.4.1 Les immuno-adsorbants (IS)

Les immuno-adsorbants (IS) sont des supports solides sur lesquels sont greffés des anticorps. La rétention de l'analyte cible est alors basée sur des interactions spécifiques anticorps-antigène. Les anticorps, ou immunoglobulines, sont des protéines dont certaines séquences sont variables et qui forment un complexe antigène-anticorps grâce à des interactions de type hydrophobes, électrostatiques, et liaisons hydrogène. Cette complémentarité fonctionnelle s'accompagne d'une complémentarité stérique donnant lieu à des sites de reconnaissance moléculaire très spécifiques de l'antigène au sein de l'anticorps [112]. La formation du complexe antigène-anticorps est réversible et peut être modulée par des variations du pH ainsi que par ajout de solvant organique dans la solution [113]. L'utilisation des IS se fait de la même manière que pour les autres adsorbants utilisés en SPE, donc avec les mêmes étapes de conditionnement, percolation, lavage et élution, mais avec des solutions principalement aqueuses pour éviter de dénaturer les anticorps excepté pour l'étape d'élution.

Les IS sont conçus pour une extraction sélective, toutefois un anticorps peut avoir des interactions importantes avec d'autres composés de structure proche de celle de l'analyte cible, c'est ce que l'on appelle la réactivité croisée. Cette réactivité croisée est intéressante pour l'analyse d'un groupe de molécules de structures proches, et peut être exploitée pour l'analyse de traces de drogues et de leurs métabolites dans des matrices biologiques. Dans le cas de l'analyse de la cocaïne et ses métabolites, il existe des anticorps dédiés à la cocaïne et à la BZE, mais ils sont plutôt consacrés à la conception d'immunoessais qui est une technique courante pour le dépistage de la cocaïne dans des matrices biologiques [27, 33, 114]. Malgré l'importante sélectivité des IS, leur développement est assez long et coûteux. Ces

inconvénients ont mené à la recherche d'autres alternatives comme le développement de supports à base d'aptamères.

1.2.3.4.2 Les oligoadsorbants (OS)

Un nouveau type d'adsorbants sélectifs basé sur l'utilisation de séquences d'oligonucléotides (20 à 60 nucléotides) sélectives envers une molécule cible a été développé récemment [115]. Ce type d'adsorbant est appelé oligoadsorbant (OS). Les brins simples d'ADN ou ARN spécifiques d'une molécule cible sont nommés des aptamères. Ils sont obtenus par un procédé de sélection itératif appelé SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) [116, 117]. Il s'agit d'une méthode qui permet de sélectionner, parmi un grand nombre de séquence ($>10^{15}$), celles qui présentent une forte affinité pour la molécule cible. Cette affinité est basée sur des interactions entre la molécule cible et les nucléotides qui sont accrues par le repliement de la séquence. Les aptamères ont la propriété de se lier à leur molécule cible avec une affinité pour certains, qui est comparable à celle des anticorps. De plus ils ont l'avantage de résulter d'un mode de production plus simple que les anticorps, qui permet de faire une sélection dans des milieux non physiologiques à la différence des anticorps qui sont générés par le système immunitaire. Leur synthèse est donc plus reproductible, et aussi plus flexible car la synthèse chimique des aptamères permet l'introduction de modifications dans les séquences pour améliorer leurs performances. Les aptamères sont plus petits que les anticorps, pouvant à priori donner lieu à de meilleures densités de greffage pour les OS que les IS. Les aptamères ont trouvé plusieurs applications, notamment dans le domaine de l'analyse pour la préparation de biocapteurs, pour des bioessais, pour des diagnostics cliniques, pour la chromatographie d'affinité et plus récemment pour la SPE sélective. En effet, même si les développements sont encore peu nombreux pour l'extraction, les OS semblent présenter un fort potentiel pour l'analyse de traces dans des milieux biologiques.

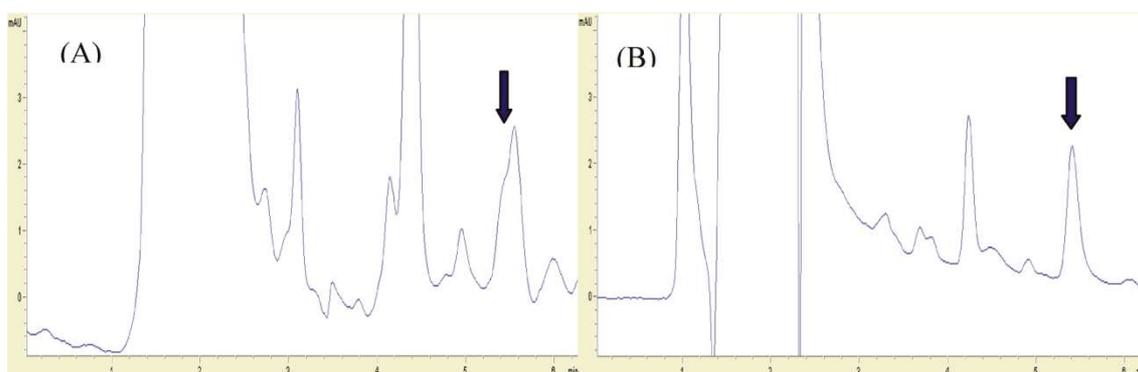


Figure I- 10 : Chromatogrammes HPLC-UV résultants de l'extraction de la cocaïne d'un échantillon de plasma dopé après son extraction par un support conventionnel C18 (A) et par un oligoadsorbant ciblé pour la cocaïne (B) (adapté de [118]).

En effet, un OS a été développé au sein de notre laboratoire (LSABM) avec un aptamère ciblé pour la cocaïne par greffage d'un aptamère en série ADN sur de la sépharose activée CNBr [118]. Ce support a été utilisé pour l'extraction de la cocaïne d'un plasma dopé et le rendement d'extraction obtenu était proche de 90 %. Sur la Figure I- 10 on observe que le chromatogramme HPLC-UV obtenu suite à l'extraction avec l'OS est beaucoup plus propre que lors de l'utilisation d'un support C18 conventionnel.

Dans la suite de cette étude [115], l'adsorbant a été testé pour l'extraction de la BZE. Même si la BZE a une structure très proche de la cocaïne, l'OS ne présente aucune reconnaissance pour ce métabolite montrant ainsi son importante sélectivité vis-à-vis de la molécule cible et donc un comportement différent de celui des anticorps. Malgré cette importante sélectivité, l'aptamère anti-cocaïne a une constante de dissociation de l'ordre du micromolaire [119] et donc son affinité est plus faible que celle des anticorps. La conséquence de cette baisse d'affinité est la limitation du facteur d'enrichissement quand l'aptamère est appliqué à la SPE puisque les volumes de fin de fixation sont alors atteints plus rapidement. Finalement, l'utilisation d'aptamères comme outils biologiques de reconnaissance moléculaire est encore assez restreinte car à ce jour il y a encore peu de brins décrits notamment pour des molécules de petite taille. Les applications pour l'extraction sélective sont donc à ce jour encore fortement limitées sans l'aide de la biologie moléculaire.

1.2.3.5 Outils biomimétiques pour la SPE : les polymères à empreintes moléculaires (MIP)

1 – Principe

L'impression moléculaire consiste à la formation au sein d'un polymère synthétique, de sites complémentaires à une molécule cible en termes de structure et fonctionnalité. Le principe de synthèse des MIP est illustré dans la Figure I- 11.

Plusieurs approches sont possibles pour la synthèse de MIP, mais la plus courante est l'approche non-covalente. En effet, dans cette approche, le monomère utilisé établit des interactions de nature non-covalente avec la molécule empreinte. Initialement, la molécule empreinte et le monomère fonctionnel forment un complexe dans un porogène approprié ; ce complexe est stabilisé par des interactions non-covalentes de type liaison hydrogène, interactions π - π ou liaisons électrostatiques, qui sont conservées pendant la copolymérisation avec un agent réticulant [120]. Des interactions de type métal-ligand peuvent aussi être exploitées pour l'approche non-covalente. La polymérisation se fait généralement par voie radicalaire et son initiation peut être thermique ou photochimique [121]. Après la synthèse du MIP, la molécule cible est éliminée par des lavages, puis, lors de l'utilisation du MIP pour

l'extraction sélective, les mêmes interactions que celles générées lors de la formation du complexe molécule empreinte-monomère fonctionnel, sont alors exploitées.

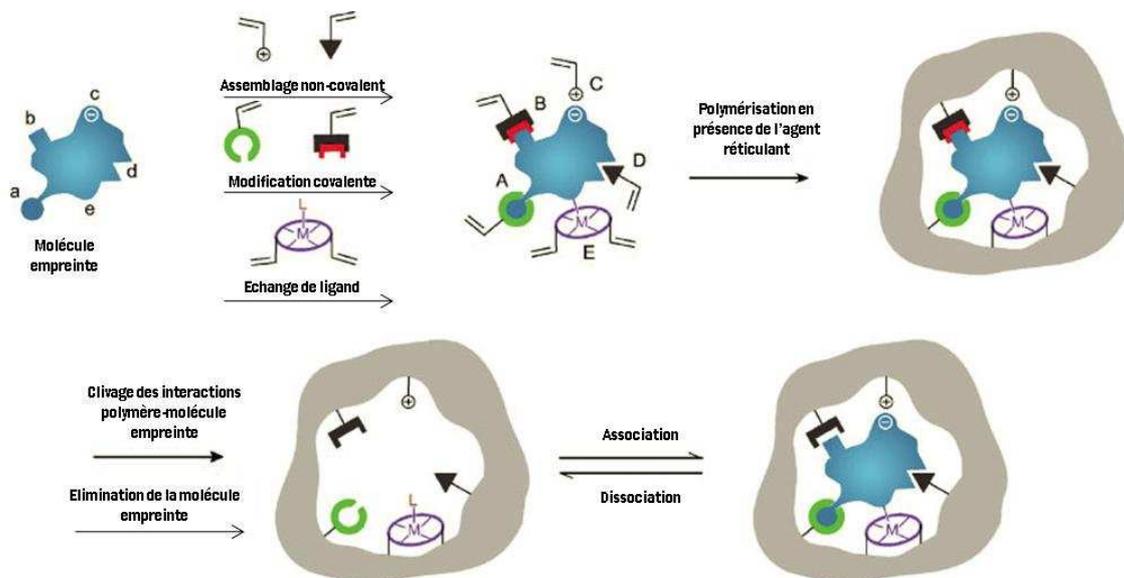


Figure I- 11 : Principe de synthèse d'un polymère à empreintes moléculaires par différentes approches : approche covalente (A), approche semi-covalente (B), approche non-covalente avec formation d'interactions électrostatiques (C), formation d'interactions hydrophobes (D), et formation de complexes métal-ligand (adapté de [122]).

D'autres approches basées sur des interactions covalentes, ou semi-covalentes du monomère avec la molécule cible peuvent être utilisées pour la synthèse de MIP. Pour l'approche covalente, l'élimination de la molécule empreinte est plus difficile car un clivage chimique est nécessaire pour rompre les liaisons covalentes entre la molécule empreinte et le monomère fonctionnel. En principe, l'approche covalente génère des cavités spécifiques plus homogènes et mieux définies car la molécule empreinte est plus fortement liée aux monomères. Néanmoins, la difficulté pour le clivage de la liaison entre la molécule cible et le monomère fonctionnel, ainsi que la cinétique lente de la reconsolidation de cette liaison, rendent cette approche difficile pour son application en SPE [123]. Dans le cas d'une approche semi-covalente, le monomère fonctionnel et la molécule empreinte forment des liaisons covalentes avant et pendant la polymérisation, puis après l'extraction de la molécule empreinte des cavités, la rétention spécifique se fait par des interactions non covalentes. Cette approche est souvent difficile à mettre en œuvre, ce qui restreint son utilisation. De plus elle nécessite souvent l'utilisation d'espaces qui compliquent d'avantage la synthèse [122]. Finalement, c'est bien l'approche covalente qui est la plus exploitée pour l'application de MIP en SPE par sa simplicité de mise en œuvre, mais aussi par la facilité de l'élimination de la molécule empreinte en vue de son utilisation comme support d'extraction.

2 – Mode de polymérisation par voie radicalaire

La plupart des synthèses de MIP se font par polymérisation radicalaire en chaîne, qui est d'ailleurs le mode de synthèse le plus répandu pour la synthèse de polymères en général [121]. Il est aussi possible de synthétiser des matériaux imprimés à base de réseaux inorganiques comme les silices, le procédé utilisé pour leur synthèse est alors un procédé sol-gel basé sur des réactions d'hydrolyse et de condensation [124]. Néanmoins, dans le contexte de cette étude, l'approche sol-gel n'a pas été étudiée.

La polymérisation radicalaire en chaîne est caractérisée par trois étapes que sont l'initiation, la propagation et la terminaison. Les radicaux libres se forment pendant l'étape d'initiation. Celle-ci peut être déclenchée par une radiation de haute énergie ou par l'addition d'initiateurs ou amorceurs qui sont des molécules capables de former des radicaux libres par rupture homolytique quand ils sont en contact de chaleur, de radiations électromagnétiques, ou par réaction chimique [124]. Les initiateurs les plus couramment utilisés lors de la synthèse des MIP sont les dérivés azoïques et les peroxydes. Ces initiateurs peuvent former des radicaux libres sous radiation UV à leur longueur d'onde d'absorption maximale, ou par chauffage. En général, les initiateurs sont ajoutés en faible quantité dans le mélange réactionnel à environ 1 % m/m par rapport aux monomères. Suite à l'homolyse de l'amorceur, le radical produit réagit avec le monomère pour former un nouveau radical libre qui agit comme un centre actif primaire pour la suite de la réaction en chaîne. La vitesse d'initiation doit être contrôlée car si elle est trop élevée, une grande quantité de centres réactifs est générée, ce qui entraîne une terminaison anticipée et l'obtention de polymères de faible poids moléculaire. Au contraire, si l'initiation est trop lente, la réaction ne peut pas être activée dans un intervalle de temps raisonnable. L'un des initiateurs le plus couramment utilisé en synthèse de MIP est le 2,2'-azobis(isobutyronitrile) (AIBN). Sa réaction d'homolyse peut être déclenchée par radiation UV à $\lambda_{\max} = 345$ nm ou thermiquement, souvent à une température de 60°C.

Après l'initiation, c'est l'étape de propagation qui a lieu. Lors de cette étape, il se forme une chaîne polymérique par la réaction d'addition de monomères à la chaîne porteuse du radical. La croissance de la chaîne polymérique se fait à une vitesse très supérieure à la réaction d'initiation, ce qui entraîne la formation de chaînes polymériques de poids moléculaire élevé [121]. Les MIP sont des copolymères réticulés, il est donc nécessaire de tenir compte des réactivités relatives des différents monomères, fonctionnels et réticulants, au moment de mettre au point une synthèse pour avoir une bonne compatibilité entre eux. À ce titre, le mélange entre l'acide méthacrylique (MAA) et l'éthylène glycol diméthacrylate (EGDMA) est assez couramment utilisé pour la synthèse de MIP.

Finalement, il arrive un moment où les radicaux libres réagissent pour former des liaisons covalentes inactives en arrêtant la propagation, il s'agit de l'étape de terminaison. Cette étape

peut se produire par différentes réactions : soit lors de la réaction entre deux chaînes porteuses de radicaux, soit par la réaction d'une chaîne porteuse avec un initiateur radicalaire, soit par le transfert du radical à une autre molécule telle que le solvant, un monomère, une molécule d'initiateur, soit finalement par le transfert du radical à une impureté comme le dioxygène.

3 – Choix des réactifs

Malgré la facilité de la synthèse de MIP par approche non-covalente, l'obtention d'un complexe stable est conditionnée par le choix des différents réactifs.

- La molécule empreinte

Le choix de la molécule empreinte se fait en fonction de la nature du/des composé/s à extraire. C'est la structure et les fonctionnalités de cette molécule empreinte qui vont définir la nature des interactions qui vont permettre la rétention au sein des cavités spécifiques. Sachant que lors de la synthèse non covalente d'un MIP, des interactions de type liaison d'hydrogène, électrostatiques ou hydrophobes de la molécule empreinte avec les monomères fonctionnels sont recherchées, il est nécessaire que la molécule empreinte sélectionnée présente suffisamment de fonctions chimiques dans sa structure afin de développer de telles interactions. Il peut s'agir de la molécule cible directement ou d'un analogue structural. En effet, l'utilisation d'un analogue structural peut, d'une part, diminuer les coûts de synthèse lorsque la molécule cible est chère ou difficile à synthétiser, et d'autre part, ceci permet d'éviter les risques de relargage qui peuvent être rencontrés avec des MIP obtenus par une approche non-covalente [125]. Effectivement, l'élimination totale de la molécule empreinte après la synthèse du MIP est souvent difficile et requiert un grand nombre d'étapes de lavage avec des solvants organiques ou même avec des solutions acides ou basiques. Finalement, la molécule empreinte choisie doit être soluble dans le solvant porogène, elle ne doit pas inhiber la réaction de polymérisation et doit être stable dans les conditions de polymérisation utilisées.

- Les monomères

Ayant choisi une molécule empreinte, il est nécessaire de sélectionner les monomères fonctionnels qui permettront par la suite sa reconnaissance spécifique au sein du réseau polymérique. Comme dans le cas de la molécule empreinte, le monomère fonctionnel doit être soluble et stable dans le solvant de synthèse. Idéalement, le monomère sélectionné doit développer des interactions non-covalentes fortes avec la molécule empreinte. Il est donc nécessaire de prendre en compte les propriétés physico-chimiques de la molécule empreinte. Par exemple, si la molécule a des propriétés basiques, des interactions électrostatiques peuvent être recherchées en utilisant un monomère fonctionnel acide. Le MAA est souvent utilisé dans ces cas-là. Le choix des monomères fonctionnels peut être aussi basé sur des approches combinatoires, de la modélisation moléculaire, ou l'utilisation de méthodes comme

la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la spectrométrie UV, pour mieux estimer la force des interactions entre le monomère et la molécule empreinte, en plus d'estimer parfois le ratio molaire entre le(s) monomère(s) fonctionnel(s) et la molécule empreinte [126].

- L'agent réticulant

Pour obtenir un polymère réticulé, il faut utiliser, en plus du monomère fonctionnel, un agent réticulant. Il s'agit d'un monomère qui a plus d'un groupe vinylique polymérisable, et qui permet donc la formation de chaînes polymériques non-linéaires. L'agent réticulant confère une rigidité et une stabilité mécanique au polymère. Il a ainsi un rôle capital pour la stabilisation des cavités spécifiques du MIP. L'agent réticulant est en général ajouté en excès par rapport à la molécule empreinte et au monomère fonctionnel car un important degré de réticulation permet de générer une structure macroporeuse au sein du polymère. Cependant, si la quantité d'agent réticulant est trop importante, les cavités spécifiques pourraient se trouver inaccessibles. Un ratio de 1/5 mol/mol entre le monomère fonctionnel et l'agent réticulant est utilisé assez couramment.

- Le solvant porogène

Le solvant porogène a une très grande importance pour la synthèse du MIP parce qu'il affecte la morphologie de celui-ci. En effet il est à l'origine de la formation des pores dans le polymère macroporeux (d'où le nom de porogène). Les propriétés et la quantité de solvant utilisé permettent de moduler la morphologie du polymère ainsi que son volume de pores total. La polymérisation dans un solvant qui est thermodynamiquement adapté, donne lieu à une distribution uniforme de la réticulation et à la formation de pores de petite taille. Dans le cas d'un mauvais solvant, la distribution est plus inhomogène, ce qui donne lieu à une structure poreuse avec des pores de grande taille. L'augmentation du volume de porogène augmente le volume poreux [124]. Le porogène a aussi un rôle fondamental sur la stabilisation du complexe monomère fonctionnel/molécule empreinte [125]. Considérant que les interactions développées pour la formation de ce complexe sont principalement du type liaisons hydrogène, et/ou électrostatiques, il convient de choisir des porogènes aprotiques et plutôt apolaires car ces solvants permettent de stabiliser ces interactions-là. En plus, le solvant utilisé doit pouvoir solubiliser tous les réactifs utilisés pour la synthèse du MIP. Parmi les solvants utilisés couramment pour la synthèse de MIP se trouvent le toluène, le dichlorométhane, le chloroforme et l'acétonitrile [127].

- L'initiateur

Finalement, la polymérisation radicalaire en chaîne nécessite d'un initiateur pour déclencher la réaction. Deux types d'initiateurs sont utilisés : des initiateurs thermiques ou des initiateurs photochimiques. Le choix dépend surtout de la stabilité de la molécule empreinte. Si celle-ci est thermolabile, il convient d'utiliser une initiation photochimique, et si elle est plutôt

photodégradable il est préférable d'utiliser une initiation thermique. Dans le cas où les deux types d'initiation sont possibles, il faut tenir compte du fait que la polymérisation par voie photochimique peut permettre une initiation plus rapide que la voie thermique, mais la propagation est plus lente à cause de la basse température utilisée. Ainsi, les polymères obtenus par initiation photochimique ont tendance à avoir plus de groupements vinyles qui n'ont pas réagi et leur structure peut être moins réticulée et avec une plus faible surface spécifique. Par conséquent, ces polymères-là devraient avoir de plus faibles capacités de rétention et des sites de reconnaissance spécifique moins bien formés [124]. Cependant, la température de polymérisation joue aussi un rôle dans la stabilisation du complexe monomère fonctionnel/molécule empreinte puisque leurs interactions sont plus fortes à basse température. Un compromis est donc nécessaire pour le choix de la température de polymérisation du MIP [128].

4 – Synthèse en bloc et préparation du support

Pour la synthèse des MIP, il existe plusieurs méthodes de polymérisation. La polymérisation en bloc est cependant la plus répandue dans le domaine de la SPE par sa simplicité de mise en œuvre. Initialement, les différents réactifs de synthèse, c'est-à-dire la molécule empreinte, les monomères fonctionnels, les agents réticulants, le solvant et l'initiateur, sont mis en présence dans un tube à sceller [129]. Pour éviter la formation de radicaux libres favorisée par le dioxygène, un dégazage sous azote est effectué avant la polymérisation. Puis le tube est par la suite scellé et la polymérisation est amorcée soit par un rayonnement UV, soit par initiation thermique. Un monolithe est ainsi formé dans le tube à sceller et récupéré en brisant ce tube. Suite à la polymérisation, des particules de granulométrie contrôlée sont obtenues par le broyage et le tamisage du monolithe. Finalement, une étape de sédimentation est utilisée pour éliminer les plus fines particules qui restent après le tamisage. Cette étape est nécessaire pour éviter d'obstruer les frittés utilisés pour retenir l'adsorbant dans des cartouches d'extraction ou des colonnes chromatographiques. Ce mode de polymérisation permet de contrôler assez facilement les conditions de synthèse et il convient à l'application du MIP en SPE. Cependant, ce mode de synthèse est assez long, les particules obtenues ont une forme irrégulière, et une importante fraction du polymère est perdue lors du broyage et du tamisage du monolithe [126]. D'autres modes de synthèse existent pour l'obtention de formats différents pour le MIP, ils seront discutés dans le chapitre IV.

5 – Méthode d'évaluation des MIP

Plusieurs caractéristiques du MIP peuvent être évaluées comme ses propriétés chimiques, morphologiques et de reconnaissance moléculaire [121]. La caractérisation chimique peut se faire par micro-analyse élémentaire, par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), ou par RMN. La caractérisation chimique procure des informations sur la composition du copolymère. Dans le cas de la caractérisation morphologique, des

informations sur le volume des pores, la taille des pores, leur distribution et les surfaces spécifiques des matériaux synthétisés sont obtenues. Cette caractérisation peut se faire par la mesure d'absorption de solvant du polymère sec, par porosimétrie d'absorption à l'azote, par porosimétrie d'intrusion de mercure, par microscopie ou même par chromatographie à exclusion stérique inversée. Finalement, la caractérisation la plus importante pour l'application du MIP à l'extraction sélective est celle de l'affinité des sites de reconnaissance. Pour pouvoir vraiment caractériser les cavités spécifiques du MIP, il est nécessaire de le comparer à un polymère non imprimé (NIP), synthétisé dans les mêmes conditions que le MIP mais sans la molécule empreinte, qui permet, par l'étude en parallèle des deux supports, de différencier les interactions spécifiques des non-spécifiques. En général la caractérisation des sites de reconnaissance se fait dans le solvant de synthèse pour obtenir des interactions fortes entre la molécule empreinte et le MIP. De toute évidence, l'introduction de la molécule empreinte lors de la synthèse modifie la synthèse, et donc le MIP et le NIP ne possèdent finalement pas les mêmes structures. Ces différences peuvent d'ailleurs être mises en évidence par des mesures de surface spécifique. Néanmoins, l'étude d'un NIP en parallèle avec le MIP reste tout de même un bon outil de comparaison. Diverses méthodes sont alors utilisées pour évaluer la sélectivité du MIP :

- Isothermes d'adsorption

Pour ces tests, une quantité connue de NIP ou de MIP est mise en présence d'une quantité connue de la molécule cible dans un solvant souvent proche de celui utilisé pour la synthèse. Une fois l'équilibre atteint, la quantité de molécule adsorbée par le polymère est mesurée et les résultats obtenus par le NIP et le MIP sont comparés. Les données obtenues sont utilisées pour tracer des isothermes d'adsorption. Celles-ci présentent un palier à des concentrations élevées de molécule cible. La comparaison des paliers correspondant au NIP et au MIP indique le nombre de cavités spécifiques. Il est possible aussi de caractériser l'affinité du MIP pour la molécule cible en faisant une analyse de Scatchard [125].

- Évaluation par HPLC

Elle consiste à comparer les facteurs de rétention de la molécule cible sur le NIP et sur le MIP. Pour ce type de caractérisation, le polymère est introduit dans une colonne chromatographique pour être utilisé par la suite comme une phase stationnaire dans un système HPLC avec une phase mobile souvent de même nature que le solvant de synthèse. Cette approche permet de calculer le facteur d'impression (IF) du MIP qui est défini par l'équation :

$$IF = k_{MIP} / k_{NIP}$$

où k_{NIP} et k_{MIP} sont les facteurs de rétention pour la molécule étudiée obtenus pour le NIP et le MIP respectivement. Un IF élevé implique une importante différence de rétention entre le NIP

et le MIP, et donc la présence de cavités spécifiques dans le support imprimé. Si le MIP a vraiment des cavités spécifiques, il doit retenir davantage la molécule empreinte que le NIP, donc plus le IF est grand, plus le MIP est sélectif.

- Évaluation par SPE

La différence de rétention de la molécule empreinte entre le NIP et le MIP peut aussi être évaluée par un protocole SPE. Cette approche consiste à développer les différentes étapes de la SPE (Figure I- 7) de façon à obtenir un protocole sélectif, c'est-à-dire que les différentes étapes doivent être optimisées pour qu'à l'éluion on retrouve idéalement un rendement de 100 % pour le MIP et 0 % pour le NIP. Ainsi, le protocole SPE sur MIP doit permettre de développer uniquement les interactions spécifiques de celui-ci et l'évaluation de la sélectivité se fait en comparant les profils obtenus sur le NIP et sur le MIP

En conclusion, l'utilisation de MIP en SPE présente plusieurs avantages par rapport aux IS car les MIP sont beaucoup plus stables que les anticorps et leur synthèse est plus rapide et répétable. De plus, la sélectivité des MIP est souvent comparable à celle des IS [130]. Les MIP sont bien adaptés à l'analyse de traces dans des matrices biologiques [120] grâce à leur importante sélectivité. Cependant, les MIP présentent aussi deux inconvénients majeurs : d'une part ils peuvent conduire à un relargage de la molécule empreinte, ce qui peut fausser la quantification et surtout à des niveaux de concentration de traces, et d'autre part, leur utilisation dans un milieu aqueux requiert souvent d'importantes optimisations au niveau du protocole SPE car l'eau peut développer le même type d'interactions que celles développées entre la molécule empreinte et le support polymérique.

6 – Synthèses de MIP dédiés à la cocaïne et ses métabolites

Molécule empreinte	Monomère(s) fonctionnel(s)	Agent(s) réticulant(s)	Solvant porogène	Mode d'initiation	Sélectivité	Applications	Source
Anilide de benzoylcocaine	MAA	TRIM	Toluène	UV puis cure thermique	IF _(BZE) =5,61 (MeCN / H ₂ O / CH ₃ COOH (98/1/1, v/v/v)) SPE _(BZE) (H ₂ O) : 77% MIP et 23% NIP	SPE en milieux organique et aqueux purs	[131]
Cocaïne	MAA	EGDMA	Chloroforme	Thermique	IF _{(COO)}} =1,8 IF _{(BZE)}} =1,09 (acétonitrile) IF _{(COO)}} =0,96 IF _{(BZE)}} =0,83 (H ₂ O/CH ₃ COOH 95/5, v/v)	Etude préliminaire pour l'application en capteurs	[132]
Cocaïne	Acide itaconique et acrylamide	EGDMA	Diméthylformamide (DMF)	UV puis cure thermique	IF _{(COO)}} = 1,8 (chloroforme / CH ₃ COOH 95/5 v/v)	Etude préliminaire pour l'application en capteurs	[133]
Cocaïne	Acide 2-(trifluorométhyl) acrylique	EGDMA	Toluène	UV puis cure thermique	IF _{(COO)}} =2,6 (H ₂ O / CH ₃ COOH 80/20, v/v)	Etude préliminaire pour l'application en capteurs	[134]

Tableau I- 5 : Résumé des conditions de synthèse de MIP dédiés à la cocaïne et ses métabolites.

À ce jour, diverses études portant sur la rétention sélective de la cocaïne ou de la BZE sur des MIP ont déjà été publiées [131-134]. Dans tous les cas, une approche non-covalente a été utilisée pour la synthèse des MIP avec une polymérisation radicalaire en chaîne dans un

format de polymérisation en bloc. Les conditions de synthèse sont présentées sur le Tableau I-5.

Dans une première approche, un MIP ciblé pour un analogue de la BZE, l'anilide de benzoylecgonine, a été synthétisé et testé en milieu aqueux [131]. En effet, l'utilisation d'un analogue structural élimine le risque d'une libération tardive de la molécule empreinte à partir de la matrice polymérique lors de l'utilisation du support imprimé. Donc dans cette étude, la synthèse de polymères imprimés à l'anilide de benzoylecgonine a été effectuée avec du MAA comme monomère fonctionnel et du toluène comme porogène, en présence, soit de EGDMA comme agent réticulant, soit du triméthylolpropane triméthacrylate (TRIM), et avec un mode d'initiation, soit thermique à 60°C, soit photochimique à basse température suivi d'un traitement thermique du polymère à 60°C. Dans tous les cas, un NIP a été synthétisé en parallèle pour évaluer la sélectivité du MIP. Cette sélectivité a été évaluée en HPLC avec un mélange MeCN/eau/acide acétique (98/1/1 v/v/v). Pour les différents MIP synthétisés, des IF supérieurs à 1 ont été obtenus pour la molécule empreinte mais aussi pour la BZE, confirmant la présence de cavités spécifiques pour toutes les synthèses. Néanmoins, c'est le MIP synthétisé avec du TRIM par une initiation photochimique suivie d'un chauffage à 60°C qui a présenté le meilleur facteur d'impression pour la BZE. Ce MIP a été testé pour l'extraction sur phase solide de la BZE d'une solution aqueuse à pH=1,68 dopée avec 50 µg.mL⁻¹ de BZE. Suite à un lavage avec un mélange MeCN/acide acétique (99,5/0,5 v/v), le rendement à l'éluion avec un mélange de MeCN/acide trifluoroacétique (95/5 v/v) était de 77 % pour le MIP et de 23 % pour le NIP. Le potentiel de ce support n'a cependant pas été évalué pour la rétention de la cocaïne ni pour des applications à des échantillons réels.

Un autre MIP, imprimé avec de la cocaïne, a été préparé par initiation thermique avec du MAA comme monomère fonctionnel, de l'EGDMA a comme agent réticulant et du chloroforme comme porogène [132]. Des facteurs d'impression de la cocaïne pour ce MIP de 14 et 0,54 dans du chloroforme et de l'acétonitrile respectivement ont été obtenus. Ce MIP et le NIP ont par la suite subi un traitement pour inclure une fine couche d'huile minérale à leur surface. L'objectif était, d'une part, d'éviter grâce à l'huile minérale que les solvants polaires entrent dans les cavités spécifiques, d'autre part, de conserver le solvant de synthèse au sein des pores du polymère, générant ainsi un premier équilibre de partage de la cocaïne entre la phase polaire à l'extérieur du polymère, et la phase organique dans les pores du polymère. Un facteur d'impression de la cocaïne après ce traitement de surface de 1,8 dans un milieu acétonitrile a été obtenu témoignant d'une sélectivité satisfaisante dans ce milieu. Pour la BZE le facteur d'impression en acétonitrile est passé de 0,59 à 1,09, la sélectivité reste donc assez faible pour cette molécule qui est le principal métabolite de la cocaïne à rechercher dans les matrices biologiques aqueuses. Finalement, la sélectivité des polymères modifiés a aussi été testée en milieu aqueux contenant 5 % d'acide acétique, et des IF inférieurs à 1 ont été obtenus pour la cocaïne et la BZE, témoignant d'une sélectivité insuffisante du MIP dans ce

milieu. Ce MIP n'a pas été testé pour faire de la SPE, il était plutôt destiné à la préparation de capteurs.

La modélisation moléculaire a aussi été mise à profit pour le choix du monomère fonctionnel ainsi que du ratio monomère fonctionnel/molécule empreinte pour la synthèse d'un MIP sélectif de la cocaïne [133], l'objectif de ce travail étant de synthétiser des supports polymériques spécifiques et stables pour en faire des capteurs multi-analytes de différentes drogues illicites. La première étape de la modélisation a consisté à choisir parmi une vingtaine de monomères fonctionnels utilisés couramment pour la synthèse de MIP, ceux développent des interactions fortes avec la cocaïne, via un algorithme nommé « Leapfrog ». Cette étude a conduit à la sélection de l'acide itaconique, du MAA et de l'acrylamide comme monomères fonctionnels. Une deuxième étape de modélisation utilisant des simulations de dynamique moléculaire, a permis l'obtention des ratios de monomère fonctionnel/molécule empreinte. Le complexe le plus stable pour la cocaïne est celui où elle est entourée d'une molécule d'acide itaconique et d'une molécule d'acrylamide, les auteurs indiquent que ces monomères développent le même type d'interactions que celles impliquées avec le récepteur biologique de la cocaïne, le transporteur de dopamine. Plusieurs synthèses de MIP ont alors été réalisées et le support optimal pour la cocaïne correspondait à un ratio molaire de cocaïne/acide itaconique/acrylamide de 1:2:2 avec du diméthylformamide comme porogène. Un IF de 1,8 a été obtenu pour ce MIP mesuré dans du chloroforme avec 5 % d'acide acétique. Malgré l'obtention de cette sélectivité satisfaisante en milieu organique, des applications en SPE n'ont pas été envisagées.

Enfin, l'ionisation des monomères fonctionnels acides et basiques en solution, ainsi que l'état d'ionisation des NIP et des MIP en milieu aqueux ont été étudiés [134]. En effet, l'ionisation de ces monomères n'est pas la même en solution, que pendant et après la polymérisation car elle est affectée par la présence de l'agent réticulant, du solvant et de la molécule empreinte ainsi que par la température et la pression. Une augmentation importante du pKa a été observée pour les monomères acides (acide acrylamido-2-méthyl-1-propanesulfonique, acide 2-(trifluorométhyl)acrylique (TFMAA), acide acrylique, MAA et acide itaconique) après la polymérisation, de même qu'une diminution des pKa des monomères basiques avec des fonctions amine (1-vinylimidazole, 2-(diéthylamino)ethyl méthacrylate). Ce changement de pKa se traduit en effet par un affaiblissement de la force des acides et bases, ce qui ne favorise pas particulièrement les interactions électrostatiques. La concentration en agent réticulant ne semble pas avoir d'influence dans les propriétés d'ionisation des monomères au sein des polymères. En ce qui concerne l'influence du solvant utilisé comme porogène, les solvants hydrophobes tels que le chloroforme ou le toluène augmentent la quantité de groupes ionisables, donnant lieu à une meilleure inclusion des monomères fonctionnels dans le polymère. Tenant compte de ces résultats, un MIP cocaïne a été préparé avec du TFMAA dans du toluène. L'IF obtenu pour la cocaïne dans un milieu aqueux avec 20 % d'acide

acétique est de 2,6, traduisant une bonne sélectivité du MIP pour la cocaïne en milieu aqueux. De plus, il semble présenter aussi une certaine reconnaissance spécifique pour la BZE dans ce même milieu puisque la séparation chromatographique montre une plus forte rétention de la BZE sur le MIP que sur le NIP (l'IF n'est cependant pas précisé). La comparaison de ce MIP avec des MIP synthétisés avec du diméthylformamide ou du chloroforme a démontré que de meilleurs résultats sont obtenus lors de l'utilisation du toluène. L'objectif de cette étude était encore une fois de pouvoir utiliser des MIP dans des capteurs, il n'y a donc pas d'application en SPE des MIP préparés dans cette étude. Il n'y a pas non plus d'applications à des échantillons réels.

Cette série d'études montre la faisabilité de MIP pour la reconnaissance spécifique de la cocaïne ou de la BZE dans des milieux organiques ou aqueux. Cependant, malgré l'obtention de cavités spécifiques dans ces MIP, aucune étude de SPE n'a été réalisée pour l'extraction sélective de cocaïne et de BZE d'échantillons aqueux réels.

I.3 Miniaturisation

I.3.1 Intérêts de la miniaturisation

Une des tendances actuelles dans le domaine de l'analyse est d'intégrer les différentes étapes de l'analyse dans un seul dispositif automatisé pour réduire les temps d'analyse. Ces systèmes-là sont connus sous le nom de TAS (de l'anglais « total analysis systems »). La miniaturisation de ces systèmes (μ TAS) présente un grand intérêt car les faibles dimensions facilitent l'intégration des différentes étapes de l'analyse. En plus, les dimensions réduites des μ TAS présentent un intérêt particulier pour l'analyse de terrain car leur transport est facilité. Un autre avantage de la miniaturisation est la faible consommation d'échantillon et de réactifs qui peut réduire les coûts des analyses, ainsi que la faible quantité de rejets. Enfin, ils présentent un intérêt évident quand la disponibilité des échantillons est réduite.

Malgré ses nombreux avantages, il est important de prendre en compte que la réduction des dimensions entraîne aussi une diminution des quantités de phase stationnaire utilisée ainsi que des volumes qui peuvent être injectés. Une détection très sensible est donc nécessaire pour atteindre les limites de quantification imposées par la miniaturisation. Les modes de détection qui peuvent alors être utilisés sont la détection UV, à condition d'adapter la cellule de détection pour augmenter la longueur du chemin optique et donc la sensibilité du détecteur, et la fluorescence, mais il faut que les analytes soient fluorescents sinon il est nécessaire de réaliser des réactions de dérivation. Le moyen de détection le plus adapté est la MS par son

universalité et sa spécificité, mais, à ce jour, ce genre de système est difficile à transporter sur le terrain notamment pour le couplage avec la LC [135]. De plus, si de gros progrès ont été réalisés pour le couplage de la MS à la nano-HPLC (débit de quelques centaines de nanolitres par minute) la MS est tout de même limitée par des effets de matrice lors de l'analyse d'échantillons complexes tels que les matrices biologiques (voir partie I.2.2.4 de ce chapitre), donc l'intégration d'une étape de traitement de l'échantillon est nécessaire. De plus, dans le contexte de la miniaturisation, cette étape de préparation de l'échantillon apporte aussi une pré-concentration des analytes pour faciliter leur détection. Enfin, la préparation de l'échantillon peut éviter l'obturation des canaux ou des capillaires par des particules organiques ou inorganiques, souvent présentes dans des échantillons biologiques.

Les dispositifs miniaturisés pour le traitement de l'échantillon seront présentés dans ce chapitre, puis la miniaturisation des systèmes de séparation sera traitée notamment dans les deux formats existants que sont les capillaires et les puces. Enfin, seront traités les systèmes intégrant aussi bien une étape d'extraction qu'une étape de séparation en format miniaturisé.

I.3.2 Miniaturisation des systèmes d'extraction

I.3.3.1 Formats miniaturisés pour la LLE

La LLE est souvent utilisée pour la préparation d'échantillons biologiques, cependant, l'utilisation d'importants volumes de solvants organiques souvent toxiques a conduit au développement de nouvelles méthodes basées sur la LLE dans un format miniaturisé. Parmi les nouvelles méthodes développées, se trouvent l'extraction sur simple goutte (SDME, *Single-Drop MicroExtraction*), la microextraction liquide assistée par une membrane (MASE, *Membrane Assisted Solvent Extraction*), ou assistée par une fibre creuse (HF-LPME, *Hollow Fiber Liquid Phase MicroExtraction*), et la microextraction par microémulsion (DLLME, *Dispersive Liquid-Liquid MicroExtraction*) [67]. Il est aussi possible de miniaturiser la LLE en l'intégrant dans microsystèmes basés sur des flux laminaires parallèles créant une surface de contact entre les deux phases liquides. Ces méthodes ne sont pas utilisées actuellement pour l'analyse de traces dans des échantillons biologiques. Les méthodes les plus couramment utilisées pour ce type d'analyse seront présentées par la suite.

I.3.3.1.1 Extraction sur simple goutte (SDME)

Le principe de la SDME, développée dès la deuxième moitié des années 1990s [136], repose sur le partage des analytes entre l'échantillon aqueux et une goutte de solvant organique non miscible (1-10 μL). Cette méthode peut être appliquée par immersion directe de la goutte dans

l'échantillon (DI-SDME), en plaçant la goutte dans l'espace de tête d'un échantillon (HS-SDME), ou dans un mode dynamique (CFME, *Continuous-Flow MicroExtraction*). L'extraction se fait alors dans une chambre d'extraction où, au lieu d'agiter l'échantillon, celui-ci circule de façon continue autour de la goutte formée à la pointe d'une micro-seringue. Le dispositif de base pour la DI-SDME est représenté sur la Figure I- 1 : une goutte de solvant non miscible avec l'eau est formée sur la pointe d'une micro-seringue immergée dans un échantillon en agitation. Après un temps de contact optimisé (en général quelques minutes), la goutte est aspirée dans l'aiguille pour être injectée par la suite dans le système chromatographique.

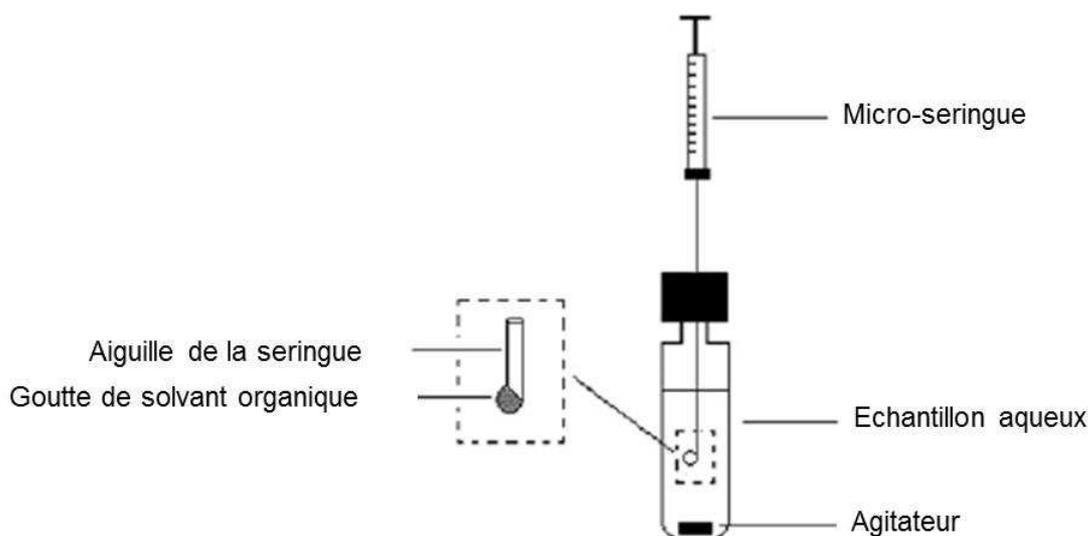


Figure I- 12 : Schéma du principe de fonctionnement de la DI-SDME (adapté de [137]).

Cette méthode est assez simple à mettre en œuvre à un faible coût et avec une faible consommation de solvant. Cependant la SDME est limitée par la stabilité de la goutte qui peut assez facilement se disperser dans l'échantillon si l'agitation est trop importante. En plus, lors de l'analyse d'échantillons biologiques, pour conserver l'intégrité de la goutte, il est absolument nécessaire de faire une étape de filtration avant la SDME. Il est néanmoins possible de travailler en espace de tête pour réduire le problème de stabilité de la goutte mais cette technique n'est adaptée qu'à l'extraction d'analytes volatiles ou semi-volatiles et il ne s'agit plus vraiment d'une extraction liquide-liquide.

La DI-SDME a été utilisée pour l'extraction de la cocaïne, l'EME, le COCAE et l'AEME de l'urine suivie d'une analyse par GC couplée à un détecteur d'ionisation d'hélium par décharge pulsée [138]. L'extraction a été réalisée en 6 minutes avec 2 μ L de chloroforme qui permet une meilleure extraction du métabolite EME qui est très polaire. Comme dans le cas d'une LLE classique, un pH alcalin autour de 10,5 a donné les meilleurs résultats de rendement d'extraction. Lors de l'application de ce protocole à des échantillons d'urine, il a été

nécessaire de réaliser une filtration des échantillons avant la SDME pour éviter de déloger la goutte de l'aiguille. Dans ces conditions, il a été possible de détecter des concentrations allant jusqu'à $0,125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ avec une bonne répétabilité. Ces résultats ont montré qu'il était possible d'éliminer une grande partie des interférents de la matrice urine avec des facteurs d'enrichissement suffisants pour le dépistage de cocaïne dans les urines. Dans une autre étude [139], la DI-SDME a été utilisée pour une première étape d'extraction de la cocaïne et de la thébaine d'un échantillon d'urine utilisant $2 \mu\text{L}$ de chloroforme pendant 5 minutes. Cette goutte a été alors transférée dans un flacon pour être par la suite encapsulée par $40 \mu\text{L}$ d'eau à un pH acide. Ensuite, une contre-extraction a été réalisée en ligne par CE avec des rendements qui ont été accrus grâce à l'utilisation d'une électro-injection à champ amplifié. L'utilisation combinée de ces deux méthodes de pré-concentration a permis d'obtenir des limites de détection entre 2 et 10 ng.mL^{-1} et l'obtention d'électrophérogrammes plus propres que sans cette première étape d'extraction.

1.3.3.1.2 La microextraction en phase liquide assistée

Dans un format miniaturisé, il est possible d'utiliser un support pour séparer les deux phases liquides pour améliorer la robustesse des systèmes de micro-extraction. Des supports poreux permettant l'échange de composés entre les deux phases doivent être utilisés. Ces supports peuvent être des membranes poreuses (MASE), ou des fibres creuses (HF-LPME), la seconde approche étant à ce jour la plus miniaturisée.

En HF-LPME la fibre creuse sépare l'échantillon (milieu donneur) du milieu accepteur. Par ce fait, l'intérieur de la fibre imbibé d'une solution non miscible au milieu aqueux, à savoir pour un solvant organique peu polaire qui peut aussi constituer le milieu accepteur présent dans le second compartiment. On parle alors d'extraction en mode biphasique dans lequel les composés diffusent à travers les pores de la membrane ou de la fibre creuse pour se répartir entre les deux phases. Une autre configuration mettant en œuvre trois phases liquides est possible. En effet, le solvant organique peut être immobilisé uniquement dans les pores de la fibre creuse, maintenant ainsi l'échantillon aqueux (milieu donneur) séparé de la phase acceptrice, alors de nature aqueuse, par le biais de cette fibre creuse imprégnée du solvant organique [140]. Les deux modes d'extraction couvrent une large gamme d'applications puisqu'il est alors possible d'extraire aussi bien des composés hydrophobes que des composés hydrophiles et même des composés ioniques. Cette approche permet aussi d'obtenir des échantillons très propres puisque la fibre sert de dispositif de microfiltration. Il est aussi possible d'utiliser des champs électriques pour accroître la diffusion des analytes entre les différentes phases liquides. Des configurations utilisées couramment pour la HF-LPME sont présentées en Figure I- 13.

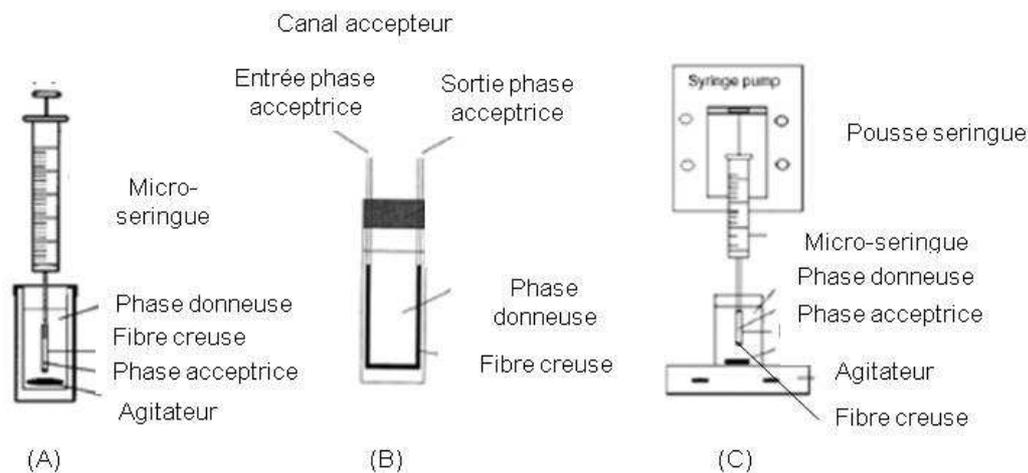


Figure I- 13 : Systèmes de microextraction en phase liquide assistée par fibre creuse en configuration en D (A), en configuration en U (B) et en configuration en D assistée par un pousse seringue (C) (adapté de [140]).

La HF-LPME a été utilisée en mode biphasique avec du chloroforme pour l'extraction de la cocaïne et certains de ses métabolites de la salive [141] et de l'urine [142], dans les deux cas l'analyse a ensuite été réalisée par GC avec un détecteur d'ionisation d'hélium par décharge pulsée. Les temps d'extraction obtenus sont assez courts, de 3 minutes pour un échantillon de 8 mL d'urine, et 10 minutes pour un échantillon de 2 mL de salive. Un important effet d'élimination d'interférents est observé et les facteurs d'enrichissement allant de 16 à 58, en fonction de la molécule et de la concentration initiale, sont suffisants pour atteindre des niveaux de concentration retrouvés dans des échantillons réels lors de l'étape de dépistage de la cocaïne. D'ailleurs, les limites de détection atteintes vont de 6 ng.mL^{-1} pour l'AEME à 28 ng.mL^{-1} pour l'EME. Le seul inconvénient de cette méthode est que les temps d'extraction ne peuvent pas être plus longs car le chloroforme est partiellement évaporé de la fibre au bout d'un certain temps, ce qui limite les facteurs d'enrichissement si l'équilibre n'a pas été atteint.

1.3.3.2 Formats miniaturisés d'extraction sur une phase solide

1.3.3.2.1 La microextraction sur phase solide et techniques dérivées

- La microextraction sur phase solide

La microextraction sur phase solide (SPME, *Solid Phase MicroExtraction*), développée en 1989 par Pawliszyn, est basée sur un principe d'adsorption et désorption des analytes cibles sur une fibre en silice recouverte d'une couche de polymère adsorbant. À différence de la SPE, la SPME n'est pas une méthode exhaustive puisqu'elle est basée sur le partage des analytes entre une phase solide et une phase liquide [67]. Le dispositif expérimental de la SPME est présenté sur la Figure I- 14.

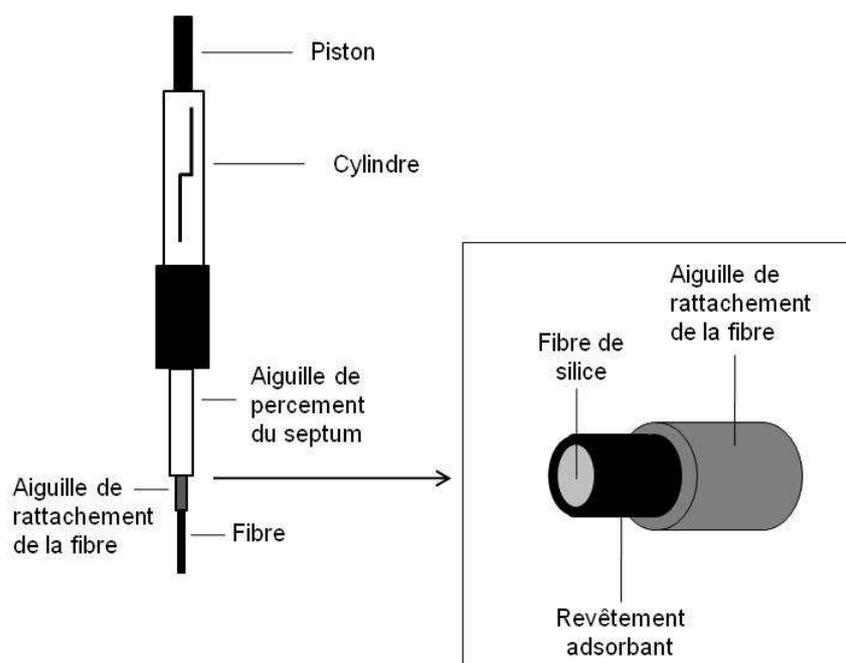


Figure I- 14 : Dispositif expérimental pour la SPME (adapté de [140]).

Pour la SPME (Figure I- 14), le dispositif expérimental ressemble à une seringue où l'aiguille protège la fibre qui se déplace vers l'intérieur ou l'extérieur de l'aiguille grâce au piston de la seringue. L'extraction peut être réalisée par immersion dans l'échantillon ou en plaçant la fibre dans l'espace de tête d'un échantillon lors de l'extraction de composés volatils. Après un certain temps de contact, une fois que l'adsorption des composés cibles est réalisée, les molécules sont ensuite désorbées thermiquement directement dans l'interface de l'injecteur de la GC ce qui conduit alors à une méthode ne nécessitant pas de solvants. L'extraction sur fibre n'est pas exhaustive, mais elle peut être améliorée en changeant la nature de l'adsorbant, l'épaisseur de la fibre (jusqu'à 100 μm) et la durée de l'extraction. Des adsorbants de polarités variées sont disponibles sur le marché tels que le polydiméthylsiloxane (PDMS), le polyacrylate (PA), le divinylbenzène (DVB), le Carboxen (à base de carbone) et le Carbowax (polyéthylèneglycol). Cette méthode d'extraction présente de nombreux avantages dont la possibilité d'automatisation, la portabilité, et une importante flexibilité des applications. Cependant, plusieurs problèmes se posent car la quantité de phase adsorbante est limitée et souvent le partage vers la fibre de molécules polaires dans des échantillons aqueux n'est pas favorisé. De plus, le couplage à la HPLC est encore à optimiser limitant ainsi son application.

La SPME couplée à la GC-MS a été utilisée à plusieurs reprises pour l'analyse de la cocaïne et ses métabolites dans des matrices biologiques. La cocaïne et le COCAE ont été extraits d'échantillons de plasma par SPME puis analysés par GC-MS, qui a permis d'atteindre des limites de quantification de 25 ng.mL^{-1} [143]. Ces mêmes molécules ont été extraites en espace de tête d'échantillons d'urine par SPME puis analysées par GC-MS [144], et en immersion directe et en espace de tête pour des échantillons de salive analysés aussi par GC-

MS [45]. Le dépistage de plusieurs drogues, y compris la cocaïne, dans les cheveux a été réalisé avec la digestion de la matrice puis l'extraction par SPME en headspace couplée à la GC-MS [145]. La méthode de dépistage obtenue est répétable et sensible avec des limites de détection de l'ordre de $0,7 \text{ ng}\cdot\text{mg}^{-1}$.

- La microextraction sur barreau aimanté

La microextraction sur barreau aimanté (SBSE, *Stir Bar Sorptive Extraction*) est basée sur les mêmes principes que la SPME, mais au lieu d'utiliser une fibre recouverte d'adsorbant, la SBSE fait usage d'un barreau aimanté recouvert d'un revêtement adsorbant. En SBSE, la quantité d'adsorbant est 50 à 250 fois supérieure au volume de phase des fibres de SPME, ce qui permet d'obtenir de meilleurs facteurs d'enrichissement [67]. Après extraction, le barreau aimanté est prélevé de l'échantillon puis séché légèrement avec un tissu non pelucheux. Finalement, la désorption se fait thermiquement ou en solution. Un des principaux désavantages de la SBSE est que l'étape de désorption peut être longue car la quantité d'adsorbant est assez importante, et en plus il peut y avoir des pertes des composés cibles lors de cette étape. De plus, il n'existe actuellement que des barreaux à base de PDMS qui sont commercialisés.

La SBSE n'a pas encore été appliquée à l'analyse de cocaïne dans des matrices biologiques néanmoins, elle peut s'avérer utile pour l'analyse d'autres drogues dans des échantillons biologiques. Une phase d'extraction à base de dioxyde de titane, de silice et d'un methylhydroxysilane a été spécialement développée pour l'extraction d'amphétamines de milieux aqueux [146] et comparée à des adsorbants plus classiques (PDMS, et PDMS fonctionnalisé DVB, ou β -cyclodextrine, ou C18). De meilleurs rendements d'extraction sont obtenus avec l'adsorbant à base de dioxyde de titane car les interactions des analytes sont non seulement des interactions hydrophobes mais aussi des interactions électrostatiques et des interactions acide/base de Lewis. Des limites de détection de l'ordre d'une dizaine de microgrammes par millilitre ont été obtenues pour des amphétamines par une méthode HPLC-UV. Cette étude montre le potentiel de l'utilisation d'adsorbants plus sélectifs pour la SBSE pour son application à des échantillons biologiques.

- La microextraction dynamique sur phase solide

La microextraction dynamique sur phase solide (SPDE, *Solid Phase Dynamic Extraction*) est une méthode miniaturisée d'extraction non exhaustive utilisant une seringue pour prélever les liquides. Au lieu d'utiliser une fibre comme en SPME, ou une couche d'adsorbant sur un barreau aimanté comme en SBSE, l'adsorbant se trouve sous forme d'une fine couche (10 à $15 \mu\text{m}$) déposée à la surface interne de l'aiguille de la seringue (Figure I- 15).

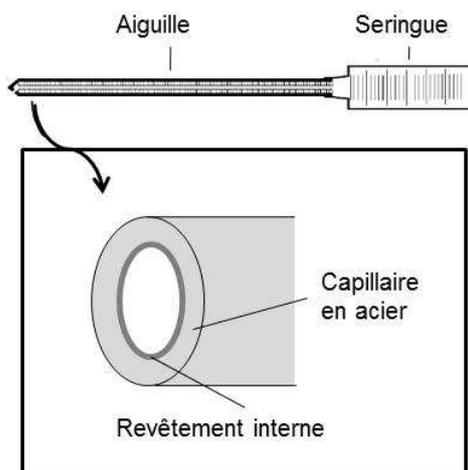


Figure I- 15 : Schéma d'une seringue pour la SPDE (adapté de [147]).

Le protocole d'extraction consiste à aspirer puis éjecter l'échantillon ou l'espace de tête de l'échantillon à l'aide de la seringue pour que les analytes s'adsorbent sur l'adsorbant. Il est donc possible d'aspirer et éjecter l'échantillon à plusieurs reprises pour augmenter les rendements d'extraction. La désorption se fait comme en SPME, soit thermiquement soit en utilisant des solvants. L'avantage par rapport à la SPME est que la quantité d'adsorbant est plus importante donc les taux de transfert sont supérieurs, et en plus, comme l'extraction est dynamique, les temps d'extraction sont plus courts. L'automatisation est possible pour le couplage avec la GC, mais comme dans le cas de la SPME, le couplage à la LC n'est pas facile.

Il n'y a actuellement pas d'application de la SPDE à l'analyse de la cocaïne et ses métabolites, mais comme dans le cas de la SPME, quelques applications ont été réalisées pour l'analyse de drogues dans les cheveux, en particulier pour l'analyse de la méthadone, des cannabinoïdes, et des amphétamines [147].

1.3.3.2.2 La microextraction par adsorbant compacté dans une seringue

La microextraction par une seringue remplie d'adsorbant (MEPS, *MicroExtraction by Packed Sorbent*) est une méthode de SPE miniaturisée pour laquelle le support d'extraction se trouve au sein d'une seringue. En effet, un adsorbant (1 à 2 mg) est piégé dans le cylindre de la seringue ou entre le cylindre et l'aiguille grâce à des frittés. Un schéma représentant un dispositif de MEPS est présenté sur la Figure I- 16. La concentration de l'analyte prend place dans le lit de particules qui se trouve dans la seringue et les mêmes étapes que celles de la SPE classique (Figure I- 7) peuvent être réalisées par simple aspiration et rejet de l'échantillon et les solutions de rinçage et d'éluion. D'ailleurs, les rendements d'extraction peuvent être augmentés en répétant plusieurs fois le protocole d'aspiration et éjection de l'échantillon.

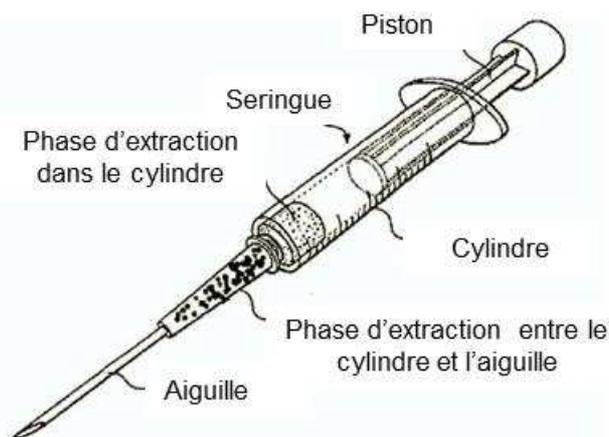


Figure I- 16 : Schéma d'un dispositif expérimental utilisés en MEPS (adapté de [9]).

Le choix des adsorbants est très vaste car les MEPS peuvent intégrer toute sorte d'adsorbant en format particulaire, en monolithe [148] ou en couche fine, y compris des supports sélectifs comme les MIP [149, 150]. Cette méthode est bien adaptée à l'analyse de traces dans des matrices complexes car elle permet de pré-concentrer les composés cibles dans la phase adsorbante et il est aussi possible de réduire le nombre d'interférents de la matrice biologique par lavage avec diverses solutions. Finalement, ce système est compatible aussi bien avec la GC qu'avec l'HPLC, car le solvant d'élution peut être sélectionné en fonction de l'application souhaitée. Enfin, l'utilisation des MEPS est automatisable par l'utilisation d'un robot permettant de réaliser les différentes étapes du protocole d'extraction. Néanmoins, comme dans la plupart des systèmes miniaturisés, les MEPS peuvent subir la formation de bulles empêchant une bonne rétention des analytes. En plus, pour obtenir un protocole d'extraction robuste et de bons rendements d'extraction, il est nécessaire de contrôler la vitesse du piston de la seringue, ce qui est souvent un problème pour l'extraction non automatisée.

Les MEPS ont été appliqués à l'analyse de la cocaïne et ses métabolites BZE, EME et COCAE dans l'urine [9]. Dans cette étude, diverses phases stationnaires ont été testées pour l'extraction des composés cibles dans l'urine. Les MEPS ont été préparés dans des seringues de 250 μL mais la quantité de phase n'est pas signalée (entre 1 mg et 2 mg). L'analyse s'est faite sans séparation chromatographique. En effet les 5 μL d'extrait obtenus ont été injectés directement dans une source à pression atmosphérique nommée DART (*Direct Analysis in Real Time*) couplée à un TOF. Les résultats ont montré que cette méthode appliquée directement à la cocaïne et à ses métabolites dans l'urine conduisait à une sensibilité insuffisante car d'importants effets de suppression d'ions ont été observés. L'utilisation d'un MEPS rempli avec une phase mixte avec un échangeur de cations à base d'acide benzensulfonique et des groupements hydrophobes (Clean Screen DAU) a permis de contrer ces effets de matrice et a conduit à des limites de détection (LDD) entre 4 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ à 24 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ pour un temps d'analyse d'environ 5 minutes. Des droites d'étalonnage ont été

réalisées en dopant des échantillons d'urine avec les composés cibles à différents niveaux de concentration. Ainsi, une limite de quantification (LDQ) a été estimée autour de 75 ng.mL⁻¹.

Conclusions

Le développement de méthodes d'extraction en format miniaturisé a explosé ces dernières années. De nouveaux formats ont donc été développés avec un grand nombre d'applications dans le domaine de l'analyse de traces dans des milieux biologiques. Cependant, tous les dispositifs cités dans cette partie sont associés à des méthodes d'analyse conventionnelles telles que la LC-MS ou la GC-MS. Pour pouvoir intégrer différentes étapes de la méthode analytique dans un système miniaturisé, il est donc d'abord nécessaire de miniaturiser l'étape de séparation pour pouvoir par la suite intégrer d'autres étapes telles que la préparation de l'échantillon.

I.3.3 Miniaturisation des systèmes séparatifs

La GC et l'électrophorèse occupent une part très importante dans le développement de systèmes de séparation miniaturisés. La miniaturisation de ces systèmes de séparation a été plus rapide que celle des séparations en LC car le transport des fluides y est beaucoup plus simple. De plus, à différence de la LC, la GC et l'électrophorèse ne génèrent pas de grandes surpressions, ce qui facilite les couplages avec le reste du système analytique. Cependant, il a été précédemment observé que la LC était mieux adaptée à l'analyse de traces de composés de polarités variées dans des milieux biologiques. Pour la séparation par LC, la miniaturisation concerne principalement la colonne analytique. Trois catégories de supports de LC miniaturisée existent en fonction des dimensions du système. Pour des tailles allant de 10 µm à 100 µm on parle de nanoLC car les débits sont de l'ordre de quelques centaines de nanolitres par minute. Quand les dimensions vont de 100 µm à 500 µm, on parle de LC capillaire et les débits sont de quelques microlitres par minute. Finalement, pour des diamètres internes autour de 1 mm, on parle de micro-chromatographie et les débits sont autour de 50 microlitres par minute [151]. Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés principalement à la nanoLC, donc à des systèmes ayant des dimensions allant de 10 µm à 100 µm. Deux approches sont possibles pour la préparation de colonnes de séparation dans ces dimensions qui va se faire dans un capillaire de faible diamètre interne, ou dans des canaux intégrés au sein d'une puce.

1.3.3.1 Séparation basée sur des capillaires remplis

Dans le cas des colonnes en format capillaire, deux approches peuvent être utilisées selon deux modes séparatifs différents, soit en conservant un contrôle hydrodynamique des fluides, soit en CE, c'est-à-dire en se basant sur un contrôle électrocinétique des fluides. Ce deuxième cas correspond effectivement à l'électrochromatographie et il s'agit encore du mode le plus couramment utilisé pour la miniaturisation de la LC [152] car il est plus simple à mettre en oeuvre que l'utilisation d'un contrôle hydrodynamique. Néanmoins, plusieurs modes de pompage sont possibles pour l'obtention d'un contrôle hydrodynamique des fluides. Des pompes avec des diviseurs de débit permettent d'atteindre des débits de l'ordre de centaines de nanolitres par minute, il existe aussi des pompes sans diviseurs de débit qui ont un contrôle microfluidique du débit basé sur la mesure de la pression au niveau de la colonne et qui peuvent atteindre aussi les nano-débits [153]. Le pompage peut aussi se faire par l'utilisation de pompes seringue. Enfin, il est aussi possible d'utiliser des forces capillaires ou centrifuges pour le transport des liquides, ces différents modes dépendant de la contre-pression générée par la phase stationnaire.

La plupart des applications en nanoLC ou en électrochromatographie concernent l'analyse de protéines, ou la séparation d'énantiomères. En effet, la miniaturisation est bien adaptée à ces domaines car les échantillons sont disponibles en faible quantité pour la protéomique, et les phases stationnaires sont coûteuses pour les séparations chirales. En nanoLC ou en CE, la synthèse des colonnes de séparation peut se faire par trois approches différentes : par remplissage avec des phases particulières, par la synthèse de colonnes en tube ouvert ou par la synthèse *in situ* de colonnes monolithiques. Par la suite, les modes de synthèse de colonnes dans des capillaires seront discutés, mais la plupart de ces méthodes sont transposables à des microsystèmes.

1.3.3.1.1 Les colonnes capillaires particulières

- Principe

Le remplissage de colonnes capillaires par des particules de phase stationnaire permet d'accéder à une grande variété de supports de séparation. En effet, il suffit de remplir les capillaires avec un adsorbant puis de bloquer le lit de particules à l'aide de frittés ou d'autres types de restrictions. Cependant, les faibles dimensions des capillaires rendent difficile l'utilisation de frittés. D'une part, les frittés doivent être préparés *in situ* dans le canal ou dans le capillaire, d'autre part, ils doivent pouvoir maintenir en place la phase particulière sans se décrocher eux-mêmes du capillaire tout en laissant circuler la phase mobile. Finalement, les frittés ne doivent pas, dans la mesure du possible, adsorber les analytes cibles car ceci se traduit par un élargissement des pics et donc une efficacité réduite de la colonne.

Plusieurs stratégies sont utilisées pour la préparation de frittés. Une possibilité est d'utiliser une température élevée pour agglomérer des particules de phase stationnaire ou des gels de silice dans un milieu aqueux [154]. Des frittés peuvent aussi être préparés par des techniques de sol-gel en faisant réagir du silicate de sodium avec du formamide, ou des silanes en présence d'un catalyseur acide. Une troisième possibilité consiste à synthétiser un polymère macroporeux par photopolymérisation : cette méthode permet de former des frittés dont la dimension est limitée grâce à l'utilisation de masques. Dans tous les cas, la procédure est longue. De plus l'utilisation de frittés peut provoquer la formation de bulles, ce qui entraîne une perte d'efficacité de la méthode. Pour éviter d'utiliser des frittés, il est possible de réduire le diamètre d'un capillaire pour contenir la phase stationnaire. Cette restriction peut se faire par une importante hausse de température [155]. Une autre option pour éviter d'utiliser des frittés consiste à y insérer des restricteurs à savoir un capillaire de plus faible diamètre dans un capillaire de diamètre plus important pour retenir la phase stationnaire.

- Phases sélectives et/ou applications aux fluides biologiques

Quelques travaux témoignent de l'utilisation de colonnes capillaires particulières pour l'analyse d'échantillons biologiques. Une colonne particulière capillaire de 75 μm de diamètre interne a été remplie de particules de silice modifiée avec de la vancomycine et a été utilisée pour la séparation d'énantiomères de la mitrazapine et de deux de ses métabolites [156] par électrochromatographie. Suite à la caractérisation de cette colonne en milieu pur, elle a été testée pour en milieu sérum après une étape de SPE hors ligne montrant de bons résultats pour la séparation des énantiomères de la mitrazapine. Des outils sélectifs ont aussi été utilisés pour la préparation de colonnes capillaires particulières appliquées à des échantillons biologiques. Ainsi, une colonne capillaire de 50 μm de diamètre interne a été remplie avec des billes en verre greffées d'anticorps anti-substance P (neuropeptide) [157]. Des séparations chromatographiques par immunoaffinité ont alors été effectuées avec cette colonne. Ainsi, la substance P a pu être analysée par une détection par fluorescence en moins de 5 minutes avec des limites de détection de 500 $\text{fg}\cdot\text{mL}^{-1}$, et pour seulement 50 nL d'échantillon (plasma, urine, lymphe, ...). Quelques applications de colonnes particulières intégrant des particules de MIP ont été récemment répertoriées [158], mais aucune de ces colonnes n'a été appliquée directement à des échantillons biologiques. Une révision de la littérature plus récente a montré qu'en plus des études citées dans ces travaux, seulement une colonne capillaire particulière de MIP a été synthétisée récemment pour la séparation des énantiomères de l'ofloxacin [159].

1.3.3.1.2 Les colonnes capillaires en tube ouvert

- Principe

Une alternative aux phases particulières est l'utilisation de colonnes à tube ouvert. Il s'agit en effet de phases pelliculaires qui résultent de la synthèse *in situ* de la phase stationnaire sous

forme d'une fine couche à la surface interne du capillaire. Plusieurs approches sont possibles pour former ces recouvrements des parois d'un capillaire : par l'adsorption de surfactants ou de polymères chargés, par l'ancrage par des liaisons covalentes d'une couche de polymère synthétisée *in situ* (ce polymère pouvant être poreux et/ou réticulé en fonction des conditions de synthèse), par greffage de biomolécules telles que des aptamères ou des anticorps, ou par synthèse sol-gel. Pour créer des liaisons covalentes ou pour faire des greffages, il est nécessaire d'activer la surface interne du capillaire ou les parois du microsysteme pour pouvoir par la suite faire la synthèse du film de phase stationnaire. Par contre, le procédé sol-gel permet de faire la synthèse de la phase stationnaire et de la lier en même temps aux parois du capillaire [160]. Comme la phase est ancrée au capillaire, il n'est plus nécessaire d'utiliser des frittés, ce qui évite la formation de bulles et le colmatage du système miniaturisé. De plus, dans le domaine de l'analyse d'échantillons biologiques, les colonnes en tube ouvert permettent d'injecter directement les échantillons sans risque d'obstruction de la colonne. Cependant, un important désavantage des colonnes à tube ouvert est que leur capacité est réduite car le volume de phase stationnaire disponible est faible. Les sites d'interaction, en contact avec des échantillons complexes, sont rapidement saturés.

- Phases sélectives et/ou applications aux fluides biologiques

Les colonnes en tube ouvert, malgré leur faible capacité, présentent souvent un intérêt pour des séparations chirales. En effet, divers types de recouvrements permettent ce type de séparation, et les polymères à empreintes moléculaires en font partie. La séparation de divers antagonistes beta-adrénérgiques a été réalisée par électrochromatographie utilisant comme séparateurs chiraux des cyclodextrines, ou un gel de cellulose ou un polymère à empreintes moléculaires ciblant le R-propranolol [161]. Dans les trois cas, il a été possible de séparer un mélange de sept paires d'énantiomères par électrochromatographie. Le polymère à empreintes moléculaires a montré un apport de sélectivité à la séparation. Malheureusement, cette étude a été réalisée uniquement en milieu pur. Le nombre d'applications de colonnes capillaires en tube ouvert avec des MIP est assez limité et se trouve aujourd'hui restreint à des séparations chirales [162].

1.3.3.1.3 Les colonnes capillaires monolithiques

Une deuxième alternative aux phases particulières sont les phases monolithiques. Les monolithes sont des phases poreuses continues qui sont exploitées dans divers formats, y compris pour la HPLC conventionnelle et la SPE. Comme dans le cas des colonnes en tube ouvert, ces phases monolithiques ne nécessitent pas de frittés, mais conduisent en revanche à une quantité de phase stationnaire plus importante et une grande surface spécifique obtenue par la présence de mésopores qui assure une bonne capacité. De plus, leur structure macroporeuse facilite leur application à des échantillons biologiques car ils ont une

importante perméabilité. La porosité et les fonctionnalités des monolithes peuvent être contrôlées en faisant varier la composition du mélange de synthèse, ce qui confère une grande flexibilité pour leur application. De plus, ils sont bien adaptés à l'analyse à haut débit qui est souvent nécessaire pour la bioanalyse. Le principal inconvénient des monolithes est le manque de répétabilité de leurs propriétés d'une synthèse à l'autre. Ceci est la conséquence du grand nombre de paramètres qu'il est nécessaire de contrôler pour leur synthèse [163].

Il existe deux catégories de monolithes qui sont les monolithes organiques et les monolithes hybrides, souvent à base d'organosilanes qui sont synthétisés in-situ dans les capillaires ou les canaux via un procédé sol-gel. En ce qui concerne les monolithes organiques, leur synthèse inclue une étape préalable de silanisation qui consiste à modifier chimiquement les groupements silanols de la paroi interne du capillaire en y liant des groupements particuliers en vue d'y ancrer par la suite le polymère. Pour ce type de synthèse, il est difficile de contrôler la structure finale du polymère car la morphologie dépend d'un grand nombre de paramètres qui sont souvent liés [164]. Il est possible de faire une modification des monolithes après leur synthèse pour les adapter aux applications pour lesquelles ils sont produits. Ces modifications sont beaucoup plus courantes pour les monolithes hybrides à base d'organosilanes. Ces dérivations permettent de modifier la structure et la chimie de surface du monolithe. Les monolithes organiques présentent d'importants avantages comparés aux silices, comme une bonne biocompatibilité, et une stabilité chimique plus importante (large gamme de pH). Cependant, ils sont souvent sujets au gonflement ou la compression lors de l'utilisation de solvants organiques, ce qui affecte l'efficacité des colonnes et la symétrie des pics.

Parmi les trois différents types de colonnes capillaires présentés, ce sont les monolithes qui sont les plus utilisés pour la synthèse de colonnes capillaires de MIP pour son application en séparation. Une liste assez complète des travaux menés dans ce domaine se trouve dans la référence [158]. Une grande partie des développements réalisés en format capillaire peuvent être transposables à des microsystemes.

1.3.3.2 Microsystemes de séparation : les puces

1.3.3.2.1 La séparation électrophorétique sur puce

La plupart des séparations en microsystemes ont été réalisées en mode électrophorétique. La séparation est en effet réalisée dans un microcanal libre où une différence de potentiel est appliquée aux deux extrémités de celui-ci et l'écoulement de la phase mobile est assuré par le

flux électroosmotique, comme en CE. Sur la Figure I- 17 est présenté un des dispositifs les plus simples pour effectuer ce type de séparation.

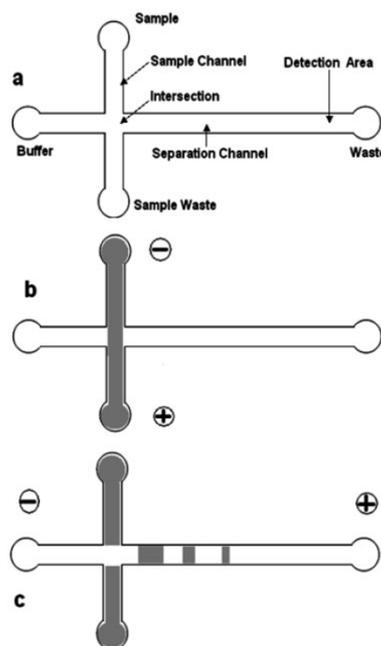


Figure I- 17 : Schémas représentant un dispositif de base pour une séparation électrocinétique avec la description générale du système (a), l'étape d'injection électrocinétique de l'échantillon (b), et l'étape de séparation (c) (adapté de [165]).

Cette puce est constituée de deux canaux perpendiculaires, l'un permettant l'injection, et l'autre (le plus long) étant dédié à la séparation (Figure I- 17 (a)). L'échantillon est introduit dans le premier canal par l'application d'une différence de potentiel (Figure I- 17 (b)). Puis, un potentiel est appliqué par la suite dans le deuxième canal pour entraîner le volume d'échantillon situé à l'intersection des deux canaux dans le canal de séparation (Figure I- 17 (c)). La séparation se fait alors dans ce canal par les différences de vitesse de migration des molécules soumises au champ électrique.

Dans ces conditions, seules les espèces chargées sont séparées, mais il est possible de travailler dans un milieu micellaire pour augmenter le pouvoir séparatif de cette technique et l'appliquer aux molécules neutres. Un exemple de l'application de ce dispositif en présence de micelles est celui de la séparation de 19 acides aminés marqués préalablement pour leur détection par fluorescence [166]. Une bonne séparation est obtenue en seulement 165 secondes pour l'analyse de ces acides aminés dans un échantillon aqueux tamponné. Cependant, aucune application dans un milieu réel n'a encore été effectuée avec ce type de microsystème de séparation.

I.3.3.2.2 Phases greffés pour la séparation sur puce

Une alternative pour la séparation d'espèces non chargées dans des microsystèmes est celle d'utiliser des phases stationnaires dans les canaux comme dans le cas de la LC. Les premiers dispositifs de séparation chromatographique en phase liquide sur puce ont utilisé des phases greffées en surface des canaux (équivalentes aux colonnes en tube ouvert utilisées dans des capillaires) au sein du microsystème. En 1990, l'équipe d'Andreas Manz a décrit le développement et la fabrication d'une puce sur un disque (*wafers*) en silice de 5mm par 5mm avec un canal de séparation en tube ouvert intégrant une électrode de platine pour la détection [167]. Ce premier microsystème n'a pas été vraiment testé, mais a permis d'observer une efficacité supérieure à la LC classique. Par la suite, en 1994, Ramsey et ses collaborateurs ont modifié les parois d'un canal de séparation en verre avec des groupements octadécylsilane en utilisant un procédé de liaison chimique sous température et pression élevées. Trois composés neutres ont pu être séparés en moins de 3 min sur 5,8 cm. Cependant l'efficacité de la séparation obtenue était faible, ceci étant certainement dû à la géométrie du canal en serpentins et à la section trapézoïdale de celui-ci [168]. Suite à ces premiers développements, d'autres phases stationnaires pour la chromatographie en phase à polarité inverse ont été développées sur des supports en verre ou en polymère [169]. Cependant, l'utilisation de ce type de colonnes de séparation n'a pas eu beaucoup de succès pour les microsystèmes par leur faible surface spécifique. Diverses possibilités permettent d'augmenter leur capacité comme l'augmentation de l'épaisseur d'adsorbant, ou le recouvrement de la surface avec une couche de particules ou même de nanoparticules d'or. Cependant, seules quelques applications sont documentées pour ce type de phases, notamment pour l'analyse d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), l'analyse de colorant, l'analyse d'ADN ou même d'un digestat de caséine [170]. Ce type de phases stationnaires n'est pas exploité pour l'analyse de traces dans des milieux biologiques. Dans tous les exemples reportés jusqu'à présent, les analyses se font dans des milieux purs tamponnés avec une détection par fluorescence.

I.3.3.2.3 Phases stationnaires basées sur des structures microfabriquées

Il est aussi possible de créer des structures microfabriquées au sein d'un microsystème pour augmenter la surface de contact. Il s'agit de la microfabrication de piliers dans un canal, ordonnés de façon étroite et régulière, mimant des particules. Ces microstructures permettent d'augmenter la surface d'interaction des analytes. Leur sélectivité peut être modulée par une modification chimique de leur surface. Un des premiers exemples de ces phases stationnaires composées de structures microfabriquées (COMOSS, *Collocated Monolith Support Structures*) est représenté sur la Figure I- 18. Ce COMOSS a été développé sur du PDMS dont la surface a été modifiée de façon à avoir des groupements C18 et des groupements acide sulfonique en surface pour l'obtention d'un flux électroosmotique stable [171]. Le support a été appliqué à la séparation électrochromatographique d'un mélange de peptides marqués

avec un groupement fluorescent, et une grande efficacité a été obtenue. D'autres COMOSS préparés sur des copolymères d'oléfines cycliques avec le même type de design ont été utilisés pour la séparation de coumarines [172]. La séparation a été réalisée par LC sur puce et par électrochromatographie, obtenant dans les deux cas une bonne efficacité.

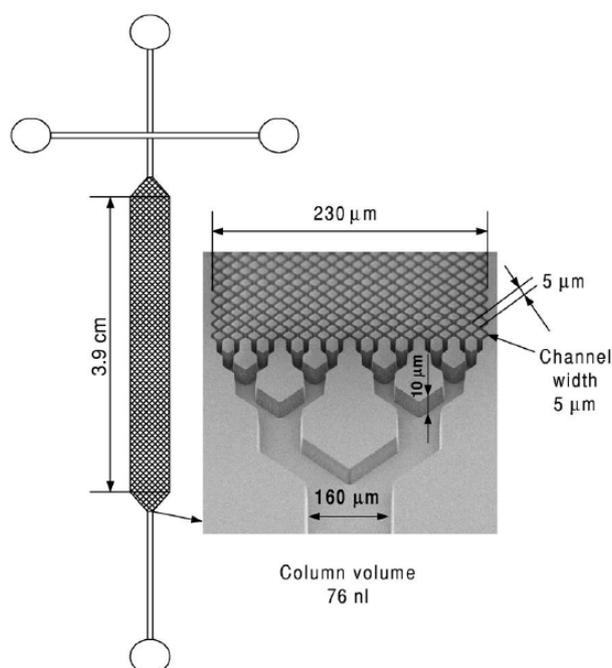


Figure I- 18 : Schéma d'une colonne d'électrochromatographie en format COMOSS et image en microscopie électronique à balayage d'une section de ce COMOSS [171].

L'avantage des COMOSS par rapport aux canaux greffés avec une couche de phase stationnaire, est que la surface d'interaction est plus importante et donc l'efficacité des séparations est meilleure. Cependant, la capacité reste plus faible que dans le cas des phases particulières ou monolithiques. Des études sont en cours pour augmenter la capacité des COMOSS, notamment en rendant la surface des piliers poreuse ou en y greffant des nanotubes de carbone [152]. Il est à noter que les COMOSS n'ont pas encore été testés dans des milieux biologiques.

1.3.3.2.4 Microsystèmes utilisant des phases particulières

Malgré la difficulté de remplissage des canaux d'un microsystème, il existe des microsystèmes incluant des phases particulières. En effet, l'avantage principal de ce type de colonnes est qu'une grande diversité de phases stationnaires est disponible. De plus, elles possèdent une grande surface spécifique par rapport aux phases stationnaires pelliculaires, ce qui permet une plus grande capacité d'injection et augmente les interactions avec les analytes. Les principales contraintes à prendre en compte sont la reproductibilité du remplissage ainsi que le mode d'immobilisation des particules. Pour le remplissage, il est possible d'utiliser une

pression élevée, si le matériel de la puce est résistant à la pression, sinon, des remplissages électrocinétiques ou sous vide peuvent être utilisés [169]. En ce qui concerne le maintien de la phase stationnaire, des frittés, des restrictions ou des barrages microfabriqués, et la réduction des dimensions des canaux peuvent être utilisés. Pour les microsystèmes, la restriction physique peut être créée lors de la conception du système. En ce qui concerne la réduction de la dimension des canaux, elle dépend du matériel utilisé pour la fabrication du système. Par exemple, lors de l'utilisation du PDMS, il est possible de déformer le canal par l'application d'une pression [173]. Une phase particulière a été immobilisée dans une puce en PDMS grâce aux propriétés de déformation de ce polymère ainsi qu'aux interactions hydrophobes du PDMS avec la phase stationnaire [170]. La pression utilisée provoque la déformation du canal, puis lors de la détente, les particules sont piégées dans le canal par le rétrécissement du PDMS. La restriction temporaire est par la suite enlevée puis un traitement thermique est utilisé pour mieux stabiliser la colonne. Cette phase stationnaire a été testée pour la séparation de trois antibiotiques du type des céphalosporines en mode nanoLC et par électrochromatographie. Une meilleure efficacité et une bonne résolution ont été obtenues pour l'électrochromatographie. Encore une fois, comme dans les travaux précédents, l'analyse a été effectuée dans un milieu pur tamponné, et aucune application réelle n'a été effectuée. À différence des travaux antérieurs, ici une détection UV a été utilisée.

1.3.3.2.5 Microsystèmes avec des colonnes de séparation monolithiques

- Principe

Les monolithes sont phases stationnaires les mieux adaptées pour la préparation de colonnes de séparation dans des microsystèmes puisqu'ils ne nécessitent pas de frittés. Néanmoins, la synthèse de monolithes *in situ* dans des micro-canaux présente aussi des difficultés car elle nécessite un pré-traitement de la surface de ces canaux, comme dans le cas des capillaires. Ce prétraitement dépend du type de matériau mis en œuvre pour la fabrication des microsystèmes. Les deux matériaux principalement utilisés sont des verres (silice fondue, quartz, verre de borosilicate...) et des polymères. Dans le cas des supports en verre, une réaction de silanisation est nécessaire pour fonctionnaliser les parois des canaux lors de la synthèse de monolithes organiques. Dans le cas des supports polymériques, le traitement de surface dépend du type de polymère utilisé pour la microfabrication. L'utilisation de supports polymériques peut réduire les coûts de fabrication des microsystèmes car les méthodes de microfabrication sont souvent moins laborieuses et requièrent d'une instrumentation moins coûteuse que pour la fabrication en verre ou en quartz [174]. L'inconvénient majeur du greffage de ces supports polymériques est le traitement de surface, car souvent l'ancrage du monolithe n'est pas facile à réaliser. Parmi les polymères utilisés pour la fabrication de microsystèmes, on compte le copolymère d'oléfines cycliques et le polyimide [152]. Le PDMS peut aussi être utilisé, mais il est incompatible avec un certain nombre de solvants

organiques ainsi qu'avec certains monomères qui s'absorbent dans celui-ci, ce qui limite son utilisation pour la synthèse de monolithes organiques.

- Application des phases monolithiques

Les colonnes monolithiques sont très utilisées en électrochromatographie capillaire mais aussi dans des microsystèmes, leurs applications font d'ailleurs l'objet de nombreuses revues [111, 163, 164, 175]. Les applications sont souvent relatives à l'analyse de protéines (ou peptides) ou du génome plutôt que l'analyse de petites molécules. Ces analyses sont effectuées par une détection par fluorescence donc en ayant préalablement effectué le marquage fluorescent des biomolécules. La plupart des analyses se sont effectuées dans des milieux purs, à l'exception des cas où les microsystèmes ont été appliqués comme des supports de traitement de l'échantillon pour purifier des matrices complexes et non pas comme des dispositifs de séparation. Par exemple, un monolithe à base de silice dans une puce en verre de borosilicate a été utilisé pour l'extraction d'ADN du sang puis sa quantification a été réalisée hors ligne suite à un marquage fluorescent de l'ADN [176].

La plupart des microsystèmes sont développés dans des laboratoires de recherche et ne sont donc pas disponibles dans le commerce. Les monolithes organiques à base de méthacrylates et acrylates peuvent être facilement polymérisés à un endroit bien défini du micro-canal. En effet, ces monolithes pouvant être photo-polymérisés, la position et la taille de la zone où se situera le monolithe dans les micro-canaux peuvent être définies par l'utilisation de masques opaques filtrant les radiations UV. Des phases stationnaires monolithiques ont par exemple été synthétisées au sein d'un microsystème en copolymère d'oléfines cycliques intégrant un cône d'électrospray pour le couplage en ligne avec un spectromètre de masse [177]. Ce microsystème était constitué de huit canaux contenant des monolithes organiques à base de butyl-méthacrylate et d'éthylène diméthacrylate pour séparer et préconcentrer un antidépresseur tricyclique (imipramine) contenu dans un échantillon d'urine injecté directement (Figure I- 19).

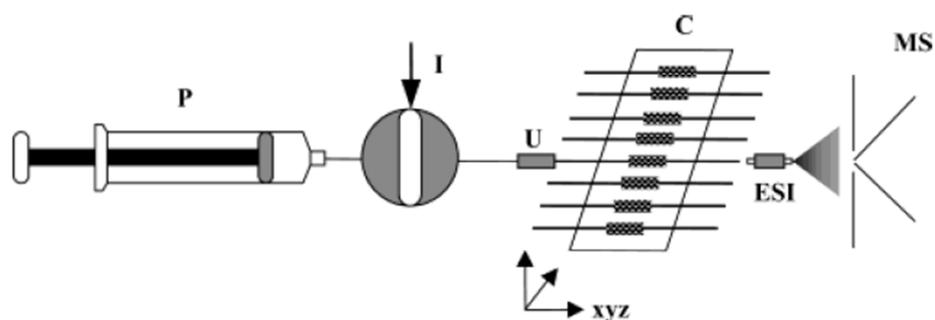


Figure I- 19 : Schéma représentant le couplage d'un microsystème de séparation et pré-concentration à un spectromètre de masse avec une source ESI (P : pousse seringue, I : vanne d'injection manuelle, U : raccord, C : puce) [177].

La capacité de ce système dans une solution aqueuse était de $0,3 \mu\text{g}$, et la porosité étant assez importante, les canaux n'ont pas été obturés par les échantillons biologiques. Cependant, la capacité du support étant réduite fortement après l'injection d'un échantillon biologique, il n'a été utilisé qu'une seule fois comme il est courant de faire en SPE conventionnelle. Néanmoins, des taux de récupération importants sont obtenus (79%) avec une sensibilité considérable puisque la limite de quantification obtenue est de $0,025 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

La polymérisation en sol-gel utilisée pour la synthèse de monolithes inorganiques ou hybrides ne peut pas être activée par l'effet d'un rayonnement, donc la synthèse localisée est moins évidente que dans le cas des polymères organiques. Cette localisation a été possible pour la synthèse d'une colonne monolithique de séparation dans un canal en serpentin sur un support en verre [178]. En effet, par l'action de quatre seringues sur différents ports du microsystème, il a été possible d'intercaler des bandes d'air et des bandes du mélange de polymérisation permettant ainsi de localiser la synthèse du monolithe à l'endroit souhaité dans le microsystème (Figure I- 20).

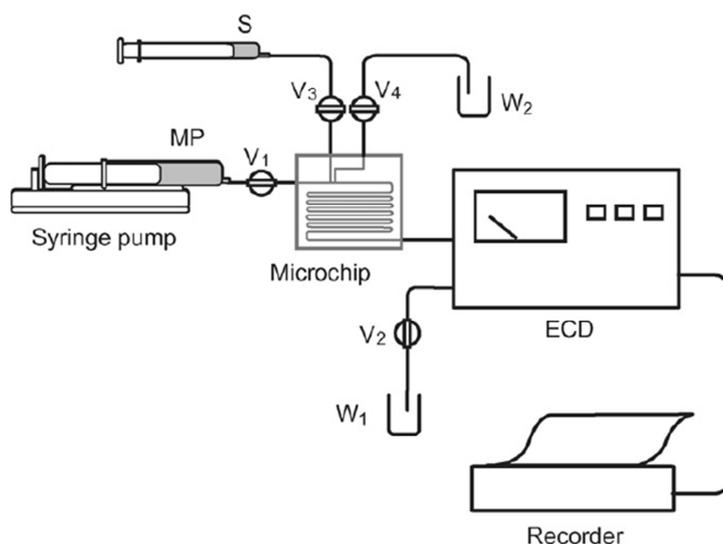


Figure I- 20 : Schéma de fonctionnement de la séparation de molécules sur une puce en verre contenant une colonne de silice greffée avec des groupements hydrophobes (S : échantillon, ECD : détecteur électrochimique, W1 : poubelle de la phase mobile, W2 : poubelle de l'échantillon, V1 : vanne d'entrée de la phase mobile, V2 : vanne de sortie de la phase mobile, V3 : vanne d'entrée de l'échantillon, V4 : vanne de sortie de l'échantillon) [178].

La phase ainsi obtenue a été par la suite fonctionnalisée par des groupements octadécyl pour faire la séparation de trois antioxydants (catéchines) dans un milieu aqueux pur dopé avec une assez bonne efficacité. Un avantage supplémentaire de ce microsystème est qu'il intègre le système d'injection et la colonne de séparation et que le transport des fluides se fait par un contrôle hydrodynamique avec des pousse-seringue rendu possible par la grande perméabilité du support.

Conclusions

L'intégration d'une colonne de séparation dans des dispositifs miniaturisés (capillaires ou puces) a montré un grand potentiel pour élargir les applications de ces systèmes à la séparation de molécules. Des séparations efficaces peuvent alors être obtenues, notamment si une étape de préconcentration est introduite dans le système. Cependant, dans la plupart des cas, les échantillons utilisés sont des échantillons purs concentrés en analytes. Or, l'analyse d'échantillons réels pose un vrai problème puisqu'une grande quantité de composés interférents sont présents à des concentrations beaucoup plus élevées que les composés cibles. L'intégration d'une étape d'extraction s'avère donc nécessaire pour l'analyse d'échantillons réels tels que les matrices complexes.

I.3.4 Intégration de l'étape d'extraction dans le système analytique

I.3.4.1 Commutation de colonnes capillaires

Une première approche possible pour l'intégration de l'étape d'extraction à l'étape de séparation serait celle d'utiliser des colonnes capillaires pour chacune de ces deux étapes, comme dans le cas d'une SPE en ligne (Figure I- 9). En effet, il est possible de faire une extraction hors ligne, mais les volumes manipulés étant très supérieurs aux volumes injectés, une perte considérable en facteur d'enrichissement est attendue. Dans la partie précédente, des colonnes capillaires ont été présentées pour la séparation de molécules. Parmi ces colonnes, on arrive à trouver des exemples d'une intégration d'outils sélectifs tels que des anticorps ou des MIP à des fins séparatives. Il est donc tout à fait possible d'envisager leur utilisation en extraction puisque leur importante sélectivité devrait permettre de retenir suffisamment les analytes cibles pour les pré-concentrer et pour éliminer la matrice échantillon par une étape de lavage. À l'heure actuelle, des outils dédiés à la nanoLC peuvent être utilisés pour réaliser un montage permettant la commutation de colonnes tout en réduisant les volumes morts le plus possible. Il est possible d'utiliser des vannes 6 voies avec de très faibles volumes de canaux, les connexions pouvant être réalisées avec des capillaires de très faible diamètre (20 μm) et des connecteurs avec des volumes morts nuls. En plus, des systèmes de pompage hydrodynamique adaptés sont disponibles pour contrôler les débits de phase mobile. Malheureusement, malgré la simplicité théorique de cette approche, il n'existe pas dans la littérature des travaux ayant utilisé ce type de montages en intégrant des phases sélectives. En effet, le matériel nécessaire représente tout d'abord un coût supplémentaire, mais aussi la manipulation dans ces dimensions est assez compliquée d'un point de vue pratique à cause

d'une gestion des fuites difficile. Des applications ont tout de même été effectuées pour l'analyse de protéines, notamment pour inclure une étape de déssalage des digestats avant l'analyse.

Des travaux ont cependant été réalisés au LSABM dans le cadre d'une thèse doctorale [158] pour effectuer l'extraction sélective de l'alfuzosine dans une colonne monolithique capillaire de MIP couplée à une séparation en nanoLC sur une colonne capillaire monolithique commerciale, et suivie d'une détection UV. Dans ces travaux, une série de synthèses ont été effectuées pour l'obtention d'un monolithe de MIP en format capillaire ayant un ancrage, une homogénéité et une porosité adaptées à la nanoLC. Les images par microscope électronique à balayage (MEB) du MIP et de son NIP associé sont présentées en Figure I- 21. La sélectivité de ce support a été étudiée par chromatographie frontale en milieu organique (acétonitrile acidifié) obtenant un facteur d'impression pour le MIP alfuzosine de 3,6 et prouvant ainsi la présence de cavités spécifiques dans le MIP. De plus, une bonne répétabilité de la synthèse a été obtenue pour 5 synthèses avec l'obtention d'un facteur d'impression de $3,6 \pm 0,3$.

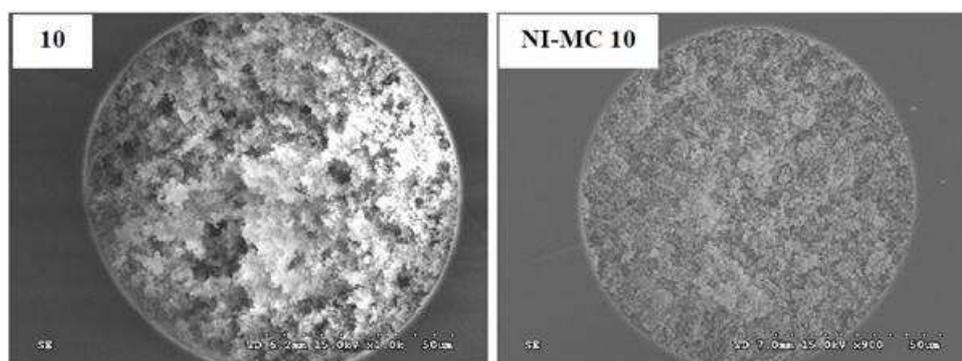


Figure I- 21 : Images MEB des monolithes imprimé alfuzosine (10) et non imprimé (NI-MC 10) synthétisés dans des capillaires en silice de 100 µm de diamètre interne (adapté de [158]).

Pour mettre à profit la sélectivité du MIP, un couplage en ligne du monolithe de MIP en format capillaire avec la nanoLC a été réalisé. Le montage qui a été utilisé a fait usage de deux pompes nano et trois vannes six voies permettant de faire chacune des étapes du protocole d'extraction. La détection a été réalisée par un détecteur UV ayant une cellule en Z de 3 nL de volume. Une image de ce montage est présentée en Figure I- 22. Le protocole d'extraction a été développé sur la base d'un protocole antérieur effectué en format conventionnel avec un MIP en bloc [179]. Suite à l'optimisation du protocole d'extraction, il a été appliqué à l'analyse d'un échantillon de plasma dopé avec de l'alfuzosine et ayant préalablement subi une précipitation des protéines. Les chromatogrammes présentés en Figure I- 23 montrent la sélectivité du MIP par rapport au NIP, et l'apport du MIP pour le traitement de l'échantillon plasmatique. Cette étude a démontré qu'il était possible de miniaturiser une méthode de traitement de l'échantillon sélective couplée à la nanoLC en utilisant une commutation de colonnes dans un format miniaturisé. Une grande économie d'échantillon a

été obtenue puisque le volume d'échantillon utilisé était 400 fois plus faible (250 nL) que dans un système conventionnel. Cette approche semble donc assez prometteuse et ce serait intéressant de la mettre en œuvre pour d'autres molécules et d'autres échantillons.

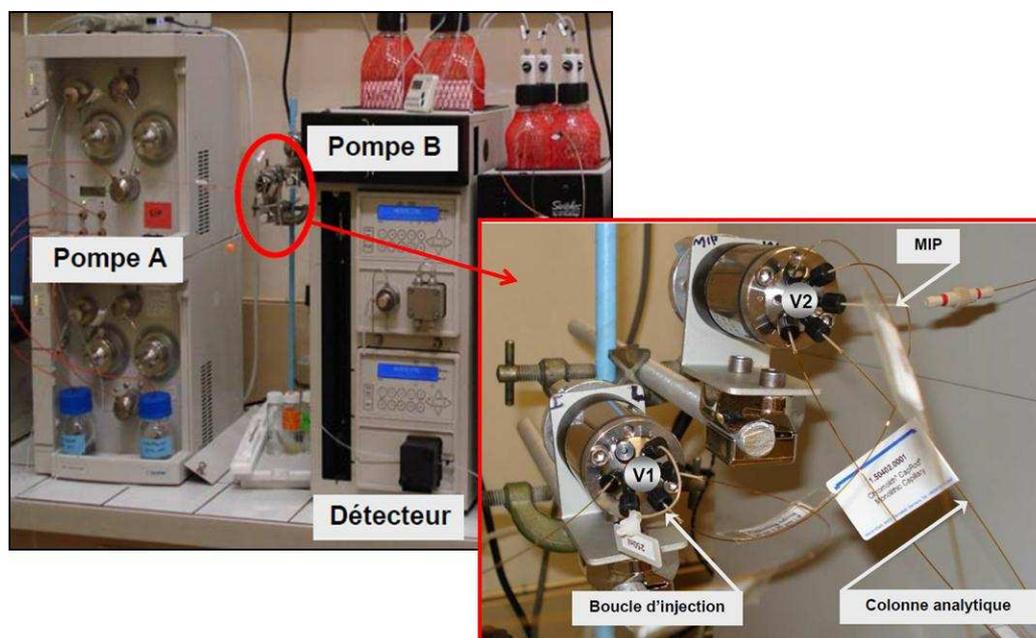


Figure I- 22 : Photos du montage utilisé pour le couplage en ligne du MIP alfuzosine à la nanoLC. La photographie de droite représente un agrandissement de la partie encadrée en rouge sur la figure de gauche. (adapté de [158]).

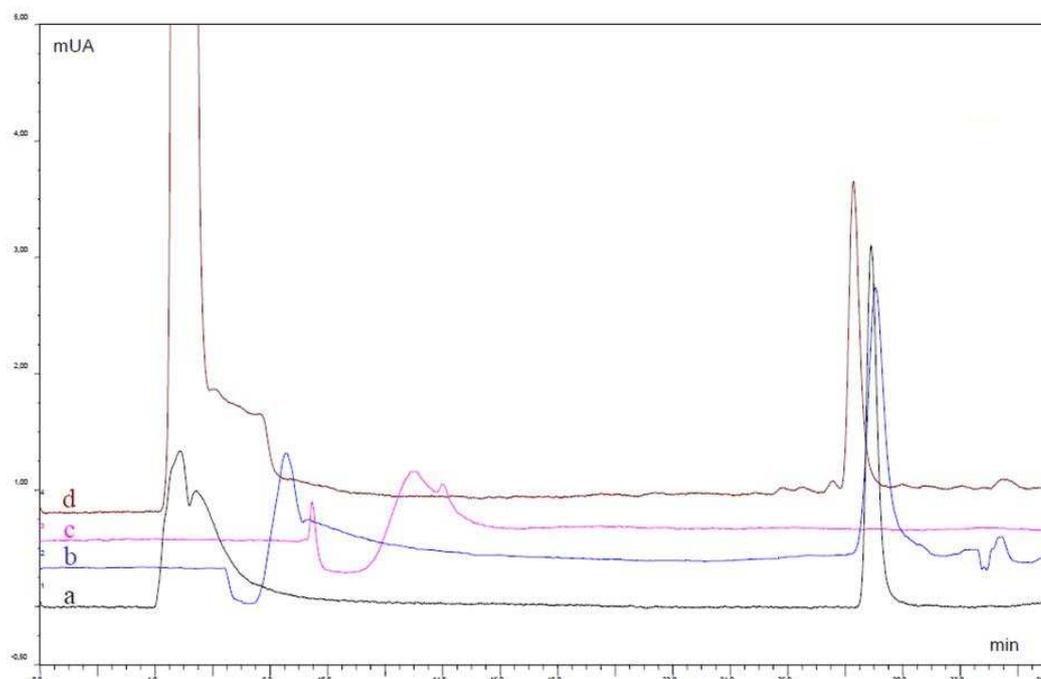


Figure I- 23 : Chromatogrammes LC-UV obtenus après une injection d'une solution standard d'alfuzosine (a), après une injection de plasma/MeCN dopé avec de l'alfuzosine puis extrait en ligne par le MIP alfuzosine en format capillaire (b), ou par le NIP (c), et injection directe de plasma/MeCN dopé avec de l'alfuzosine (d). (adapté de [158]).

I.3.4.2 Intégration dans des microsystèmes à contrôle électrocinétique

Une alternative à la commutation de colonnes pour l'intégration de diverses étapes de l'analyse, comme la préparation de l'échantillon et la séparation chromatographique, sont les microsystèmes. En effet l'intégration de ces étapes dans un seul système permet de réduire les volumes morts par rapport aux connexions utilisées en commutation de colonnes. De plus, le nombre de connexions est moins important, donc le risque d'avoir des fuites est réduit.

L'intégration dans des microsystèmes d'une étape de traitement de l'échantillon et d'une étape de séparation est assez rare. Parmi les travaux faisant cette intégration, une étude a montré que la synthèse de monolithes bien localisés au sein d'un microsystème permet d'utiliser une même colonne monolithique dans un microsystème pour faire une pré-concentration et une séparation [180]. Lors de cette étude, un monolithe à base d'hexacrylate a été synthétisé dans le canal de séparation d'un microsystème en verre en forme de T et le transport des fluides s'est fait par voie électrocinétique. Un échantillon en eau pure contenant du fluoranthène, du benzo(a)anthracène et du benzo(k)fluoranthène a été injecté vers la colonne monolithique avec une phase mobile favorisant une forte rétention des analytes sur la phase stationnaire. Dans ces conditions, il a été possible d'injecter une quantité d'échantillon plus grande que le volume qui se trouve dans l'intersection des canaux pour préconcentrer l'analyte d'intérêt en tête de colonne. Ainsi, la sensibilité a été augmentée fortement par rapport à une injection normale comme on peut le voir sur la Figure I- 24.

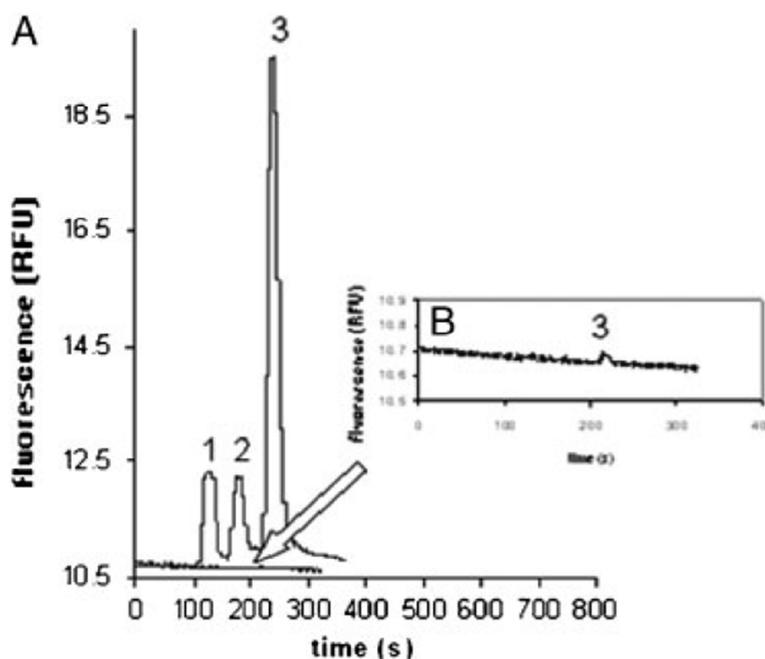


Figure I- 24 : Electrochromatogrammes d'un mélange de fluoranthène et de benzo(a)anthracène à $3,3 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ et de benzo(k)fluoranthène à $5 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ obtenus après une injection normale (A), ou après une pré-concentration de 60 secondes (B) [180].

Ce dispositif intègre une étape de préconcentration à une étape de séparation, mais l'intégration d'une colonne d'extraction séparée de la colonne analytique serait plus adaptée à l'analyse d'échantillons réels car elle permettrait de réaliser un vrai protocole d'extraction avec des étapes de lavage visant à éliminer les interférents de la matrice. Cette séparation de l'étape de pré-concentration permettrait aussi la percolation de volumes d'injection plus importants car dans le cas présenté dans cet exemple, les pics chromatographiques sont élargis lors de l'augmentation du volume d'injection. Il est donc nécessaire de trouver un compromis pour le volume injecté de façon à réduire l'élargissement des pics tout en conservant une sensibilité suffisante. De plus, cette méthode est appliquée en milieu pur et n'apporte pas de sélectivité à l'analyse qui peut être nécessaire à l'analyse de traces dans des échantillons biologiques.

Une possibilité pour apporter de la sélectivité de l'analyse serait celle d'utiliser une détection sélective, comme la MS ou la détection électrochimique. Mais dans le cas de la MS, le couplage des microsystèmes à un spectromètre de masse n'est pas de toute simplicité, et pour la détection électrochimique, il ne s'agit pas d'une méthode de détection universelle. Une deuxième possibilité est celle d'introduire dans un microsystème des outils sélectifs tels que des anticorps ou des MIP comme pour le couplage avec la nanoLC. Un exemple de ce type de systèmes est celui d'une puce intégrant un IS et un canal de séparation par CE schématisé en Figure I- 25 (A) [181]. Cette puce en verre a été conçue de façon à pouvoir y intégrer dans le port 1 des disques en fibre de verre où ont été immobilisés des anticorps contre divers marqueurs de l'inflammation. Cette puce a permis de réaliser l'analyse totale, incluant l'injection, l'isolement par immunoaffinité (port 1), la dérivation des analytes en molécules fluorescentes (port 1 et 3), la séparation par électrophorèse (canal en serpentif) et finalement la détection par fluorescence, de 12 biomarqueurs de l'inflammation dans 200 nL d'échantillon issus de la peau de personnes ayant des lésions cutanées. Les rendements obtenus par cette méthode étaient supérieurs à 96 % pour tous les biomarqueurs analysés et des limites de détection inférieures à $7 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ont été obtenues, pour un temps total d'analyse de 9 minutes. Sur la Figure I- 25 (B) se trouve un électrophérogramme correspondant à l'analyse d'un échantillon d'un patient avec une lésion légère. Les auteurs considèrent que l'outil utilisé a de bonnes performances et qu'il pourrait être utilisé en diagnostic après une optimisation du temps d'analyse. La miniaturisation dans cette étude a permis non seulement d'utiliser des quantités d'échantillon très faibles, sachant que la quantité de tissus était restreinte, mais les limites de détection et les temps d'analyse sont très faibles. De plus, l'utilisation de divers anticorps pour l'immunoextraction ouvre des possibilités très intéressantes dans le domaine de l'analyse clinique puisque les disques utilisés comme supports des anticorps peuvent facilement être remplacés.

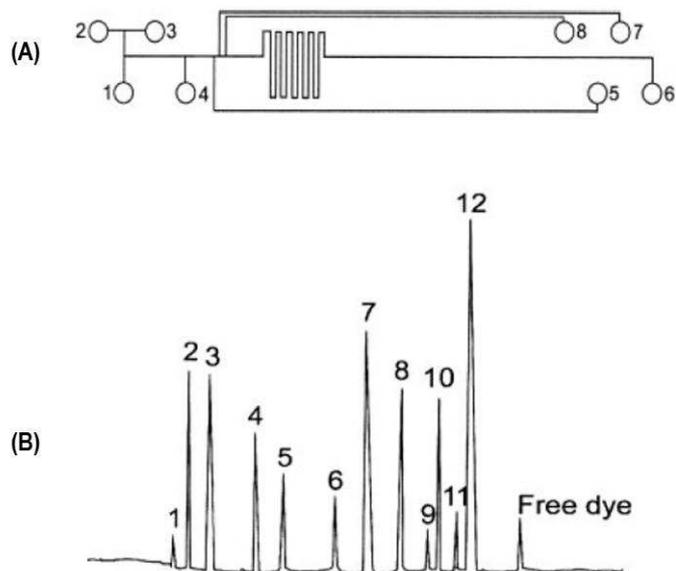


Figure I- 25 : Schéma de la puce utilisée pour l'analyse de marqueurs de l'inflammation (A), et électrophérogramme obtenu des concentrations de biomarqueurs pour un échantillon cutané d'un patient avec une lésion cutanée légère (B) (adapté de [181]).

Une autre étude assez proche de celle présentée précédemment, a été réalisée pour l'analyse de l'alphafetoprotéine, un biomarqueur du cancer hépatocellulaire [182]. Dans cette étude, le greffage d'anticorps s'est réalisé sur les parois d'un canal du microsystème utilisé, et malgré la complexité du système développé, l'analyse quantitative de ce marqueur dans du plasma humain a été possible grâce à l'inclusion de modules permettant de faire des ajouts dosés.

1.3.4.3 Intégration dans des microsystèmes à contrôle hydrodynamique

En 2005 a été commercialisée une puce, la chip Agilent, qui est constituée d'une précolonne d'enrichissement, d'une colonne de séparation et d'une nano-aiguille métallisée pour faire un nano-électrospray [183]. Les deux colonnes sont remplies de particules de phase stationnaire et ce remplissage est effectué par l'application d'une importante pression. L'utilisation d'une restriction permet de maintenir en place les particules. Différentes puces sont disponibles avec des phases stationnaires et des dimensions variables. La Figure I- 26 présente un schéma de cette puce. Ce système sera étudié avec plus de détails dans le chapitre II de ce travail.

Le Tableau I- 6 présente quelques applications de ce microsystème. Il a principalement été utilisé pour l'analyse de protéines et d'oligosaccharides. En effet, c'est l'apport en sensibilité par l'étape de SPE intégrée qui permet d'injecter de plus grands volumes, et surtout l'apport en capacité de pics qui a été exploité pour toutes ces applications. Une première application pour l'analyse de composés pharmaceutiques dans du plasma a été réalisée montrant la faisabilité de l'analyse de petites molécules dans des échantillons complexes sur la puce

commerciale [184]. Dans cette étude, les protéines du plasma ont été préalablement précipitées par de l'acétonitrile puis une injection de 1 μ L d'échantillon a été réalisée. Les limites de détections ainsi obtenues vont en dessous de 10 fg. Cette très grande sensibilité devrait permettre l'utilisation de très faibles volumes d'échantillon. Ainsi, le design de cette puce est très bien adapté à l'analyse de traces dans des échantillons biologiques puisqu'il intègre une étape d'extraction sur phase solide à la séparation par HPLC et une détection par spectrométrie de masse.

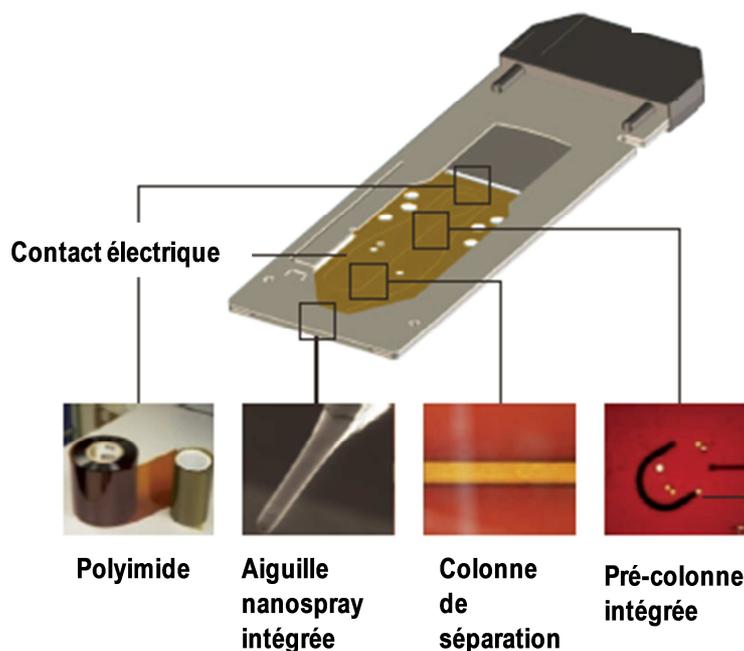


Figure I- 26 : Schéma du dispositif puce Agilent (adapté de [185]).

Analytes	Echantillons	Détection	Source
Anthocyanines	Peaux de raisin	Q-TOF	[186]
Composés pharmaceutiques	Plasma	QqQ	[184]
Glycopeptides	Préparation biologique de référence	Trappe ionique	[187]
Nucléopeptides	Cellules de carcinome du colon	Trappe ionique	[188]
Oligosaccharides	Lait maternel	TOF	[189]
Oligosaccharides	Cellules bovines et porcines	Q-TOF	[190]
Oligosaccharides	Sérum	TOF	[191]
Phosphopeptides	Cellules	Trappe ionique	[192]
Phosphopeptides	Cellules	TOF ou trappe ionique	[193]
Protéines globulaires	Graines de lupin	Trappe ionique	[194]
Protéines	Riz, lentilles ou ongles	Trappe ionique	[195]
Protéines	Cellules du colon	Trappe ionique	[196]
Protéines	Lymphocytes T	Trappe ionique	[197]

Tableau I- 6 : Quelques applications de la puce commerciale fabriquée par Agilent.

En 2009, un autre système basé sur une technologie sur puce est apparu, il s'agit du système cHiPLC d'ekisgent (Figure I- 27). Ce système est basé sur l'utilisation de plusieurs puces en verre avec des canaux ayant une fonction particulière. Le canal peut être utilisé soit comme une boucle d'injection, soit comme une colonne d'enrichissement, soit comme une colonne de séparation. Dans les deux derniers cas, le canal est rempli de particules de silice greffée octadécyl. Une interface est utilisée pour connecter une ou plusieurs puces entre elles permettant d'effectuer une étape de séparation seule ou une étape d'enrichissement (sur une première puce) et de séparation (sur une deuxième puce), les puces étant alors connectées entre elles via une vanne 10 voies et une troisième puce (« jumper ») comme indiqué sur la Figure I- 27. Il s'agit donc d'un système plus modulable que la puce Agilent où la colonne de séparation et la pré-colonne d'extraction sont toutes les deux dans un même microsysteme. Cependant, pour le système proposé par Eksigent, il est nécessaire d'ajouter une pompe nanoLC et un système de détection. L'avantage alors de la puce Agilent est que le pilotage du système se fait avec un seul logiciel, et le couplage avec la spectrométrie de masse est facilité par l'utilisation d'une source nanospray intégrée. Enfin, la disponibilité de puces pour le système Eksigent est encore assez réduite avec un seul type de phase stationnaire et une seule capacité pour les puces d'enrichissement. Aucune application à des échantillons réels n'a pour l'instant été reportée avec ce système.

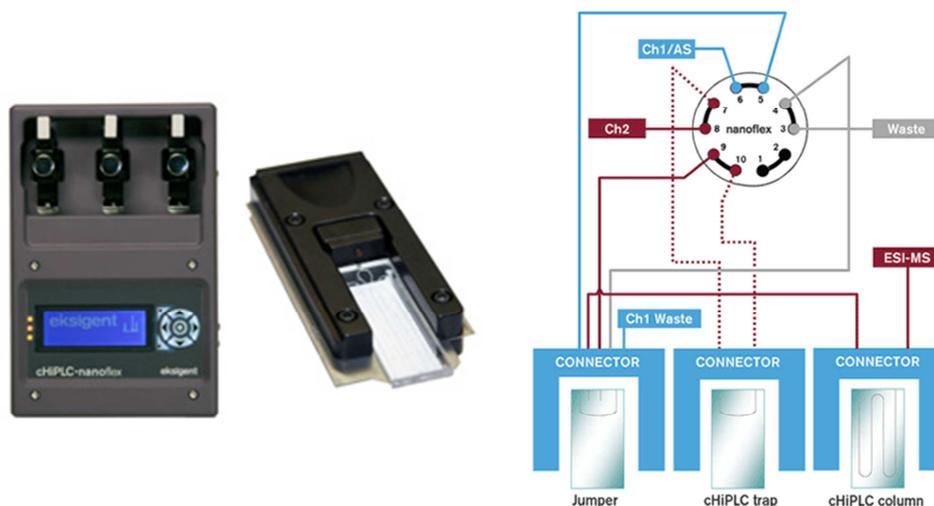


Figure I- 27 : Système cHiPLC-nanoflex de Eksigent et schéma de connexion des étapes d'enrichissement et de séparation via différentes puces indépendantes (adapté de [198]).

Ces approches sont très intéressantes en vue de l'intégration de la préparation de l'échantillon avec l'analyse chromatographique, mais pour l'instant il n'existe que très peu de développements pour l'analyse de traces dans des matrices complexes.

Conclusions

La grande difficulté associée à l'analyse de traces dans des milieux complexes tels que les matrices biologiques est liée au grand nombre de molécules composant ces échantillons. Divers outils sont aujourd'hui disponibles pour isoler les molécules étudiées du reste de l'échantillon. La séparation des constituants de l'échantillon peut se faire par chromatographie en phase gazeuse ou en phase liquide, mais c'est la LC qui est la mieux adaptée car elle a une plus grande gamme d'applications, en particulier pour les composés polaires et non-volatils. De plus, le couplage entre l'HPLC et la MS a donné lieu à des méthodes plus sélectives et plus sensibles et constitue donc un outil incontournable pour l'analyse de traces dans des milieux biologiques. Cependant, ce couplage requiert d'un mode d'ionisation à pression atmosphérique qui est sujet à des effets de matrice tels que des suppressions d'ions ou des exaltations des signaux. Le traitement de l'échantillon avant l'analyse est donc souhaitable pour contrer ces effets. Parmi les diverses méthodes utilisées, c'est la SPE qui est la plus courante indépendamment du type de matrice étudiée. En effet, la SPE offre une grande variété de supports d'extraction plus ou moins sélectifs qui lui confèrent une grande versatilité pour le traitement de l'échantillon. Lorsque les analytes sont présents à l'état de traces dans des matrices complexes, des supports très spécifiques sont les mieux adaptés car ils permettent de réduire le nombre d'étapes de traitement de l'échantillon avec l'obtention en parallèle d'un haut degré de purification. Parmi ces outils très sélectifs se trouvent les polymères à empreintes moléculaires, qui induisent une rétention basée sur des mécanismes de reconnaissance moléculaire. De par la facilité et la rapidité de leur synthèse, ces outils seront étudiés par la suite (chapitres III et IV) pour leur application à l'extraction de la molécule modèle, la cocaïne, ainsi que de certains de ses métabolites dans des échantillons biologiques.

Une des tendances actuelles dans l'analyse est le développement d'outils séparatifs miniaturisés. En effet, non seulement ils permettent de faire des séparations efficaces, mais aussi ils réduisent la consommation d'échantillons et de réactifs. Cependant, la miniaturisation ne règle en rien la complexité des échantillons, d'autant plus que les dimensions réduites diminuent la capacité de pics pour la séparation des mélanges complexes. Il est donc nécessaire d'introduire une étape de traitement de l'échantillon. Celle-ci permet de pré-concentrer les analytes et obtenir ainsi une meilleure sensibilité, mais aussi, s'il est possible de rendre cette étape sélective, cela permettrait de purifier les matrices complexes. Pour ce faire, il est possible de travailler en format capillaire par commutation de colonnes, mais les volumes morts ainsi que la présence des fuites prennent de l'importance dans un format miniaturisé, et donc l'efficacité de l'analyse peut en être affectée. Une autre solution consiste à intégrer l'étape de pré-concentration et l'étape de séparation dans un même microsystème.

Ceci permet de s'affranchir en partie des problèmes de connexions et de volumes morts. Un outil commercial basé sur la technologie sur puce et intégrant une colonne de pré-concentration et une colonne de séparation est aujourd'hui disponible. Celui-ci semble bien adapté pour l'analyse de traces dans des échantillons biologiques, c'est pourquoi il sera testé dans le chapitre suivant (chapitre II) pour l'analyse de la cocaïne et son métabolite principal, la BZE, dans des milieux biologiques. Parallèlement, ce dispositif met en œuvre des phases hydrophobes non sélectives, ce qui limite son application pour l'extraction de molécules polaires. Le potentiel d'un MIP pour les molécules cibles sera donc étudié dans le chapitre III, et différentes approches de son intégration dans des dispositifs miniaturisés seront présentées dans le chapitre IV.

Chapitre II : Analyse de la cocaïne par SPE-LC sur puce couplée à la spectrométrie de masse

Introduction

Dans le chapitre précédent, quelques outils miniaturisés ont été présentés. En effet, des progrès non négligeables ont été réalisés avec notamment pour objectif final l'intégration de la préparation de l'échantillon, de la séparation et de la détection sur un microsystème analytique (μ TAS). Comme cela a été rappelé précédemment, la miniaturisation des systèmes de séparation présente un certain nombre d'avantages dans le cas de l'analyse de traces en milieux biologiques. Cependant, la miniaturisation présente des inconvénients car son pouvoir séparatif est réduit par la diminution de la longueur du dispositif séparatif utilisé, ce qui est un problème majeur lors de l'analyse d'échantillons complexes tels que les matrices biologiques. De plus, la quantité d'échantillon étant réduite et les niveaux de concentration des analytes recherchés étant très bas, des techniques de détection très sensibles sont nécessaires et une étape de traitement de l'échantillon semble indispensable pour l'analyse de traces dans des milieux biologiques en format miniaturisé.

Une approche intéressante est l'utilisation d'un système miniaturisé intégrant une étape d'extraction sur phase solide et une étape de séparation. Il existe aujourd'hui un tel système basé sur une technologie sur puce qui permet en plus le couplage à la MS. Ce dispositif présente l'avantage par rapport à la nanoLC classique de permettre un meilleur contrôle des débits et une réduction des volumes morts, en plus de présenter un interfaçage plus simple avec la MS via une interface nanospray intégrée. Malgré un nombre important d'applications de ce système dans le domaine de la protéomique, et des oligosaccharides, son potentiel n'a pas vraiment été évalué pour l'analyse quantitative de petites molécules. Ainsi, ce système a été étudié pour l'analyse de la cocaïne et la BZE, en tant que molécules modèles, dans des matrices biologiques variées.

II.1 Principe de fonctionnement du système étudié

II.1.1 Description des puces et de l'instrumentation utilisées

Dans le contexte de la miniaturisation pour l'analyse de traces dans des matrices biologiques, la cocaïne et son métabolite principal, la BZE, ont été choisies en tant que molécules modèles pour l'application de la SPE-LC sur puce couplée à la spectrométrie de masse. Le système utilisé pour cette étude est en effet une puce commerciale en polyimide schématisée en la Figure II- 1.

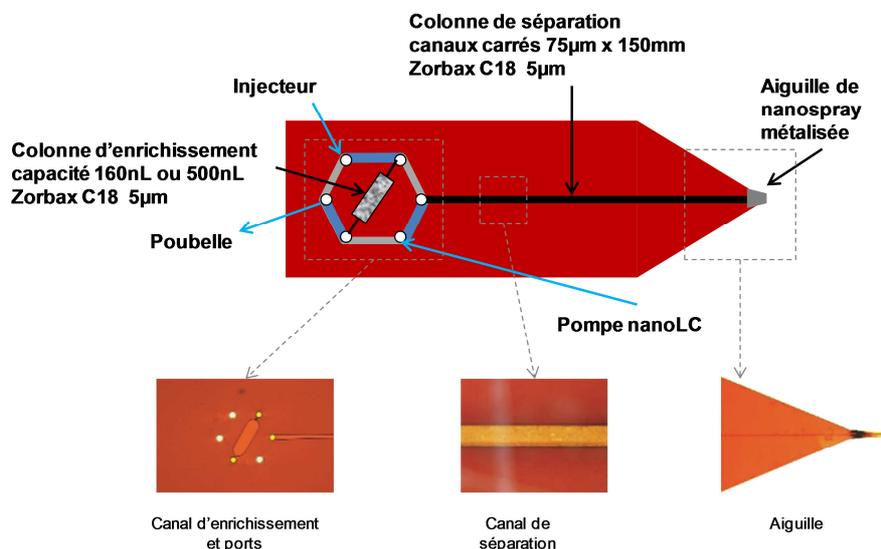


Figure II- 1 : Schéma de la puce commerciale étudiée (source Agilent).

Le polyimide est un copolymère de 4-4'-diaminodiphényl éther et d'anhydride téréphtalique [199] qui est compatible avec la plupart des solvants organiques et qui est stable mécaniquement, thermiquement et chimiquement dans un large intervalle de pH. Pour l'élaboration du dispositif expérimental, les canaux et les ports sont tout d'abord formés par ablation laser sur des films de polyimide. Les canaux ainsi obtenus sont de forme carrée de 75 μ m de côté. Puis des contacts électriques en platine sont déposés sur la puce par sublimation pour pouvoir appliquer par la suite une tension pour former l'électrospray. Les films de polyimide utilisés ont une couche co-extrudée de polyimide thermoplastique, ce qui facilite le collage des différentes couches sous pression et chaleur. L'ablation laser est ensuite utilisée pour donner la forme finale à la puce et à l'aiguille de nanoélectrospray. Cette aiguille a finalement une forme conique d'une longueur de 2 mm et d'un diamètre externe qui va de 35 μ m à 100 μ m.

Outre son aiguille de nanoélectrospray, la puce intègre un canal d'enrichissement et un canal de séparation. Les deux canaux sont remplis de particules sphériques de phase stationnaire de 5 μ m de diamètre. Le remplissage des canaux se fait par suspension en appliquant une procédure adaptée d'une méthode préalablement utilisée pour le remplissage de capillaires en silice [200]. Ce système ne nécessite pas de frittés car la phase stationnaire est retenue par un effet « keystone ». En effet, les dimensions se réduisent à l'extrémité des canaux, et lors du remplissage avec des particules, leur densité au niveau de la restriction augmente ce qui

entraîne leur agrégation et donc leur immobilisation dans le canal [173]. Les volumes du canal d'enrichissement disponibles à l'heure actuelle sont de 40 nL, 160 nL et 500 nL conduisant donc à des quantités de phase variées. Les deux canaux sont remplis d'une même phase stationnaire. Trois phases différentes sont actuellement disponibles : de la silice greffée C8 et C18, et du carbone graphite poreux avec des porosités de 80 Å et 300 Å. Les trois puces testées dans cette étude contiennent des particules de Zorbax SB C18 avec des porosités de 80 Å pour la puce à très grande capacité, et de 300 Å pour les 2 autres puces. Le canal de séparation présente une coupe transversale carrée de 75 µm de côté et sa longueur peut être de 43 mm ou 150 mm. Pour ce travail, trois puces ont été testées, une puce avec une capacité de 40 nL et une longueur de canal séparatif de 43 mm, une puce de grande capacité (160 nL) et une puce de très grande capacité (500 nL), ces deux dernières ayant une longueur de canal séparatif de 150 mm. Les caractéristiques des trois puces évaluées sont reportées dans le Tableau II- 1.

Puce	Simple	Grande capacité	Très grande capacité
Phase stationnaire	Zorbax SB C18 5 µm	Zorbax SB C18 5 µm	Zorbax SB C18 5 µm
Porosité	300 Å	300 Å	80 Å
Dimensions du canal de séparation	43 mm x 75 µm x 75 µm	150 mm x 75 µm x 75 µm	150 mm x 75 µm x 75 µm
Dimension du canal d'enrichissement	40 nL	160 nL	500 nL

Tableau II- 1 : Caractéristiques des puces évaluées.

Une interface permet de connecter la puce au système de pompage et au spectromètre de masse. Cette interface, nommée « chip cube », est présentée en Figure II- 2. La puce se place à l'entrée du « chip cube » et elle est alors intercalée entre le rotor et le stator d'une vanne rotatoire à l'intérieur de l'interface. Cette vanne permet de positionner la puce de façon à avoir l'aiguille d'électrospray à l'entrée du spectromètre de masse. Elle permet aussi de faire des connexions étanches entre la puce et les pompes. Comme dans une vanne 6 voies classique, le rotor est constitué de trois canaux intercalés au niveau des pores de la puce deux à deux, et les connexions des liquides se font au niveau du stator. Le stator est fixé à un bras de serrage qui permet l'alignement des ports du stator avec les ports de la puce et avec les canaux du rotor [183]. La vanne est pilotée par le logiciel Mass Hunter (Agilent Technologies, Massy, France). Une fois que la puce est placée et alignée à l'intérieur de l'interface, la vanne rotative peut passer d'une position d'enrichissement à une position d'analyse en basculant de 60°.

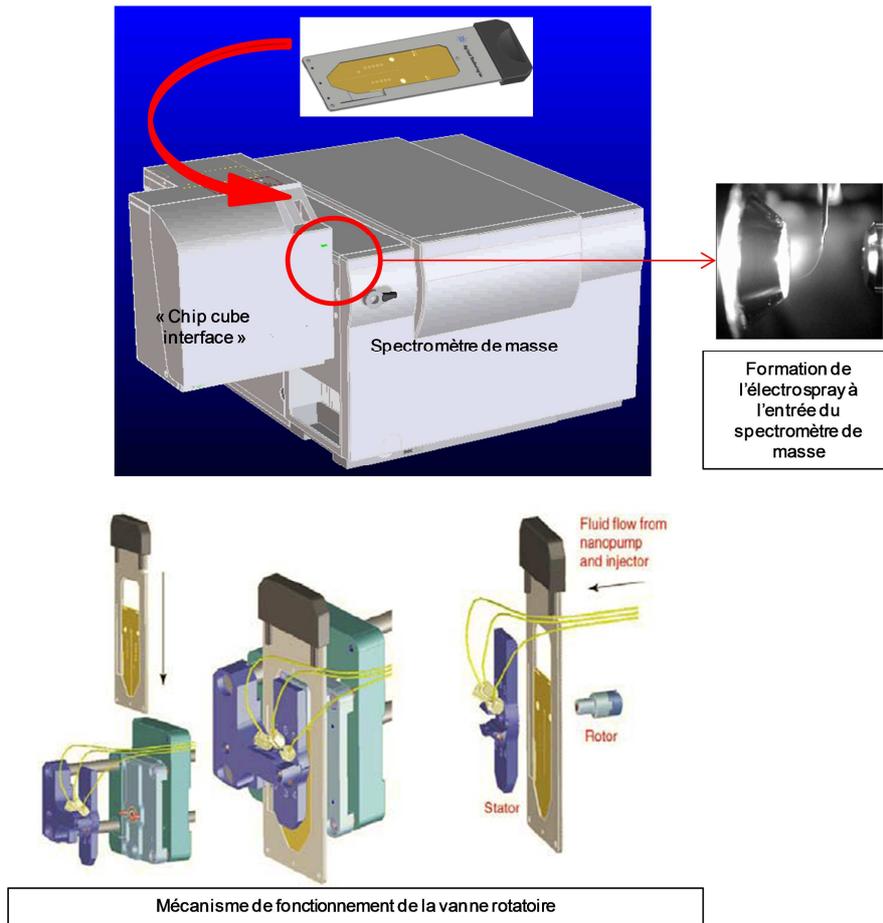


Figure II- 2 : Schéma de l'interface « chip cube ».

La configuration de la puce, schématisée en Figure II- 3, est semblable à celle d'un couplage SPE-LC en ligne conventionnel. Dans la position d'enrichissement (Figure II- 3(A)), la pompe analytique est connectée à la colonne de séparation pour équilibrer la phase dans le canal séparatif, tandis que le canal d'enrichissement est connecté directement à l'injecteur. Cette position est utilisée pour le chargement de l'échantillon dans la zone d'enrichissement. En effet, l'échantillon est prélevé dans la boucle de l'injecteur puis est poussé à travers un capillaire en polyétheréthercétone (PEEK) vers le canal d'enrichissement par une pompe de chargement branchée directement sur la vanne de l'injecteur. Le transfert de l'échantillon de la boucle de l'injecteur vers le canal d'enrichissement peut être contrôlé soit par un programme temporelisé pour basculer la vanne de l'injecteur et la vanne rotatoire de la puce, soit par une fonction automatique du logiciel (nommé « chargement intelligent de l'échantillon ») [201].

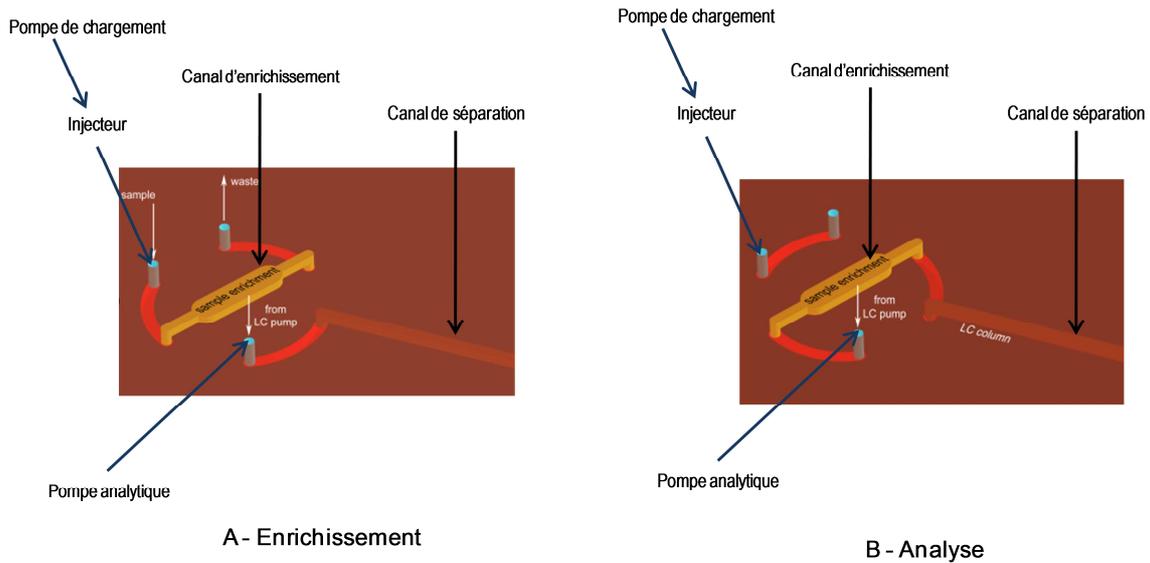


Figure II- 3 : Schéma des connexions de la puce dans la position d'enrichissement (A), et dans la position d'analyse (B) en mode « forward flush ».

Le premier mode de contrôle est celui rencontré généralement pour des couplages conventionnels SPE-LC, mais il nécessite d'une nouvelle optimisation lors d'un changement de volume injecté. Dans le deuxième mode de contrôle, le logiciel calcule automatiquement le temps de chargement de l'échantillon basé sur le débit de la pompe de chargement, le volume d'injection et le volume des capillaires qui font la connexion du siège d'injection jusqu'au canal d'enrichissement. Dans le cadre de ce travail, le mode automatique a été utilisé. Un paramètre doit être cependant défini pour ce mode automatique, il s'agit du volume de transfert ou « flush volume » (V_{flush}) qui correspond au volume qui doit assurer le transfert de l'échantillon de la boucle d'injection vers la zone d'enrichissement. Il est donné par la formule suivante :

$$V_{\text{flush}} = (V_{\text{siège}} + V_{\text{filtre}} + V_{\text{transfert}}) \cdot x = V_0 \cdot x$$

$V_{\text{siège}}$ est le volume du capillaire du siège d'injection, V_{filtre} est le volume des capillaires qui relie le filtre en ligne au reste du système, ce filtre étant placé entre la vanne d'injection et le capillaire de transfert, $V_{\text{transfert}}$ est le volume du capillaire qui relie l'injecteur au canal d'enrichissement de la puce, et x est un facteur qui définit le nombre de volumes morts (V_0) utilisés pour transférer l'échantillon. Les capillaires utilisés ont les dimensions suivantes :

- $V_{\text{siège}} = 1,178 \mu\text{L}$ (Capillaire de siège $100 \mu\text{m} \times 150 \text{mm}$)
 - $V_{\text{filtre}} = 0,3 \mu\text{L}$
 - $V_{\text{transfert}} = 0,515 \mu\text{L}$ (Capillaire de transfert $25 \mu\text{m} \times 1050 \text{mm}$)
- V_0 est donc égal à : $1,178 + 0,3 + 0,515 = 1,993 \mu\text{L}$

Finalement, le calcul automatique du temps de chargement se fait avec la formule suivante :

$$t_{(\text{chargement})} = (V_{\text{flush}} + V_{\text{injection}}) / \text{débit pompe de chargement}$$

Le débit de la pompe de chargement est défini dans la méthode. Le volume de transfert permet donc non seulement le chargement de l'échantillon de la boucle d'injection vers le canal d'enrichissement mais aussi une étape de lavage si $x > 1$. Par conséquent, dans la position d'enrichissement il est possible de faire les étapes de chargement de l'échantillon et de lavage. Par la suite, l'élution se fait par la phase mobile en basculant la vanne dans la position analyse (Figure II- 3(B)). Comme dans une procédure SPE en ligne classique, il est nécessaire de définir plusieurs paramètres de la méthode sur puce pour s'assurer du transfert approprié des analytes vers la colonne de séparation. Cela implique aussi dans un premier temps d'optimiser les conditions de détection.

II.1.2 Optimisation des paramètres de la détection par spectrométrie de masse

II.1.2.1 Présentation des analyseurs utilisés

Avant de travailler sur le développement de la méthode d'analyse, les paramètres propres à la détection de masse ont été définis. L'ionisation se fait ici par nanoélectrospray. Ce type d'ionisation permet l'analyse de composés organiques de poids moléculaires assez variés et plutôt polaires, elle est donc bien adaptée à son couplage avec la LC en mode phase inverse. La puce permet la formation d'un spray car une tension peut être appliquée entre le capillaire d'entrée du spectromètre de masse et l'aiguille de la puce qui est métallisée. Cette tension est appelée tension de capillaire. Avec le système utilisé, il n'est pas nécessaire d'utiliser un gaz nébulisant car les débits de phase mobile sont assez faibles (0,2 à 0,6 nL.min⁻¹). Concernant la tension de capillaire, elle dépend principalement de deux paramètres : le temps d'utilisation de la puce (plus elle est usée, plus la tension de capillaire appliquée doit être élevée) et de la quantité de solvant organique dans la phase mobile (si cette quantité augmente il est nécessaire aussi d'augmenter la tension). La tension de capillaire utilisée pour les différentes puces étudiées a été fixée à 1750 V car cette valeur permet la formation du spray dans les conditions de phase mobile utilisées.

Deux analyseurs ont été utilisés dans le cadre de ce travail. Les premiers développements ont été effectués avec une trappe ionique (1100 LC/MSD Trap SL, Agilent), notamment lors de l'étude portant sur la puce de faible capacité (40 nL), et le développement de la méthode d'analyse avec la puce de très grande capacité (500 nL). Pour la suite du travail qui a concerné principalement l'élimination des effets de mémoire, l'étude menée avec la puce 160 nL, l'étude des performances de la puce de 500 nL, les développements en LC-MS

conventionnelle et l'analyse d'échantillons biologiques, un triple quadripôle (6410 TripleQuad LC/MS, Agilent), acquis au cours de ce travail, a été utilisé. L'interface « chip cube » peut donc être couplée à ces deux types d'analyseurs. L'ionisation se faisant par nanoélectrospray, et la cocaïne et ses métabolites étant des molécules basiques, les ions générés sont des ions positifs de type $[M + H]^+$. Le gaz séchant utilisé est l'azote dont la température et le débit ont été fixés à 300 °C et 4 L.min⁻¹ respectivement.

II.1.2.2 Optimisation du signal en trappe d'ions

La trappe ionique a été utilisée uniquement en mode de balayage (« scan »). En effet, avec une trappe ionique il est possible de réaliser des fragmentations, mais l'objectif final étant l'utilisation d'un triple quadripôle, ce mode simple d'utilisation et permettant d'obtenir une sensibilité suffisante, a été choisi pour ces premiers essais. Il a donc été nécessaire d'optimiser les paramètres de la trappe pour détecter la cocaïne et la BZE. L'intervalle de masses balayé était de $m/z = 100$ à $m/z = 2200$, avec un contrôle de charge d'ions de 30000 et un temps d'accumulation des ions dans la trappe de 300 ms. Dans ces conditions, les ions détectés pour la cocaïne et la BZE sont les ions parents sous forme $[M + H]^+$, ce qui correspond à des rapports m/z de 304,1 pour la cocaïne et de 290,1 pour la BZE, l'EME n'ayant pas été étudiée avec cet analyseur. L'optimisation des différents paramètres de la trappe pour ces deux molécules a été réalisée par infusion de solutions 1 µg.mL⁻¹ de chacune des molécules. Les paramètres obtenus ainsi que la procédure d'optimisation sont reportés en annexe 1.

II.1.2.3 Optimisation du signal pour l'analyseur triple quadripôle

Le mode de détection utilisé pour le triple quadripôle est celui nommé « Multiple Reaction Monitoring » avec la sélection d'un ion fils particulier provenant d'un ion parent précis. Pour la cocaïne et ses métabolites les transitions MRM étudiées sont celles qui sont utilisées pour la quantification dans diverses méthodes d'analyse par spectrométrie de masse [66], il s'agit des transitions MRM suivantes :

Cocaïne : $m/z = 304 \rightarrow m/z = 182$

BZE : $m/z = 290 \rightarrow m/z = 168$

EME : $m/z = 200 \rightarrow m/z = 182$

La plupart des paramètres du spectromètre de masse sont fixés lors de l'étalonnage de l'instrument, mais la tension du cône, ainsi que l'énergie de collision doivent être optimisées. Pour ce faire, on utilise le logiciel « Optimizer » qui permet avec cinq injections courtes l'obtention de la tension du cône pour focaliser l'ion parent, la détermination des ions produits

les plus abondants, et l'énergie de collision nécessaire pour leur obtention. Pour fixer ces paramètres de détection de la cocaïne et de ses deux métabolites, une méthode d'analyse en LC-MS conventionnelle très courte a été utilisée. Une colonne de phase inverse (Zorbax SB C18 3,5 μm , Agilent) de 2,1 mm x 30 mm de dimensions a été utilisée avec pour phase mobile une solution composée de 75 % de tampon formate d'ammonium 5 mM pH = 3, et 25 % MeOH. Le débit a été fixé à 0,2 mL.min⁻¹ et des injections de 5 μL ont été effectuées. Lors de la première injection, la tension du cône est balayée avec des intervalles assez larges pour déterminer la valeur pour laquelle l'intensité de l'ion parent est la plus élevée ; ensuite, pour la deuxième injection, l'intervalle de balayage de la tension de cône est réduite pour avoir une valeur optimisée de la tension du cône plus précise. Par la suite, lors de la troisième injection, la tension du cône est fixée à sa valeur optimale et un balayage grossier de l'énergie de collision est réalisé. À cette étape sont obtenus divers ions fils avec des abondances plus ou moins importantes. Lors de la quatrième injection, les ions fils les plus abondants sont testés avec un balayage grossier des énergies de collision. Finalement, lors de la cinquième injection, l'énergie de collision est balayée avec un intervalle fin afin d'obtenir des signaux optimaux pour les ions fils. Les valeurs ainsi obtenues sont présentées sur le Tableau II- 2.

Composé	Ion parent [M+H] ⁺ (m/z)	Ion fils (m/z)	Tension du cône (V)	Energie de collision (V)
Cocaïne	304,1	182,1	110	16
Benzoylécgonine	290,1	168	115	16
Ecgonine méthylester	200,1	182,2	90	16

Tableau II- 2 : Paramètres de masse optimisés pour le triple quadripôle.

II.2 Développement de la méthode d'analyse

II.2.1 Développement de la méthode de séparation avec la trappe ionique

II.2.1.1 Mise au point des conditions de séparation

La phase stationnaire qui se trouve dans les canaux d'enrichissement et de séparation de la puce est une silice greffée C18. La séparation est donc basée sur une chromatographie à polarité inversée par un mécanisme basé sur l'établissement d'interactions de type hydrophobes. Il n'y a donc pas de problèmes de compatibilité entre les phases de ces deux canaux [94]. La phase mobile utilisée pour la séparation doit être adaptée à la fois à l'élution des composés sur le support SPE présent dans la zone d'enrichissement et à leur séparation

tout en garantissant une bonne ionisation au niveau de la source électrospray. Un transfert optimal implique l'utilisation d'un montage où l'élution se fait en « backflush ». La configuration au niveau de la vanne de la « chip cube interface » était déjà adaptée pour se trouver en mode « backflush » prévenant ainsi une réduction de l'efficacité de la séparation chromatographique. Les mélanges les plus couramment utilisés pour l'analyse en LC-MS des molécules étudiées sont de l'eau acidifiée avec de l'acide formique, ou des tampons formate d'ammonium ou acétate d'ammonium en association avec de l'acétonitrile (MeCN) ou du méthanol (MeOH), ces phases mobiles permettent une ionisation correcte en électrospray [13, 37].

Les premiers essais ont été réalisés sur la puce simple (40 nL) avec un échantillon aqueux de cocaïne ($0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) et de BZE ($0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) contenant 2 % de MeCN (provenant des solutions mères). Le volume d'injection a été initialement fixé à $1 \mu\text{L}$ et le volume de transfert (V_{flush}) à $5 \mu\text{L}$ avec une solution de transfert 100 % aqueuse. La phase mobile testée était constituée de tampon formate d'ammonium 5 mM à $\text{pH} = 3,5$ et de MeCN. La séparation a été réalisée avec un gradient à $0,3 \mu\text{L.min}^{-1}$ avec initialement 10 % de MeCN pendant une minute, puis un passage de 10 % à 30% de MeCN en 6 minutes et un reconditionnement à 10 % de MeCN en 3 minutes. Dans ces conditions, les temps de rétention de la cocaïne et de la BZE sont de 1,7 minutes et 5,3 minutes respectivement. Les LDQ de cette méthode ont alors été déterminées par extrapolation grâce aux valeurs de signal sur bruit (S/B) obtenues pour une injection d'une solution à 25 ng.mL^{-1} , les LDQ correspondant à $\text{S/B} = 10$ ainsi obtenues sont de 17 ng.mL^{-1} pour la cocaïne et 16 ng.mL^{-1} pour la BZE. Les chromatogrammes correspondant aux courants ioniques de la cocaïne et la BZE de la solution à 25 ng.mL^{-1} de cocaïne et de BZE sont présentés sur la Figure II- 4.

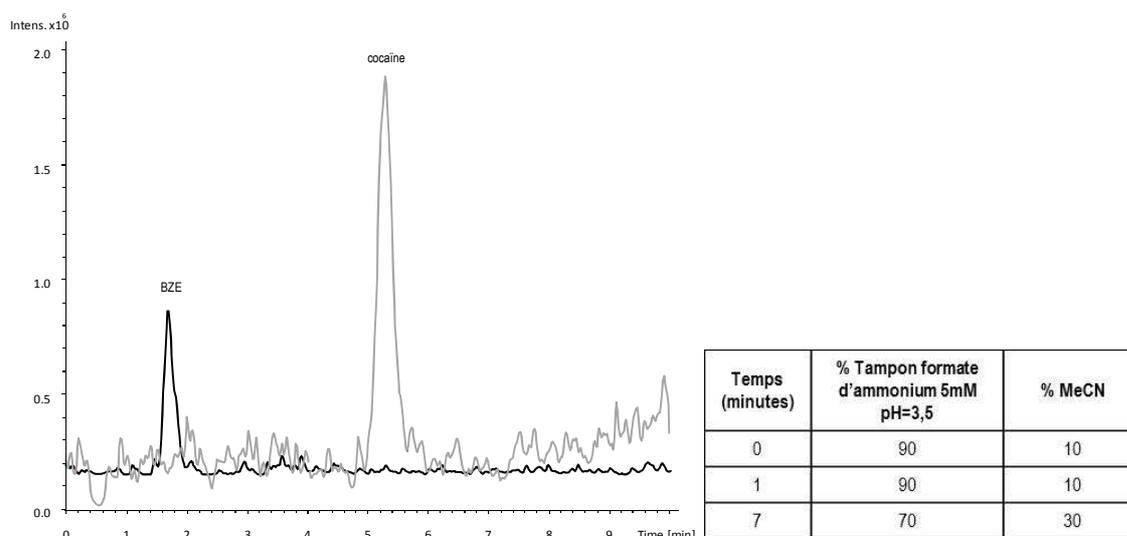


Figure II- 4 : Chromatogrammes LC-MS (trappe d'ions) correspondant aux courants ioniques de la cocaïne à $m/z = 304,1$ et de la BZE à $m/z = 290,1$ pour une injection de $1 \mu\text{L}$ d'une solution aqueuse de cocaïne et BZE à 25 ng.mL^{-1} avec 2 % MeCN. Puce de 40 nL de capacité. Débit = $0,3 \mu\text{L.min}^{-1}$, gradient sur le tableau et en annexe 2, méthode 1.

Les LDQ obtenues sont assez élevées, considérant que les seuils décisionnels de confirmation dans les matrices biologiques sont très bas. Par exemple, pour le sang, la confirmation de la présence de la cocaïne se fait à un seuil de positivité 10 ng.mL^{-1} . Une injection de $2 \mu\text{L}$ au lieu de $1 \mu\text{L}$ a donc été testée mais il a été observé que le signal pour la BZE était plus faible que ce qui était attendu. Ceci peut s'expliquer par le fait que la BZE doit certainement atteindre son volume de fin de fixation lors de l'injection de $2 \mu\text{L}$ malgré l'utilisation d'eau pure pour la préparation et le transfert de l'échantillon. À ce stade de l'étude, l'objectif n'était pas forcément d'augmenter la sensibilité qui devait être obtenue par l'utilisation du triple quadripôle de dernière génération. Néanmoins, l'utilisation de plus grands volumes d'échantillons et surtout de solution de transfert pour assurer un lavage efficace du support après injection de l'échantillon biologique a dû être envisagée. Une puce de plus grande capacité, à savoir présentant un volume de phase plus important dans la zone d'enrichissement a alors été étudiée.

II.2.1.2 Changement de capacité de la puce

Une puce de très grande capacité (500 nL) et remplie d'une phase stationnaire de 80\AA et donc mieux adaptée à la rétention de petites molécules a été étudiée. La solution de transfert a été fixée à 10 % de MeCN et 90 % d'eau pour pouvoir simuler une étape de lavage de la pré-colonne avant le transfert des analytes dans le canal de séparation. Le gradient utilisé précédemment pour la puce simple a été modifié de façon à avoir de faibles temps de rétention avec cette nouvelle puce possédant un canal de séparation trois fois plus long. Ainsi, le nouveau gradient commence à 30 % MeCN et augmente jusqu'à 50 % MeCN en 5 minutes pour rester à 50 % MeCN pendant 4 minutes. Le débit de phase mobile a été augmenté à $0,4 \mu\text{L.min}^{-1}$, un spray plus stable ayant été obtenu dans ces conditions. Dans ces conditions, les temps de rétention de la cocaïne et de la BZE sont alors respectivement de 2,5 minutes et 3,1 minutes. Les chromatogrammes correspondant à une injection de $1 \mu\text{L}$ de cocaïne et BZE à 100 ng.mL^{-1} en eau à 2 % de MeCN sont présentés sur la Figure II- 5 (a).

Le signal de la BZE est plus important que celui de la cocaïne, ce qui n'était pas le cas avec la puce simple. Ceci veut dire que l'augmentation de la capacité de la puce a été efficace pour améliorer la rétention de la BZE dans la zone d'enrichissement. Cependant, le pic de la cocaïne est assez petit en comparaison à celui de la BZE et le bruit de fond est assez important. Un changement de la phase mobile a donc été envisagé pour favoriser l'ionisation de la cocaïne. Des LDQ ont été estimées avec les pics obtenus pour cette concentration de 100 ng.mL^{-1} , les valeurs de LDQ extrapolées pour un rapport S/B de 10 sont de 15 ng.mL^{-1} pour la cocaïne et de $2,1 \text{ ng.mL}^{-1}$ pour la BZE.

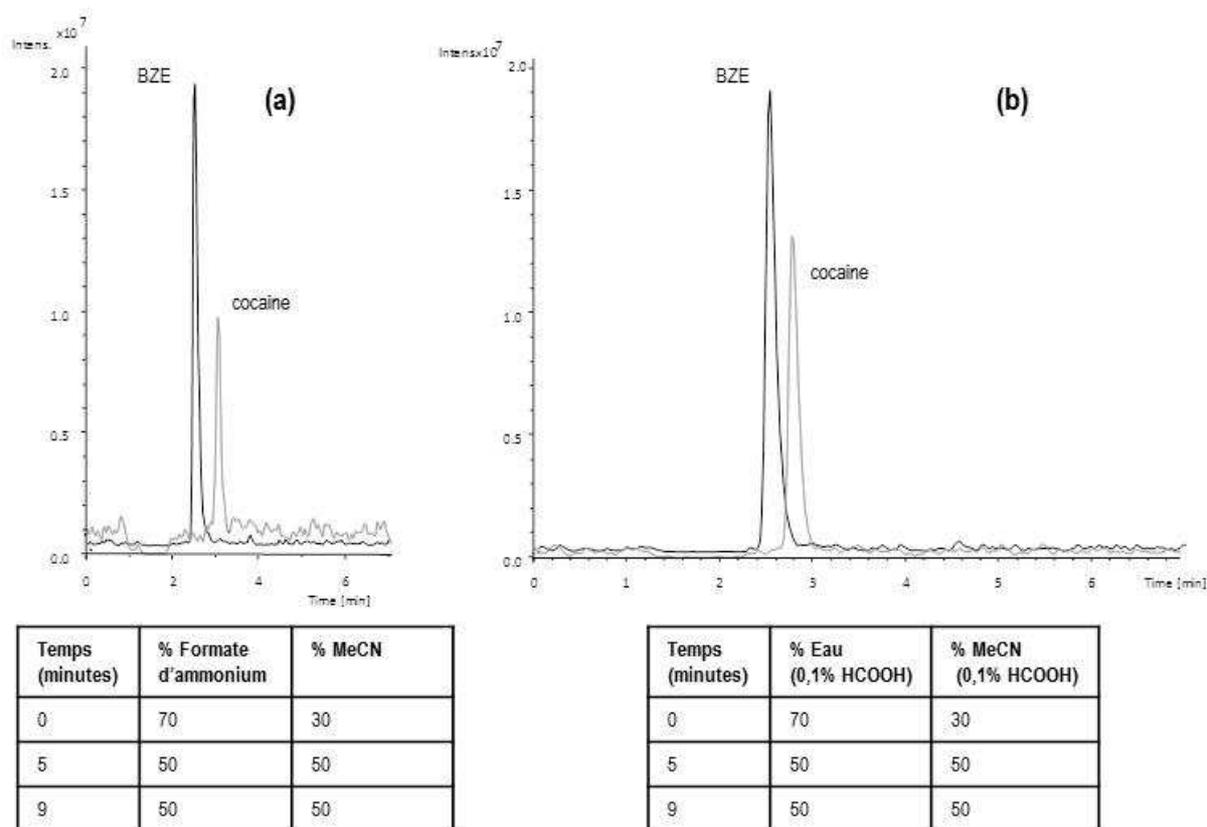


Figure II- 5 : Chromatogrammes LC-MS correspondant aux courants ioniques de la cocaïne à $m/z = 304$, et de la BZE à $m/z = 290,1$ pour une injection de $1 \mu\text{L}$ d'une solution aqueuse de cocaïne et BZE à 100 ng.mL^{-1} avec 2 % MeCN, avec une gradient composé d'un tampon formate d'ammonium 5 mM pH = 3,5 et MeCN (a), ou d'un mélange d'eau et MeCN tous deux avec 0,1 % d'acide formique (b). Puce capacité = 500 nL. MS = trappe ionique. Débit = $0,4 \mu\text{L.min}^{-1}$, gradient décrit sur les tableaux et en annexe 2 méthodes 2 (a) et 3 (b).

La phase mobile a donc été modifiée pour un mélange d'eau et MeCN contenant tous les deux 0,1 % d'acide formique. Les chromatogrammes correspondant à une injection de $1 \mu\text{L}$ d'une solution de cocaïne et BZE à 100 ng.mL^{-1} en eau à 2 % de MeCN sont présentés dans la Figure II- 5 (b). Les temps de rétention pour la cocaïne et la BZE sont un peu plus courts qu'avec la méthode précédente, probablement par le changement d'acidité de la phase mobile. De toute évidence, le pic de cocaïne est plus intense que lors de l'utilisation du formate d'ammonium (Figure II- 5 (a)), et le bruit correspondant est plus faible. La cocaïne doit donc avoir une moins bonne ionisation en présence des ions ammonium. Des LDQ ont aussi été obtenues pour cette méthode pour un rapport S/B de 10, et les valeurs obtenues pour la cocaïne et la BZE sont de $6,1 \text{ ng.mL}^{-1}$ et de $2,7 \text{ ng.mL}^{-1}$ respectivement. Ce résultat confirme l'apport de cette nouvelle phase mobile pour une meilleure ionisation de la cocaïne puisque la méthode ainsi obtenue est plus sensible pour cette molécule. Le choix pour la suite du développement de la méthode s'est donc porté vers une phase mobile contenant de l'eau et du MeCN acidifiés par 0,1 % d'acide formique.

Cependant, lors de l'observation des chromatogrammes obtenus et du spray sur l'écran intégré au système, il apparaît un temps assez long, entre 1,2 minutes et environ 2,5 minutes, pendant

lequel le spray est instable, et donc le signal semble nul. Cette perte de signal correspond au passage dans le détecteur de la solution qui se trouve dans la pré-colonne et qui est amenée par la phase mobile, donc la solution de transfert. Cette solution n'est pas acidifiée et ne permet donc pas au spray de se former comme c'est le cas pour la phase mobile. Avec la puce de faible capacité, ce phénomène n'était pas vraiment observé car le volume de la pré-colonne (40 nL) était moins important que celui de la colonne de séparation, et donc le passage du front de solvant ne durait que quelques secondes. Cependant, dans le cas de la puce de très haute capacité, le volume de la pré-colonne est plus important et devient comparable à celui du canal de séparation. Des incohérences ont été observées quand aux données fournies par Agilent sur les volumes du canal de séparation, ces incohérences sont discutées en annexe 3. Dans cette annexe sont estimés les volumes morts des canaux de séparation et d'enrichissement des différentes puces utilisées, et on constate que pour la puce de 500 nL de capacité, ces volumes sont assez proches, ce qui expliquerait l'élargissement des pics observé. D'ailleurs, considérant le débit de $0,4 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ et le volume de la pré-colonne de 500 nL, le front du solvant doit théoriquement mettre un peu plus d'une minute à sortir, ce qui est le cas pour l'analyse présentée sur la Figure II- 5 (b). Des études réalisées pour essayer de comprendre ce phénomène ont montré que lors de l'ajout d'acide dans la solution de transfert, la perte de signal observée est moins importante et le spray ne disparaît plus complètement, ce qui confirme que la perte de spray observée est bien liée à la nature du solvant de transfert contenu dans la pré-colonne. Pour utiliser la solution de transfert en parallèle comme une solution de lavage de la pré-colonne, il serait nécessaire qu'elle soit moins éluante que la phase mobile ; or, le phénomène d'instabilité du spray est lié à cette différence entre la phase mobile et la solution de transfert, donc il n'est pas possible d'éliminer complètement ce problème de perte de spray. Pour contourner ce problème de perte de signal, le gradient a été retardé par la suite de façon à éloigner les pics de cocaïne et de BZE de cette gamme de temps où le spray est instable.

II.2.1.3 Performances de la méthode utilisant la puce de très grande capacité

La méthode de séparation choisie finalement pour l'analyse de la cocaïne et de la BZE avec la puce de très grande capacité est basée sur l'utilisation d'un gradient d'eau et MeCN, tous deux contenant 0,1 % d'acide formique. Le gradient appliqué à $0,4 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, commence à 15 % MeCN et augmente jusqu'à 50 % MeCN en 7 minutes, puis il augmente à 80 % MeCN en 1 minute et reste constant pendant 2 minutes pour bien nettoyer la phase stationnaire en prévision de l'injection d'échantillons biologiques. Le reconditionnement se fait en 5 minutes pour un temps total pour la méthode de 15 minutes. Dans ces conditions, les temps de rétention de la cocaïne et de la BZE sont respectivement de 5,2 minutes et 3,7 minutes. Les LDQ obtenues avec cette méthode sont de $13 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ pour la cocaïne et de $7 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ pour la

BZE. Il y a eu donc une légère amélioration par rapport à ce qui avait été obtenu pour la puce simple ($LDQ = 16 \text{ ng.mL}^{-1}$), notamment dans le cas de la BZE qui est mieux retenue.

Ces résultats préliminaires obtenus avec la trappe ionique avaient pour objectif de prendre en main le système analytique sur puce et de pouvoir développer une méthode d'analyse. Les résultats sont encourageants, mais il convient d'améliorer les performances, notamment en termes de sensibilité, en jouant plus sur la partie de la méthode correspondant à l'étape d'enrichissement.

II.2.2 Essais préliminaires d'optimisation de la SPE en ligne

Dans la partie précédente, un gradient a été optimisé pour la séparation de la cocaïne et la BZE avec un montage en mode « backflush », tout en limitant l'influence du gradient sur le spray. Pour la suite, la composition et le volume des solvants utilisés lors des différentes étapes de l'extraction vont être étudiés.

II.2.2.1 Choix du volume injecté

Si la sensibilité devait être plus importante, il serait nécessaire d'augmenter le volume injecté. De plus, comme l'injection de fluides biologiques est envisagée à terme, $5 \mu\text{L}$ d'une solution de transfert de 10 % MeCN dans l'eau a été utilisée. Ainsi, des volumes d'injection compris entre $0,5 \mu\text{L}$ et $8 \mu\text{L}$ ont été utilisés. La solution injectée était constituée de cocaïne et BZE à 100ng.mL^{-1} et contenait 2 % de MeCN. Les résultats de cette étude obtenus pour la BZE et la cocaïne sont présentés sur la Figure II- 6.

Pour la cocaïne (Figure II- 6 (a)), le signal obtenu en fonction du volume injecté est linéaire et donc la réponse est proportionnelle au volume injecté. Mais pour la BZE (Figure II- 6 (b)), à partir de $3 \mu\text{L}$ injectés, les signaux obtenus ne sont plus proportionnels au volume injecté, ce qui implique que le volume de fin de fixation pour la BZE est atteint et donc une partie de cette molécule est perdue lors du chargement de la pré-colonne. Le volume optimal qu'il semble être alors possible d'injecter dans les conditions testées est de $2 \mu\text{L}$ pour un échantillon d'eau pure contenant 2 % de MeCN.

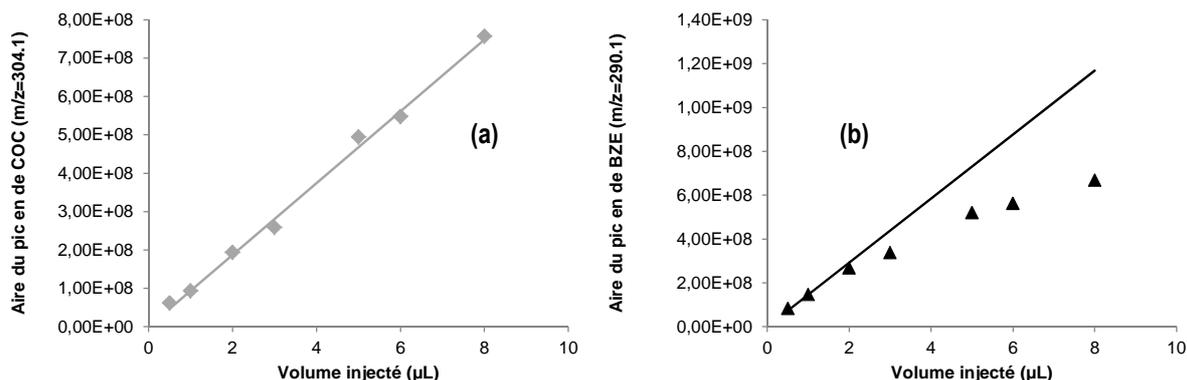


Figure II- 6 : Variations de l'aire des pics de cocaïne (a) et de BZE (b) en fonction du volume injecté d'une solution aqueuse contenant 2 % MeCN et dopée à 100 ng.mL^{-1} avec de la cocaïne et de la BZE. Puce de 500 nL, V_{flush} de 5 μL appliqué à $4 \mu\text{L.min}^{-1}$ avec une solution à 10 % de MeCN et 90 % d'eau. Les droites figurant sur les graphiques correspondent aux valeurs des aires de pic qui devraient théoriquement être retrouvées en prenant comme référence l'aire obtenue pour l'injection de 1 μL d'échantillon. MS = trappe d'ions. Méthode complète en annexe 2, méthode 3.

II.2.2.2 Contrôle des phénomènes d'adsorption

Le volume d'injection fixé précédemment a été obtenu avec l'utilisation d'un transfert de 5 μL (V_{flush}) utilisant 10 % MeCN dans la solution de transfert. Comme précisé précédemment, ce pourcentage, bien qu'il puisse nuire à la rétention de la BZE dans la zone d'enrichissement, a été choisi pour générer un lavage efficace du support à terme lors de l'application d'échantillons biologiques mais aussi pour contrecarrer d'éventuels risques d'adsorption. En effet, dans le système d'étude, de longs capillaires de connexion en PEEK sont utilisés pour permettre le transfert de l'échantillon de l'injecteur jusqu'au canal d'enrichissement de la puce. De plus, le système est contrôlé par deux vannes six voies, l'une dans l'injecteur et l'autre dans l'interface « chip cube ». Les surfaces de ces capillaires et des canaux des vannes six voies sont susceptibles d'adsorber des analytes. En effet, ces surfaces sont hydrophobes et attirent des composés peu polaires particulièrement s'ils se trouvent dans une solution aqueuse pure. Par conséquent, en plus de l'ajout de MeCN dans la solution de transfert, il est apparu judicieux d'ajouter un faible pourcentage de solvant organique dans l'échantillon pour contrer ces phénomènes d'adsorption. Cependant, l'ajout de solvant organique dans l'échantillon augmente sa force éluante pour la phase d'enrichissement constituée d'un adsorbant apolaire entraînant ainsi une perte des analytes les plus polaires pendant la percolation à travers le canal d'enrichissement. Aussi, la rétention de la cocaïne et de la BZE après injection de solutions aqueuses contenant des quantités croissantes de MeCN (de 2 % à 20 %) a été étudiée. Le volume d'injection pour cette étude est maintenu à 2 μL , le débit de la pompe de chargement est de $4 \mu\text{L.min}^{-1}$, et la puce utilisée est la puce de très grande capacité. Pour s'assurer du transfert de l'échantillon vers le canal d'enrichissement, le

V_{flush} est maintenu à 5 μL avec une solution de transfert constitué d'un mélange eau / MeCN 90 / 10 (v / v). Compte tenu de la fluctuation du signal en masse d'un jour à l'autre imposant de réaliser des droites d'étalonnage fréquemment, des aires de pic normalisées ont été obtenues en considérant la valeur de l'aire de pic la plus élevée égale à 100 % ; pour cette étude, l'aire la plus élevée est obtenue pour une quantité de 2 % de MeCN dans l'échantillon. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure II- 7.

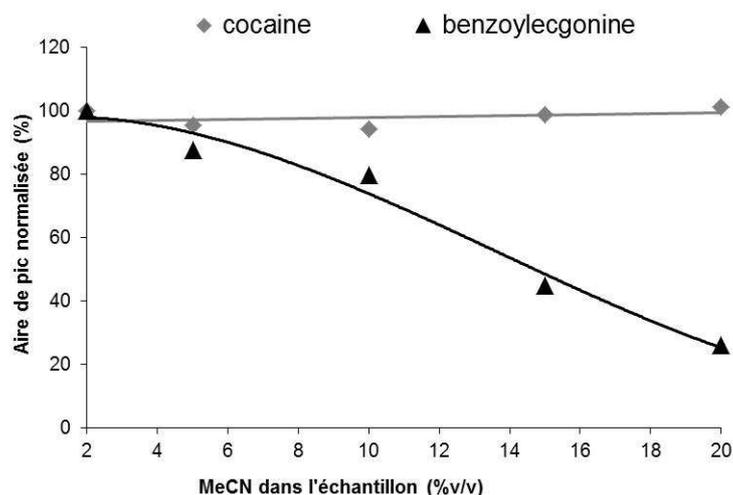


Figure II- 7 : Influence du pourcentage de MeCN dans l'échantillon sur le signal de la cocaïne (◆) et de la BZE (▲) pour une injection de 2 μL d'échantillon contenant 100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ des analytes. Puce de 500 nL, V_{flush} de 5 μL d'une solution de transfert contenant 10 % MeCN et 90 % d'eau. MS = trappe ionique. Méthode complète en annexe 2, méthode 3.

La cocaïne est retenue dans tout l'intervalle de concentration en MeCN étudié, donc de 2 % à 20 % de MeCN. Il semble donc que la cocaïne ($\log P_{\text{oct}} = 2,31$) génère de fortes interactions hydrophobes avec la silice C18 du canal d'enrichissement qui sont suffisantes pour qu'elle soit retenue puisque l'augmentation de la force éluante de la solution injectée n'affecte pas sa rétention même pour 20 % de MeCN dans l'échantillon. Dans le cas de la BZE, une importante diminution de sa rétention est observée à 10 % de MeCN dans l'échantillon. De toute évidence, ce même phénomène est observé pour des quantités plus importantes de MeCN dans l'échantillon : la moitié de la BZE est perdue pour seulement 15 % de MeCN, et 75 % sont perdus pour 20 % de MeCN dans l'échantillon aqueux lors de la percolation. La faible rétention de la BZE dans le canal d'enrichissement s'explique par sa plus grande polarité ($\log P_{\text{oct}} = 1,29$) comparée à la cocaïne. En effet ce métabolite contient une fonction d'acide carboxylique qui augmente sa polarité par rapport à celle de la cocaïne qui a une fonction ester. Ces premiers résultats confirment la nécessité d'optimiser la méthode de préconcentration avant la séparation chromatographique. Pour la suite, un pourcentage de MeCN dans l'échantillon de 2 % a été choisi pour maintenir une rétention importante de la BZE lors de la percolation.

II.2.2.3 Choix du volume de la solution de transfert

Le volume de la solution (V_{flush}) qui transfère l'échantillon de l'injecteur vers le canal d'enrichissement a ensuite été étudié. Celui-ci doit être suffisamment élevé pour assurer le transfert total de l'échantillon dans le canal d'enrichissement. Cette solution de transfert peut aussi, dans un second temps, permettre le lavage du canal d'enrichissement tout en retenant les composés cibles. Ce lavage peut s'avérer utile pour l'analyse d'échantillons complexes tels que l'urine. En effet, la phase stationnaire du canal d'enrichissement étant une silice greffée C18, l'extraction est basée uniquement sur des interactions hydrophobes. Par conséquent, des interférents de même polarité peuvent être co-extraits et peuvent générer des effets de suppression d'ions lors de la détection des analytes d'intérêt [101]. Le volume nécessaire au transfert de l'analyte entre l'injecteur et le canal d'enrichissement a été évalué pour les deux puces, celle de haute capacité (160 nL) et celle de très haute capacité (500 nL). La puce simple (40 nL) n'a plus été testée, d'une part en raison de sa faible capacité, et d'autre part à cause de son usure car elle ne retenait plus du tout les molécules cibles après un certain nombre d'utilisations. Initialement, une solution de transfert contenant 90 % d'eau et 10 % de MeCN a été testée à un débit de $4 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Les résultats obtenus lors de cette étude pour les deux puces testées sont présentés sur la Figure II- 8 sous forme d'aires de pics normalisées.

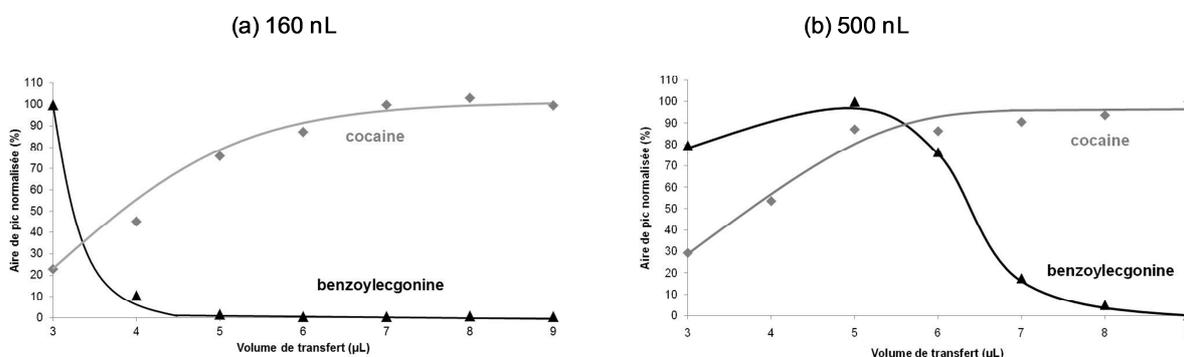


Figure II- 8 : Etude de la réponse de la cocaïne (♦) et de la BZE (▲) en fonction du volume de transfert V_{flush} d'une solution de $\text{H}_2\text{O} / \text{MeCN}$ 90/10 (v/v) lors de l'utilisation d'une puce de 160 nL (a) ou de 500 nL (b) de capacité pour l'injection de $2 \mu\text{L}$ d'un échantillon d'eau à 2 % de MeCN dopée avec $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de chaque analyte. Méthode complète en annexe 2, méthode 3.

L'intervalle de volume de transfert pour la puce de 160 nL de capacité étudié va de $3 \mu\text{L}$ à $9 \mu\text{L}$ (Figure II- 8(a)). On peut observer que pour la cocaïne, un volume minimum est nécessaire pour assurer le transfert de la totalité de l'échantillon dans le canal d'enrichissement. D'après le calcul fait dans la partie II.2.1 de ce chapitre, le volume mort est égal à $2 \mu\text{L}$. Le fournisseur du système conseille l'utilisation d'un facteur x (nombre de volumes morts utilisés pour transférer l'échantillon) entre 2 et 6, ce qui correspond à un V_{flush} entre $4 \mu\text{L}$ et $12 \mu\text{L}$. Le graphique correspondant à la cocaïne sur la Figure II- 8(a) montre que

le volume minimum pour un transfert total de la cocaïne se trouve en effet entre 5 μL et 6 μL . Le volume de transfert peut être augmenté jusqu'à 9 μL sans que la cocaïne ait atteint son volume de fin de fixation. Ces résultats sont cohérents avec ce qui avait déjà été observé lors de l'ajout de MeCN dans l'échantillon : la cocaïne présente une forte rétention par interactions hydrophobes sur le support C18. Cependant, pour la BZE il n'y a plus de pics observés à partir de $V_{\text{flush}} = 6 \mu\text{L}$. Considérant qu'un minimum de 5 μL de volume de transfert soit nécessaire pour pousser la totalité de l'échantillon dans le canal d'enrichissement, la faible aire de pic obtenue pour le métabolite à $V_{\text{flush}} > 3 \mu\text{L}$ peut s'expliquer par l'atteinte du volume de fin de fixation de la BZE lors du transfert dans le canal d'enrichissement dans ces conditions.

Afin d'augmenter le volume de fin de fixation, la puce de 500 nL a été étudiée dans les mêmes conditions (Figure II- 8(b)). Le comportement de la cocaïne est semblable à celui obtenu pour la puce de 160 nL : un volume minimum de 5 μL est nécessaire pour obtenir un bon rendement pour la cocaïne et sa rétention reste élevée jusqu'à 9 μL de volume de transfert. Parallèlement, comme attendu, l'augmentation de la quantité d'adsorbant dans le canal d'enrichissement, permet d'augmenter le volume de fin de fixation de la BZE et un important signal peut être atteint pour $V_{\text{flush}} = 5 \mu\text{L}$. Lors de l'analyse d'échantillons très complexes, un volume de transfert plus élevé pourrait améliorer le lavage de l'échantillon. Le volume de transfert pourrait atteindre 6 μL car pour la BZE le rendement est encore de 60 % par rapport aux meilleures conditions de transfert avec $V_{\text{flush}} = 5 \mu\text{L}$.

II.2.2.4 Effet de la force éluante de la solution de transfert

Une autre stratégie, pour augmenter le volume de fin de fixation, serait de diminuer la force éluante de la solution de transfert. Ainsi, une solution de transfert avec 5 % de MeCN au lieu de 10 % a été testée. Les résultats obtenus par les puces de 160 nL et 500 nL sont présentés dans la Figure II- 9.

Dans le cas de la puce de 160 nL (Figure II- 9(a)), la rétention de la BZE reste faible. Le rendement chute à 70 % pour un volume de transfert de 4 μL , et pour $V_{\text{flush}} = 5 \mu\text{L}$ le rendement n'est plus que de 15 %. De plus, un volume de transfert minimum de 9 μL est nécessaire pour l'obtention d'un rendement élevé de la cocaïne. Il n'y a donc pas de compromis possible pour l'analyse de ces deux molécules sur la puce de 160 nL de capacité. Considérant que les dimensions des capillaires entre l'injecteur et la zone d'enrichissement sont fixes, et qu'avec la solution de transfert à 10 % de MeCN le transfert était effectué avec environ 6 μL de V_{flush} , il semblerait que la cocaïne soit adsorbée par les capillaires avec cette solution de transfert contenant moins de MeCN. Dans la partie suivante seront étudiés plus en détail ces effets de mémoire observés pour la cocaïne.

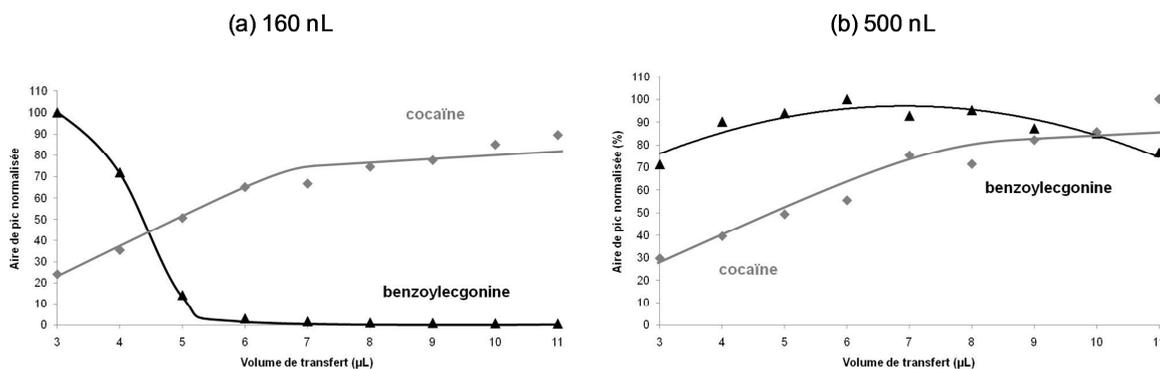


Figure II- 9 : Etude de la réponse de la cocaïne (◆) et de la BZE (▲) en fonction du volume de transfert V_{flush} d'une solution de $H_2O / MeCN$ 95/5 (v/v) lors de l'utilisation d'une puce de 160 nL (a) ou de 500 nL (b) de capacité pour l'injection de 2 μL d'un échantillon d'eau à 2 % de MeCN dopée avec 100 ng.mL^{-1} de chaque analyte. Méthode complète en annexe 2, méthode 3.

Dans le cas de la puce de 500 nL de capacité (Figure II- 9(b)) il est possible d'utiliser des volumes de transfert plus importants tout en retenant la BZE. Comme prévu, le volume de fin de fixation de la BZE a augmenté et atteint 9 μL dans ces conditions de transfert moins éluantes. La cocaïne présente elle aussi un bon rendement pour $V_{flush} = 9 \mu L$. Cependant, il serait judicieux de tenir en compte les effets de mémoire observés pour la cocaïne, car les injections effectuées lors de cette étude ont été réalisées les unes après les autres, ce qui pourrait expliquer qu'un plateau ne soit pas atteint pour la cocaïne puisque les signaux pourraient être augmentés d'une injection à la suivante. Finalement, c'est la puce avec une capacité de 500 nL qui convient pour l'analyse en parallèle de la cocaïne et la BZE, et les volumes optimaux de transfert sont de 5 μL et 9 μL pour les puces de 160 nL et 500 nL de capacité respectivement.

Pour la puce de 500 nL de capacité, le volume minimum pour avoir un rendement élevé pour la cocaïne varie en fonction de la composition de la solution de transfert. En effet, pour une solution à 10 % de MeCN (Figure II- 8(b)) il faut au moins 5 μL de solution de transfert, tandis que pour une solution à 5 % de MeCN (Figure II- 9(b)) il en faut au moins 9 μL . Il semble alors évident que la cocaïne présente une importante adsorption sur les capillaires et les canaux de transfert. Le choix d'une solution de transfert à 10 % de MeCN permet de réduire ces risques d'adsorption, donc pour la suite le transfert se fait avec 5 μL d'une solution $H_2O / MeCN$ 90/10 (v/v) à un débit de $4 \mu L \text{ min}^{-1}$.

Dans les conditions de travail fixées pour cette première étude réalisée avec la trappe ionique, les limites de quantification finalement obtenues pour la cocaïne et la BZE sont de 7 ng.mL^{-1} et de 4 ng.mL^{-1} respectivement ($S/B = 10$). Pour la suite du travail, un triple quadripôle sera utilisé, ce qui devrait augmenter fortement la sensibilité de la méthode.

II.3 Développements de la méthode SPE/LC sur puce couplée à un triple quadripôle

II.3.1 Performances de la méthode développée associée à un triple quadripôle

Une méthode d'analyse a été développée avec la trappe ionique dans la première partie de cette étude pour l'analyse de la cocaïne et la BZE sur la puce à très grande capacité. Dans un deuxième temps, les paramètres de l'extraction en ligne ont été fixés pour obtenir des signaux optimisés pour la cocaïne et la BZE en milieu aqueux pur. Les différents paramètres de la méthode ainsi développée sont résumés dans le Tableau II- 3.

Paramètre	Choix
Puce	Puce très grande capacité (500nL)
Composition de la phase mobile	Eau (A) et MeCN (B) acidifiés par 0,1% HCOOH
Gradient	15%B à 50%B en 7 min, 50%B à 80%B en 1 min, 80%B pendant 2 min
Volume injecté	2 μ L
Composition de l'échantillon	Avec 2% de MeCN
V_{flush}	5 μ L
Solution de transfert	90% eau 10% MeCN

Tableau II- 3 : Paramètres fixés pour l'analyse de la cocaïne et la BZE sur puce obtenus avec la trappe ionique.

La méthode ainsi établie a donc été testée avec le nouveau détecteur, c'est-à-dire le triple quadripôle. Dans ces conditions, des droites d'étalonnage ont été obtenues pour les deux molécules avec des coefficients de corrélations supérieurs à 0,999. Les chromatogrammes obtenus pour l'injection d'une solution de cocaïne et BZE à une concentration de 500 pg.mL^{-1} sont présentés en Figure II- 10.

Comme prévu, les LDQ obtenues sont beaucoup plus basses qu'avec la trappe ionique avec des valeurs de 30 pg.mL^{-1} pour la cocaïne et de 5 pg.mL^{-1} pour la BZE ($S/B = 10$), ces valeurs sont 230 fois et 800 fois plus faibles que celle obtenues avec la trappe ionique pour la cocaïne (7 ng.mL^{-1}) et la BZE (4 ng.mL^{-1}) respectivement. En effet le triple quadripôle utilisé a une sensibilité supérieure à celle de la trappe ionique, et en plus le mode MRM permet de diminuer fortement le bruit de fond.

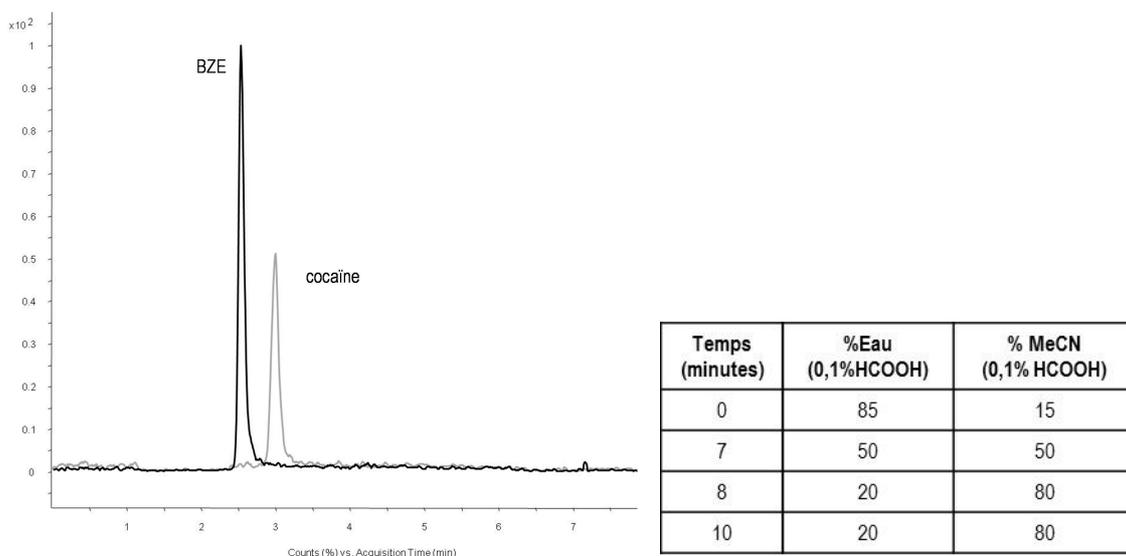


Figure II- 10 : Chromatogrammes LC-MS correspondant aux transitions MRM de la cocaïne et de la BZE pour une injection de 2 μL d'une solution aqueuse de cocaïne et BZE à 500 pg.mL^{-1} avec 2 % de MeCN dans les conditions décrites sur le Tableau II- 3. Débit : 0,4 $\mu\text{L.min}^{-1}$. MS = triple quadripôle. Puce 500 nL. Tableau présentant les conditions du gradient utilisé, mais aussi en annexe 2, méthode 6.

II.3.2 Stabilité du système d'analyse

Malgré ces excellents résultats en termes de sensibilité, la méthode a été testée quelques jours après et les aires de pics obtenues ne correspondaient pas aux aires de pic attendues. Il s'est avéré que l'aiguille de la puce commençait à être assez sale après l'étude des droites d'étalonnage et le spray se formait difficilement. La puce a donc été nettoyée, ce qui a entraîné un changement dans la forme du spray et donc dans les signaux obtenus par la suite. L'importante dépendance de la stabilité du nanospray aux conditions de travail avait déjà été observée lors de l'apparition d'une fuite au niveau de la vanne rotatoire. Il s'avère en effet que l'un des désavantages de la miniaturisation est la difficulté pour détecter une fuite au niveau des différentes connexions. Le système ayant un nombre élevé de connexions extérieures à la puce, il a des risques de présenter des fuites à divers endroits. Lorsqu'une fuite se présente après le diviseur de débit, la tombée de pression peut ne pas être totale et le diviseur de débit peut agir de façon à ce que cette baisse de pression soit compensée par un apport plus important en phase mobile. Dans ces conditions, le débit réel ne correspond pas au débit souhaité et le nanospray devient très instable. Cette instabilité du nanospray est aussi observée lors de l'allumage de la pompe analytique pendant que le débit se stabilise, ou lorsque la tension du capillaire n'est pas correctement sélectionnée. Le problème principal de cette instabilité du nanospray est que les signaux obtenus sont alors très fortement perturbés et dans certains cas ils disparaissent complètement. En plus des fuites et de l'état de l'aiguille de nanoélectrospray, le changement de solvant, l'augmentation du pourcentage de solvant organique, et l'usure de la puce sont aussi des sources potentielles d'instabilité du nanospray.

Considérant ces problèmes de nanospray, des échantillons de contrôle ont dû être analysés à chaque fois que la pompe analytique a été allumée pour ajuster les droites d'étalonnage.

II.3.3 Modification des conditions de séparation

L'utilisation régulière de ces témoins a conduit à la constatation que le signal était vraiment très instable. Considérant la proximité des pics obtenus avec le temps de rétention nulle (Figure II- 10), nous avons envisagé l'hypothèse selon laquelle les signaux pourraient être encore perturbés par l'instabilité du spray déjà constatée au voisinage du temps de rétention nulle. Le gradient a donc été modifié une nouvelle fois pour retarder les pics d'élution de la cocaïne et de la BZE, ce retardement des pics pouvant s'avérer utile pour l'analyse d'échantillons biologiques afin d'éloigner les pics des molécules cibles des interférents polaires présents dans les matrices biologiques. Le nouveau gradient composé d'eau (A) et de MeCN (B) à 0,1 % d'acide formique, commence avec un mode isocratique à 5 % de B pendant 4,5 minutes, puis le %B augmente jusqu'à 80 % en 7 minutes et reste à 80 % de B pendant 2 minutes avant le reconditionnement de la colonne. Les pics correspondant à la cocaïne et à la BZE sont alors suffisamment loin du temps de rétention nulle avec des temps de rétention de 8,3 et 5,7 minutes respectivement. Suite à l'étude des nouvelles droites d'étalonnage, la quantification de la BZE était correcte mais pas celle de la cocaïne. Considérant la possibilité d'avoir des effets de mémoire, un blanc a été injecté juste après une injection d'un échantillon aqueux avec 2 % de MeCN et dopé avec 0,2 ng.mL⁻¹ de cocaïne et BZE. Un pic correspondant à la cocaïne a été observé dans le blanc avec une aire de pic d'environ 20 % du signal obtenu pour l'échantillon dopé. Dans le cas de la BZE, il n'y avait pas de pics présents dans l'échantillon blanc. Ceci s'explique par la différence de polarité des deux molécules puisque la cocaïne est plus hydrophobe que la BZE. La cocaïne peut effectivement s'adsorber à différents endroits de la chaîne analytique et comme le détecteur utilisé est très sensible, tous les rémanents de cocaïne dans le circuit global d'analyse peuvent être détectés. Il est donc apparu nécessaire de développer une méthode qui puisse limiter ces effets de mémoire observés pour la cocaïne. Ce phénomène d'effet de mémoire avait déjà été observé pour la trappe ionique lors de l'étude de la solution de transfert (Figure II- 8 et Figure II- 9). Néanmoins, dans le cas du triple quadripôle, la sensibilité est tellement grande que toute trace de cocaïne adsorbée dans le système peut être détectée par la suite, rendant le problème d'effets de mémoire beaucoup plus important.

II.3.4 Prise en charge des effets de mémoire

La cocaïne peut effectivement s'adsorber à différents endroits de la chaîne analytique. L'adsorption peut avoir lieu au niveau de l'injecteur dans les canaux de la vanne et dans le siège d'injection. Puis, l'échantillon est transféré vers la colonne d'enrichissement par des capillaires de connexion en PEEK qui sont plutôt hydrophobes. La cocaïne peut donc s'y adsorber. Enfin, elle peut aussi s'adsorber dans les canaux de la vanne rotatoire de l'interface « chip cube » avant de se retrouver dans les colonnes d'enrichissement et de séparation. Suite au nettoyage de chaque partie du système analytique, il a été observé que les principales sources d'adsorption de la cocaïne étaient les deux vannes (injecteur et « chip cube »). Par conséquent, pour limiter l'adsorption au niveau de la vanne d'injection, un programme d'injection a été appliqué avec une étape de lavage de l'aiguille d'injection avant son entrée dans le siège d'injection et avec une série de rotations de la vanne d'injection durant l'analyse pour nettoyer ses canaux. En ce qui concerne la vanne rotatoire du « chip cube », le V_{flush} a été augmenté à 6 μL avec la solution à 10 % de MeCN et 90 % d'eau. Cette augmentation du volume de transfert a deux effets : d'une part elle permet de désorber la totalité de la cocaïne des capillaires en plus de bien laver les canaux de la vanne rotatoire, mais d'autre part elle va entraîner une baisse du signal pour la BZE puisqu'elle a une faible rétention dans la pré-colonne (Figure II- 8). Compte tenu de la sensibilité du détecteur, la baisse du signal de BZE est d'environ 30 % (Figure II- 8) et ne doit pas représenter un problème pour la quantification de cette molécule dans des matrices biologiques. Dans ces conditions, les effets de mémoire ont été complètement éliminés pour des concentrations de cocaïne inférieures à 0,3 ng.mL^{-1} , et ils ont été limités à un maximum de 4 % pour des concentrations comprises entre 3 ng.mL^{-1} et 10 ng.mL^{-1} .

II.3.5 Performances de la méthode

Finalement, les performances de cette méthode ont été étudiées. Des droites d'étalonnage ont été obtenues dans une gamme de concentrations allant de 0,1 ng.mL^{-1} à 10 ng.mL^{-1} . Des coefficients de corrélation (R^2) supérieurs à 0,996 ont été obtenus. Les LDD et LDQ ont été déterminées par extrapolation pour des valeurs de S/B de 3 et de 10 respectivement. Les LDD obtenues sont de 14 pg.mL^{-1} et 7 pg.mL^{-1} pour la cocaïne et la BZE respectivement, tandis que les LDQ sont de 31 pg.mL^{-1} pour la cocaïne et de 22 pg.mL^{-1} pour la BZE. Ces LDQ sont suffisamment faibles pour l'analyse d'échantillons biologiques, voire même pour des échantillons biologiques dilués. Un exemple des chromatogrammes obtenus pour cette méthode est présenté en Figure II- 11 pour l'injection d'une solution à 2 % de MeCN contenant 100 pg.mL^{-1} de cocaïne et de BZE. Le retardement des pics de cocaïne et de BZE a conduit à l'obtention de pics dissymétriques. En effet, la phase stationnaire est une silice greffée C18 qui a certainement quelques silanols résiduels, or, la cocaïne et la BZE étant des

amines, elles doivent subir des interactions avec ces groupements silanols, ce qui génère une « traînée » des pics. Des ions ammoniums peuvent être ajoutés à la phase mobile, mais les signaux de la cocaïne et la BZE sont alors réduits fortement. La solution la plus logique serait de changer de phase stationnaire pour une phase adaptée à l'analyse d'amines, mais pour ce type de puce à très grande capacité il n'existe actuellement aucune phase stationnaire de type C18 disponible autre que la phase Zorbax SB.

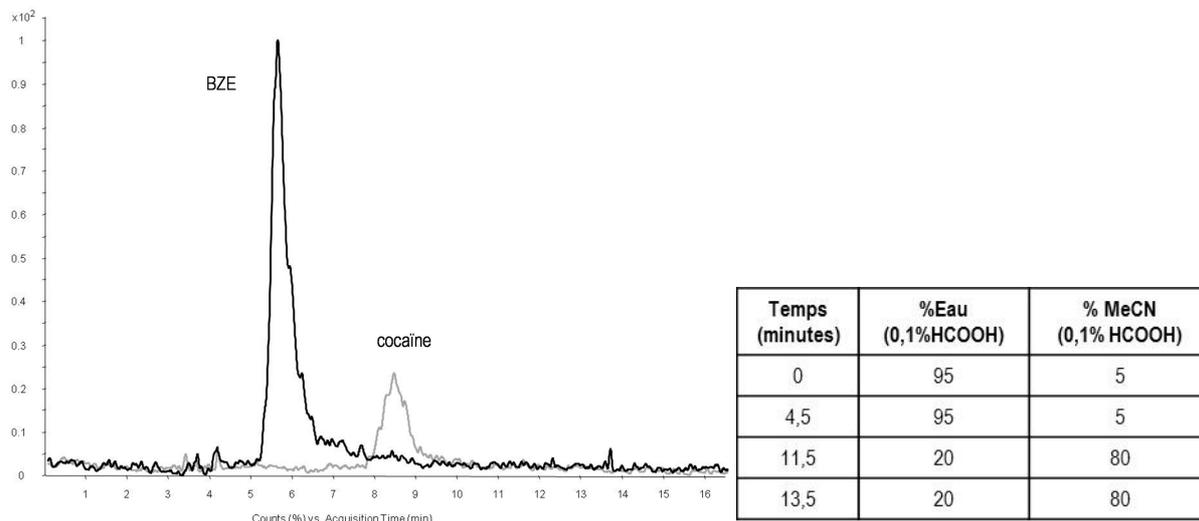


Figure II- 11 : Chromatogrammes LC-MS correspondant aux transitions MRM de la cocaïne et de la BZE pour une injection de 2 μL d'une solution aqueuse de cocaïne et BZE à $100 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ avec 2 % de MeCN après l'adaptation de la méthode pour limiter les effets de mémoire. $V_{\text{flush}} = 6 \text{ }\mu\text{L}$. Débit = $4 \text{ }\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Puce 500 nL. MS = triple quadripôle Gradient décrit sur le tableau et en annexe 2, méthode 7.

II.3.6 Comparaison à la LC-MS conventionnelle

L'analyse de la cocaïne et de la BZE a aussi été réalisée en LC-MS en format conventionnel pour comparer les résultats avec ceux obtenus avec la puce. Pour cette application, le même triple quadripôle a été utilisé avec les mêmes paramètres de détection, seule la source d'ionisation a été remplacée par une source électrospray classique avec un débit de la phase mobile de $0,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Dans ces conditions de débit de phase mobile, un nébuliseur est nécessaire, et la pression utilisée pour cette méthode a été fixée à 20 psi, le débit de gaz séchant a été augmenté à $10 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ et sa température à 350°C . Pour conserver des conditions proches de celles utilisées pour la méthode sur puce, une colonne chromatographique avec des dimensions classiques ($150 \text{ mm} \times 2,1 \text{ mm d.i.}$, $5 \text{ }\mu\text{m}$) et remplie avec la même phase stationnaire que la puce (Zorbax C18) a été utilisée. La phase mobile utilisée en mode isocratique consiste en un mélange $\text{H}_2\text{O}/\text{MeCN}$ 70/30 v/v contenant 0,1 % d'acide formique. Le temps d'analyse en LC-MS conventionnelle est de 10 minutes. Finalement, le volume d'injection a été fixé à $5 \text{ }\mu\text{L}$. Des chromatogrammes correspondant à une injection d'une

solution de 50 pg.mL^{-1} de cocaïne et BZE en eau avec 2 % de MeCN sont présentés en Figure II- 12.

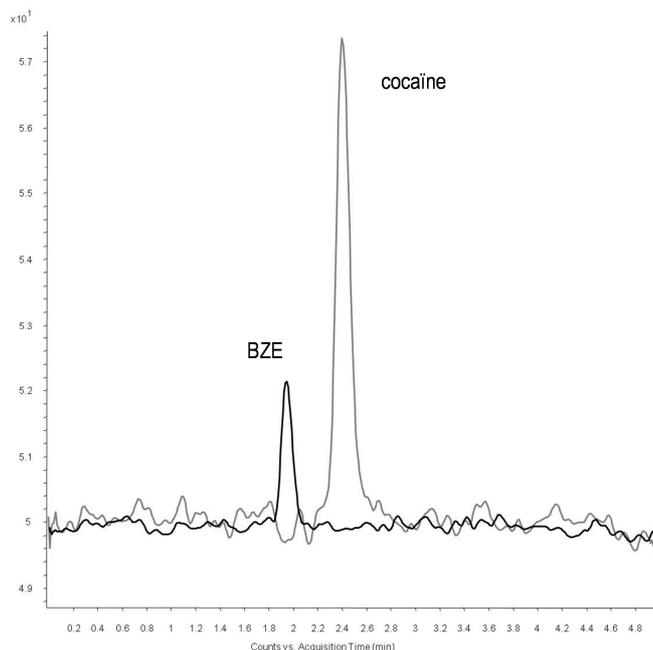


Figure II- 12 : Chromatogrammes LC-MS correspondant aux transitions MRM de la cocaïne et de la BZE pour une injection de $5 \mu\text{L}$ d'une solution aqueuse de cocaïne et BZE à 50 pg.mL^{-1} avec 2 % de MeCN. LC-MS conventionnelle, colonne Zorbax C18 $5 \mu\text{m}$ $150 \text{ mm} \times 2,1 \text{ mm}$ d.i., phase mobile eau/MeCN/HCOOH 70/30/0,1 v/v/v, débit $0,2 \mu\text{L.min}^{-1}$. MS = triple quadripôle. Méthode complète en annexe 2, méthode conventionnelle.

Dans ces conditions, des solutions aqueuses dopées avec de la cocaïne et de la BZE ont été injectées pour déterminer les LDD et les LDQ de la méthode. Pour une concentration de 50 pg.mL^{-1} , on obtient des valeurs de S/B de $10,8 \pm 1,5$ pour la cocaïne et de $8,1 \pm 0,1$ pour la BZE. Par extrapolation on obtient des LDD de 14 pg.mL^{-1} et 19 pg.mL^{-1} , et des LDQ de 47 pg.mL^{-1} et 62 pg.mL^{-1} pour la cocaïne et la BZE respectivement. Les LDQ sont seulement deux fois plus grandes que pour la méthode sur puce. En effet, plusieurs facteurs sont à l'origine de cette si faible différence de sensibilité : d'une part, la méthode sur puce génère des pics de moindres efficacités. D'autre part, la méthode sur puce intègre une étape supplémentaire de SPE durant laquelle une partie des analytes est perdue, notamment dans le cas de la BZE.

II.3.7 Performance de la SPE/LC/MS sur puce en mode isocratique

Pour essayer d'obtenir les LDQ les plus faibles possible avec la puce, une méthode isocratique a été développée de façon à obtenir des pics avec des temps de rétention les plus courts possible. Le pourcentage de MeCN à 0,1 % d'acide formique a été fixé à 30 %. En réalité, l'utilisation d'une quantité plus grande de solvant organique, qui serait souhaitable

pour avoir une méthode plus rapide, rend difficile l'analyse car le spray est instable lorsque le solvant de la pré-colonne arrive à la source et les pics doivent par conséquent sortir après cette perturbation déjà évoquée et particulièrement importante pour la puce de 500 nL. Finalement, le mélange eau/MeCN 70/30 (v/v) permet la séparation des pics en moins de 5 minutes sans qu'ils se trouvent dans cette gamme de temps. Considérant les importants effets de mémoire observés précédemment pour la méthode en mode gradient, un protocole de rinçage de tout le système a été développé. Ce rinçage consiste en une injection intermédiaire entre deux analyses de 8 μL d'une solution eau/MeCN 20/80 (v/v). Pour cette injection de rinçage, un programme d'injection a été appliqué comme dans le cas de la méthode développée pour limiter les effets de matrice en mode gradient. Finalement, les canaux de la puce ont été rincés avec un gradient d'eau et MeCN avec 0,1 % d'acide formique. Le temps nécessaire pour cette étape de rinçage est de 15 minutes et il est efficace pour éliminer toute trace de cocaïne rémanente dans le système d'analyse.

Les performances de la méthode isocratique optimisée ont été évaluées pour des échantillons aqueux dopés avec de la cocaïne et de la BZE. Tout d'abord, la répétabilité de la méthode a été testée : trois injections d'échantillons d'eau avec 2 % de MeCN dopée avec 250 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cocaïne et de BZE ont été effectuées. Une bonne répétabilité est obtenue pour les temps de rétention avec des coefficients de variation ($n = 3$) de 0,5 % pour la BZE et de 1 % pour la cocaïne. Pour les aires de pic, les coefficients de variation obtenus sont de 12 % pour la BZE et de 8 % pour la cocaïne. Cette répétabilité pour l'aire de pic reste acceptable. Ensuite, la linéarité et la sensibilité de la méthode ont été estimées. Pour ce faire, des droites d'étalonnage ont été étudiées. Elles ont été obtenues pour des échantillons aqueux avec 2 % de MeCN dopés avec de la cocaïne et de la BZE à des concentrations allant de 10 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ à 800 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Les deux droites d'étalonnage sont linéaires dans l'intervalle d'étude avec des coefficients de corrélation de 0,990 et 0,994 pour la cocaïne et la BZE respectivement. En ce qui concerne la sensibilité de la méthode, des LDD et des LDQ ont été établies comme les plus faibles concentrations qui produisent un signal 3 fois (LDD) ou 10 fois (LDQ) supérieur au bruit. Pour les deux molécules la LDD obtenue est égale à 1 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ et la LDQ est de 3 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ pour un volume injecté de 2 μL . Des chromatogrammes correspondant à une injection de 2 μL de cocaïne et BZE à 10 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ sont présentés en Figure II- 13.

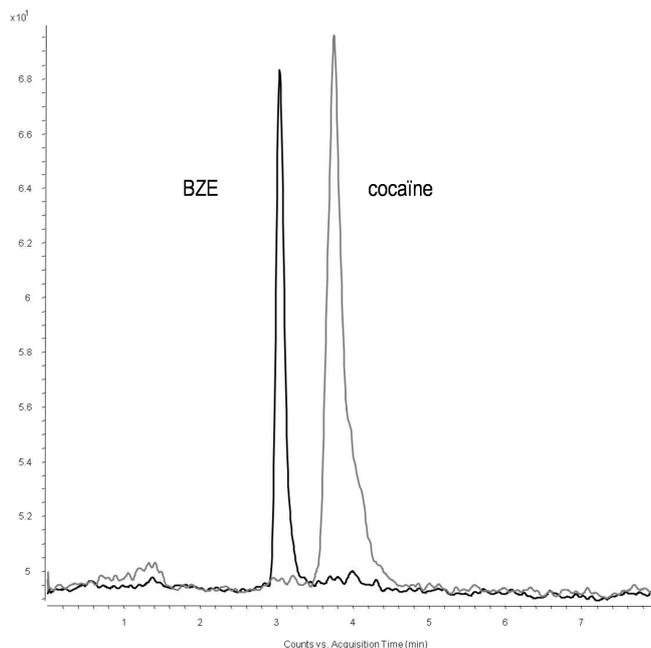


Figure II- 13 : Chromatogrammes LC-MS correspondant aux transitions MRM de la cocaïne et de la BZE pour une injection de 2 μL d'une solution aqueuse dopée à 10 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ avec 2 % de MeCN. Puce de 500 nL. $V_{\text{flush}} = 5 \mu\text{L}$. Débit = 0,4 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. MS = triple quadripôle. Méthode isocratique eau/MeCN/HCOOH 70/30/0,1 v/v/v. Méthode complète en annexe 2, méthode isocratique.

La BZE présente une meilleure efficacité d'ionisation que la cocaïne, mais finalement, les LDD et LDQ sont semblables puisque la BZE est moins retenue dans le canal d'enrichissement que la cocaïne. Ces résultats sont effectivement meilleurs que ceux obtenus pour la méthode en mode gradient. D'ailleurs un gain en sensibilité par rapport à la méthode conventionnelle de 15 pour la cocaïne et de 20 pour la BZE est obtenu. Ce résultat montre bien que des améliorations importantes peuvent être obtenues en modifiant la phase mobile, cependant, la conception ainsi que le choix limité des phases stationnaires de la puce utilisée limitent fortement ce système en termes d'efficacité et donc de sensibilité. Compte tenu des nombreux changements qu'a subi la méthode de séparation, le Tableau II- 4 résume les résultats obtenus pour les différentes méthodes testées.

Finalement, l'optimisation de la méthode d'analyse SPE-LC-MS sur puce s'est avérée assez longue à cause du grand nombre de soucis analytiques rencontrés pendant son développement. Des améliorations ont tout de même été apportées en changeant la capacité de la puce, la phase mobile et les conditions de séparation. Cependant, des limitations importantes ont été observées pour le choix limité des phases d'enrichissement et de séparation qui se trouvent dans les canaux de la puce. En plus la conception du système n'est pas bien adaptée à ses dimensions dans le cas d'une puce de 500 nL. Un canal moins grand mais contenant une phase plus rétentive permettrait d'obtenir un spray plus stable par la limitation du volume de solvant transféré. En cherchant les conditions où la sensibilité est la plus importante pour la méthode sur puce, les résultats restent donc assez proches d'une méthode conventionnelle. Il est tout de même intéressant d'évaluer le potentiel de cette méthode dans le cas d'échantillons

biologiques où l'étape supplémentaire de SPE intégrée peut s'avérer en revanche intéressante pour la purification d'échantillons complexes.

Méthode	Analyseur	Puce	Phase mobile	V _{injection} (µL)	V _{flush} (µL)	LOQ cocaïne (pg.mL ⁻¹)	LOQ Benzoylecgonine (pg.mL ⁻¹)	Objectif	Chromatogrammes
1	Trappe	40 nL	Formate d'ammonium et MeCN	1	5	17000	16000	Etude initiale	Figure II-5
2	Trappe	500 nL	Formate d'ammonium et MeCN	1	5	Non étudiée	Non étudiée	Changement de capacité	Figure II-6 (a)
3	Trappe	500 nL	Eau / MeCN / HCOOH	1	5	Non étudiée	Non étudiée	Changement de phase mobile	Figure II-6 (b)
4	Trappe	500 nL	Eau / MeCN / HCOOH	1	5	13000	7000	Gradient plus lent (problèmes de spray)	Non présentés
5	Trappe	500 nL	Eau / MeCN / HCOOH	2	5	7000	4000	Augmentation du volume injecté	Non présentés
6	QqQ	500 nL	Eau / MeCN / HCOOH	2	5	30	5	Changement d'analyseur	Figure II-11
7	QqQ	500 nL	Eau / MeCN / HCOOH	2	6	31	22	Prise en charge des effets de mémoire	Figure II-12
Isocratique	QqQ	500 nL	Eau / MeCN / HCOOH	2	5	3	3	Méthode isocratique	Figure II-14
LC-MS conventionnelle	QqQ	non	Eau / MeCN / HCOOH	5	non	47	62	Comparaison à LC-MS conventionnelle	Figure II-13

Tableau II- 4 : Bilan des méthodes utilisées. La description des gradients utilisés pour chaque méthode se trouve en annexe 2 (QqQ = triple quadripôle).

II.4 Application à l'analyse d'échantillons biologiques

II.4.1 Analyse de la cocaïne dans les cheveux

II.4.1.1 Description du mode opératoire

Les méthodes développées de SPE-LC sur puce couplée à la spectrométrie de masse ont montré une excellente sensibilité pour l'analyse de la cocaïne et la BZE dans l'eau, en particulier pour le cas de la méthode isocratique. Celle-ci a donc été appliquée à l'analyse de ces molécules dans des échantillons biologiques. La matrice cheveux a tout d'abord été étudiée. L'intérêt particulier des cheveux est qu'ils incorporent les drogues pendant la kératinisation, ce qui permet de les conserver et de les garder tout au long de la vie du cheveu. Il s'agit d'une matrice solide, et la cocaïne et ses métabolites y sont incorporés par des procédés endogènes, il est donc nécessaire d'extraire les molécules des cheveux pour pouvoir les analyser. L'extraction de la cocaïne et de ses métabolites des cheveux peut se faire par digestion acide [51] ou enzymatique [202], mais aussi par sonication avec un solvant

organique comme le MeOH [46] ou le MeCN. Avant l'extraction de la matrice, il est nécessaire de décontaminer les cheveux pour éliminer toute source exogène de cocaïne qui pourrait fausser l'étude. Une procédure classique utilisée antérieurement dans le laboratoire pour l'analyse du LSD des cheveux a été adoptée (Figure II- 14), sa description complète étant présentée en annexe 4 [203].

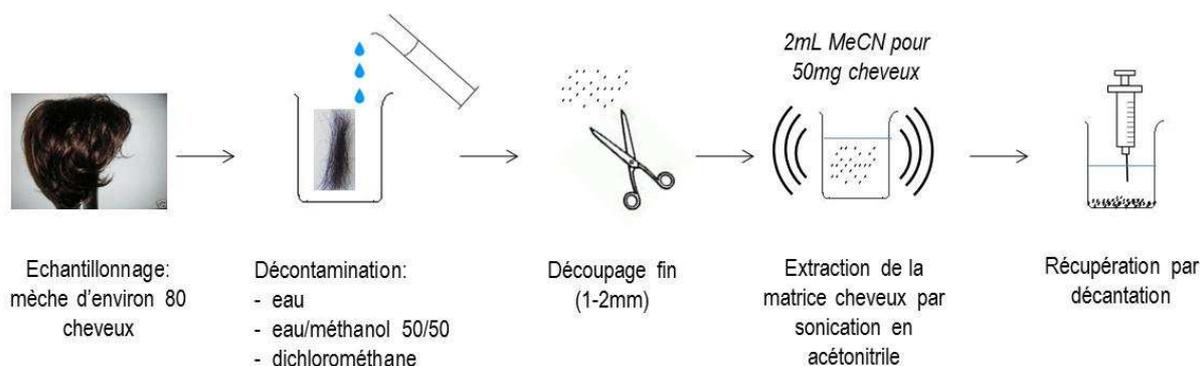


Figure II- 14 : Procédure d'extraction de la cocaïne et ses métabolites de la matrice cheveux.

Un volontaire du laboratoire a fourni des cheveux propres, sans cocaïne. Les cheveux ont été lavés avec de l'eau, puis avec un mélange eau / MeOH 50/50 (v/v) et finalement avec du dichlorométhane. Les lavages ont été effectués par agitation avec un agitateur rotatoire pendant 5 minutes. Les cheveux ont par la suite été séchés pendant 2 heures à 50°C, puis découpés finement avec des ciseaux afin d'obtenir une surface plus importante pour l'extraction. Par la suite, 100 mg de ces cheveux découpés ont été extraits par 4 mL de MeCN dans un flacon fermé submergé dans un bain d'ultrasons pendant 2 heures à 35°C. Après la décantation des cheveux, l'extrait de cheveux en MeCN a été prélevé avec une seringue puis dopé avec de la cocaïne au seuil décisionnel de 500 pg.mg⁻¹ pour la suite de l'étude. La même concentration de BZE a été ajoutée à l'extrait de cheveux car, même si elle intègre les cheveux en moindre quantité de par sa nature polaire, l'étude du rapport cocaïne/BZE peut être déterminante pour établir l'origine endogène ou exogène de la cocaïne [204].

II.4.1.2 Analyse des extraits de cheveux

En général l'extrait de cheveux ainsi obtenu peut être directement analysé. Néanmoins, la cocaïne et ses métabolites sont présents dans les cheveux à des faibles teneurs, le seuil décisionnel étant de 500 pg.mg⁻¹ pour la cocaïne (Tableau I- 2). De plus, la quantité d'échantillon peut être limitée. Donc la méthode d'analyse utilisée doit être très sensible. La méthode sur puce intégrant une étape de SPE, permet non seulement d'injecter des volumes d'échantillon importants (1 à 2 µL) par rapport aux dimensions globales du système séparatif et donc de gagner en sensibilité, mais cela permet surtout d'éliminer des interférents

potentiels. La méthode de SPE-LC sur puce couplée à la spectrométrie de masse est alors appropriée pour analyser la cocaïne dans les cheveux. Dans la partie précédente, la quantité de MeCN dans l'échantillon a été fixée à 2 %, par conséquent, l'extrait de cheveux dopé a été dilué 50 fois avant d'être injecté. Au final, la concentration de cocaïne et de BZE dans l'échantillon injecté était de 250 pg.mL^{-1} . Les chromatogrammes ainsi obtenus sont présentés dans la Figure II- 15.

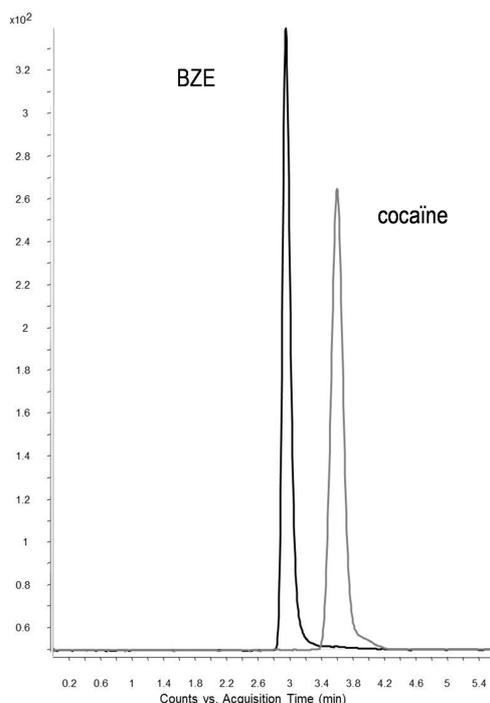


Figure II- 15 : Chromatogrammes en mode MRM d'un extrait de cheveux dopé à 500 pg.mg^{-1} de cocaïne et de BZE ($C_{\text{finale}} = 250 \text{ pg.mL}^{-1}$) par SPE-LC sur puce couplée à la spectrométrie de masse. Puce de 500 nL. Vflush = 5 μL . Débit = 0,4 $\mu\text{L.min}^{-1}$. MS = triple quadripôle. Méthode isocratique eau/MeCN/HCOOH 70/30/0,1 v/v/v. Méthode complète en annexe 2, méthode isocratique.

Des chromatogrammes propres sans interférents ont permis la quantification des deux analytes. Les LDQ obtenues dans ce milieu sont de 6 pg.mL^{-1} et 10 pg.mL^{-1} pour la cocaïne et la BZE respectivement avec un coefficient de variation inférieur à 20 % pour la LDQ pour les deux molécules. Ces valeurs sont équivalentes à 12 pg.mg^{-1} et 20 pg.mg^{-1} de cheveux pour la cocaïne et la BZE respectivement. La LDQ pour la cocaïne est donc 40 fois inférieure au seuil de positivité dans les cheveux qui est égal à 500 pg.mg^{-1} . Ces résultats confirment la grande sensibilité de la méthode, mais aussi la simplicité de la préparation de l'échantillon.

II.4.2 Analyse de la cocaïne dans l'urine

II.4.2.1 Choix des conditions opératoires

Le potentiel de la méthode développée a aussi été évalué dans le cadre de l'analyse d'échantillons d'urine. La complexité de cette matrice demande souvent une étape de purification avant analyse quantitative d'analytes, en particulier pour limiter les effets de matrice rencontrés en LC-MS. L'injection directe de l'urine après dilution, connue aussi comme la méthode « dilute-and-shoot », peut être utilisée pour réduire les interférents de la matrice [68]. Cependant, elle n'est souvent pas suffisante pour contrer ces effets de suppression d'ions. Considérant la complexité de l'urine, la SPE ainsi que la dilution peuvent être d'une grande utilité pour réduire les effets de matrice qui sont particulièrement importants lors de l'ionisation par électrospray. La méthode développée précédemment est donc particulièrement adaptée à l'analyse de la cocaïne et ses métabolites dans l'urine car elle fait usage de la SPE couplée à la LC-MS, et elle est très sensible, ce qui permet d'envisager la dilution des échantillons.

II.4.2.2 Analyse d'échantillons urinaires

Lors de l'analyse médicale de la cocaïne dans l'urine, c'est la BZE qui est généralement détectée, et son seuil décisionnel de positivité pour le dépistage correspond à 300 ng.mL^{-1} (Tableau I- 2), bien que les quantités usuellement rencontrées dans l'urine de consommateurs de cocaïne soient beaucoup plus élevées (Tableau I- 2). Concernant la cocaïne, elle se trouve dans l'urine dans des quantités inférieures (Tableau I- 2) et les limites de détection usuelles pour l'analyse de la BZE et la cocaïne dans l'urine sont de l'ordre de 5 ng.mL^{-1} et 50 ng.mL^{-1} [205]. Ainsi, une concentration de 8 ng.mL^{-1} de cocaïne et de BZE a été utilisée pour cette étude, valeur déjà reportée pour l'analyse de la cocaïne et de ses métabolites dans l'urine [84].

Lors de l'utilisation de la méthode isocratique, d'importantes interférences ont été observées pour les temps de rétention de la cocaïne et de la BZE. Par conséquent, la séparation a été réalisée en mode gradient, avec le gradient développé pour limiter les effets de mémoire (méthode 7), au lieu du mode isocratique, afin d'éviter la co-élution des interférents polaires par le retardement des pics des analytes cibles. La méthode a donc été appliquée à des échantillons d'urine dopée dilués en eau avec 4 facteurs de dilution différents (10, 25, 50, et 100). En effet, cette dilution a été effectuée pour évaluer son impact sur les effets de matrice souvent reportés lors d'une analyse en LC-MS.

Pour évaluer les rendements obtenus dans l'urine, les aires de pic ont été comparées aux aires de pic obtenues lors de l'injection des analytes en solution aqueuse pure dopée au même niveau de concentration que l'urine diluée. La Figure II- 16 présente les rendements pour la BZE et la cocaïne en fonction du facteur de dilution de l'urine. Dans le cas de la benzoylecgonine, le rendement augmente lorsque la dilution augmente. Pour des facteurs de dilution de 100, de 50 et de 25, ces rendements sont supérieurs à 90 %. Mais dans le cas d'une dilution d'un facteur 10, le rendement de la BZE diminue d'environ 22 %. Ceci confirme la

présence d'importants effets de suppression d'ions dûs à la co-élution d'interférents issus de la matrice urine. En effet, lors de l'analyse de drogues dans l'urine, il est courant de rencontrer d'importantes suppressions d'ions pour des composés hydrophiles tels que la BZE [81]. Dans notre cas, la suppression d'ions peut être évitée grâce à la dilution des échantillons avec d'importants facteurs de dilution de l'ordre de 1/25. D'ailleurs, la méthode permet de supporter ces niveaux de dilution grâce à son importante sensibilité.

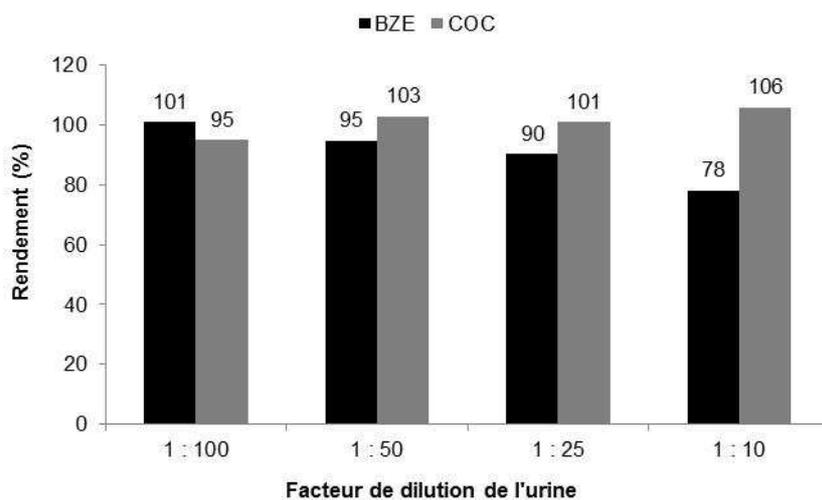


Figure II- 16 : Rendement de la BZE et de la cocaïne dans des échantillons d'urine dilués (2 % MeCN) comparés à des échantillons purs (2 % MeCN) avec la même concentration. L'urine a été dopée initialement avec 8 ng.mL^{-1} de cocaïne et de BZE avant sa dilution avec de l'eau. $V_{\text{flush}} = 6 \mu\text{L}$. Débit = $4 \mu\text{L.min}^{-1}$. Puce 500 nL. MS = triple quadripôle Gradient décrit en annexe 2, méthode 7.

Dans le cas de la cocaïne, on n'observe pas d'effets de suppression d'ions, les rendements sont tous proches de 100 %. Les LDQ obtenues pour un facteur de dilution de l'urine de 1/50 sont de 63 pg.mL^{-1} pour la cocaïne et de 22 pg.mL^{-1} pour la BZE, avec des coefficients de variations des LDQ inférieurs à 15 % ($n = 3$). Ces valeurs sont équivalentes à 3,2 ng de cocaïne et 1,1 ng de BZE par millilitre d'urine. Les chromatogrammes correspondant à l'analyse de l'urine diluée 50 fois sont présentés en Figure II- 17. Finalement, une grande sensibilité est obtenue pour la cocaïne et la BZE dans l'urine, tout en ayant un protocole de préparation de l'échantillon assez simple où l'échantillon est tout simplement dilué et filtré avant d'être injecté. Considérant que les quantités usuelles de BZE sont de l'ordre de quelques microgrammes par millilitre, et que le seuil décisionnel de positivité pour le dépistage est de 300 ng.mL^{-1} (Tableau I- 2), la méthode développée est environ 300 fois plus sensible. Enfin, même si la cocaïne dans l'urine ne représente qu'entre 1 % et 9 % de la dose initiale, les quantités usuelles rencontrées sont entre 40 ng.mL^{-1} et $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tableau I- 2), donc la méthode développée présente une sensibilité largement suffisante pour son analyse.

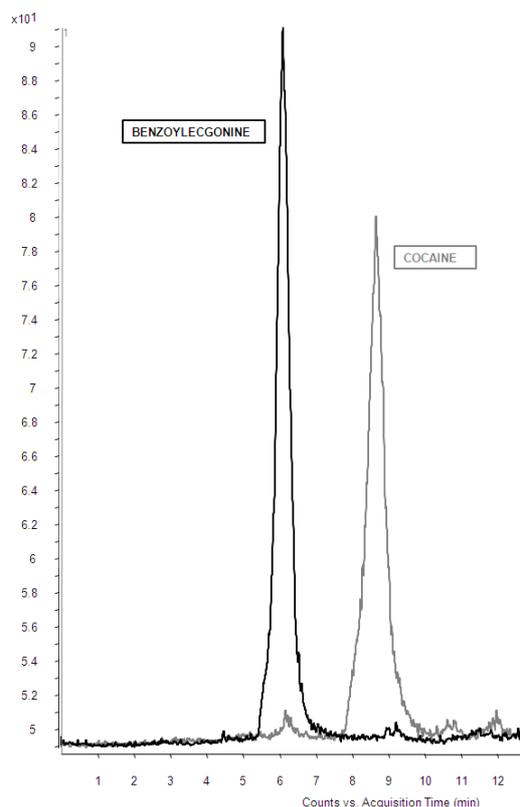


Figure II- 17 : Chromatogrammes en mode MRM d'un échantillon d'urine dopé avec 8 ng.mL^{-1} de cocaïne et de BZE et dilué 50 fois avec de l'eau. La concentration finale après dilution pour les deux molécules est de $0,160 \text{ ng.mL}^{-1}$ et l'échantillon contient 2 % de MeCN. $V_{\text{flush}} = 6 \mu\text{L}$. Débit = $4 \mu\text{L.min}^{-1}$. Puce 500 nL. MS = triple quadripôle Gradient décrit en annexe 2, méthode 7.

II.4.2.3 Confirmation de la validité de la méthode

Comparaison des droites d'étalonnage en milieu aqueux et en milieu urinaire dilué

La méthode utilisée pour l'analyse d'échantillons urinaires (méthode 7) a par la suite été comparée avec les résultats obtenus pour des échantillons aqueux purs. Ainsi, des droites d'étalonnage pour ces deux types d'échantillons ont été tracées pour des concentrations de cocaïne et de BZE allant de $0,05 \text{ ng.mL}^{-1}$ jusqu'à 10 ng.mL^{-1} . Chaque solution étalon a été injectée trois fois et la moyenne des aires des pics a été utilisée pour tracer les droites d'étalonnage de la cocaïne et la BZE dans les deux milieux. Pour chaque solution injectée, le coefficient de variation obtenu pour les aires de pic pour les trois injections est inférieur à 5 %. Ces droites sont présentées en Figure II- 18.

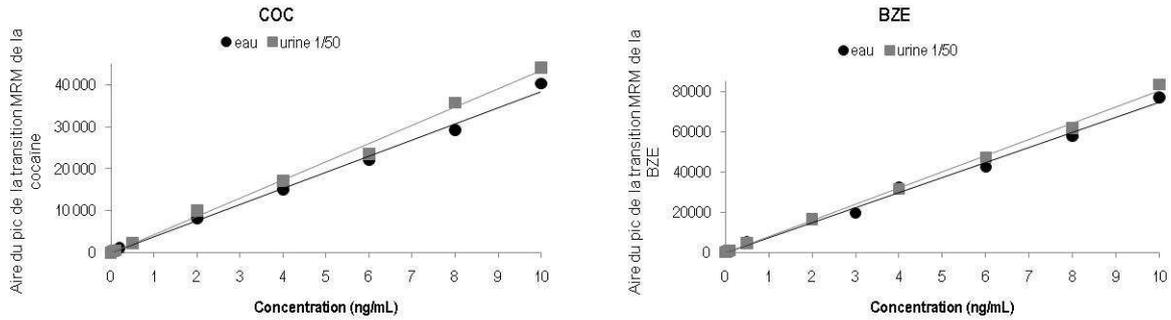


Figure II- 18 : Droites d'étalonnage de la cocaïne et la BZE pour des échantillons aqueux ou urinaires (dilués 50 fois) dopés et contenant 2 % de MeCN. $V_{flush} = 6 \mu\text{L}$. Débit = $4 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Puce 500 nL. MS = triple quadripôle Gradient décrit en annexe 2, méthode 7.

Une comparaison statistique des droites est nécessaire pour déterminer si ces droites sont significativement différentes ou non. Dans un premier temps, la dispersion des points autour des droites d'étalonnage a été comparée à l'aide d'un test F (de Fisher Snedecor). Les écart-types liés ($s_{y/x}$) ont été estimés pour chacune des droites et la valeur observée pour la fonction discriminante du test F est :

$$F_{obs} = s_{1y/x}^2 / s_{2y/x}^2$$

où $s_{1y/x}$ et $s_{2y/x}$ sont les écart-types liés de chacune des droites. Par la suite, F_{obs} est comparée à $F_{5\%,(n_1-2),(n_2-2)}$, la valeur limite d'une variable F pour un risque α de 5 % et pour n_1-2 et n_2-2 degrés de liberté, n_1 et n_2 étant définis comme le nombre de points utilisés pour chacune des droites d'étalonnage. Pour cette étude, $n_1 = n_2 = 8$. Si $F_{obs} < F_{5\%,(n_1-2),(n_2-2)}$, il est possible de considérer les écart-types comme homogènes et donc de fournir une estimation de la variance commune par une variance intraclasse obtenue avec la formule suivante :

$$s_{intra}^2 = \frac{(n_1 - 2)s_{1y/x} + (n_2 - 2)s_{2y/x}}{(n_1 + n_2 - 4)}$$

Ceci est vrai pour la variance liée comme pour celle sur la pente ou sur l'ordonnée à l'origine. Il est ensuite possible de comparer successivement les pentes puis, au cas où les pentes ne seraient pas significativement différentes, les ordonnées à l'origine, à l'aide d'un test t (de Student). La valeur observée pour la fonction discriminante du test t est :

$$t_{obs} = \frac{(x_1 - x_2)}{s_{intra} \sqrt{2}}$$

où x_1 et x_2 correspondent au paramètre considéré (pente ou ordonnée à l'origine) pour chacune des deux droites d'étalonnage. Finalement, le t_{obs} est comparé à $t_{5\%,(n_1+n_2-4)}$, valeur limite d'une variable de Student obtenue pour un risque α de 5 % et pour n_1+n_2-4 degrés de liberté. Les variables x_1 et x_2 ne sont pas significativement différentes si

$t_{obs} \in [-t_{5\%,(n1+n2-4)} ; + t_{5\%,(n1+n2-4)}]$. L'ensemble des résultats de cette approche statistique sont résumés dans le Tableau II- 5.

Molécule	Cocaïne	BZE
F_{obs}	1,43	0,755
$F_{5\%,6,6}$	5,82	5,82
Conclusion écarts type liés	Pas de différence significative des écarts type liés	Pas de différence significative des écarts type liés
$t_{5\%,12}$	2,18	2,18
$t_{obs\ pente}$	2,90	2,57
Conclusion pentes	Différence des pentes significative pour $\alpha = 5\%$	Différence des pentes significative pour $\alpha = 5\%$

Tableau II- 5 : Résultats de l'approche statistique pour la comparaison des droites d'étalonnage en eau et dans l'urine diluée 50 fois avec de l'eau pour la cocaïne et la BZE.

Pour les deux molécules, les pentes obtenues sont significativement différentes. La pente obtenue pour la cocaïne en milieu urinaire dilué 50 fois est de 10% plus importante que la pente obtenue en milieu aqueux pur, ce qui induit un biais d'environ 8 % (calculé pour une concentration de 10 ng.mL⁻¹). En ce qui concerne la BZE, la pente obtenue en milieu urinaire dilué 50 fois est de 9 % plus importante que celle obtenue en milieu aqueux pur, ce qui induit un biais d'environ 7 % (calculé pour une concentration de 10 ng.mL⁻¹). Étant donné que nous acceptons de tolérer un biais maximum pour les concentrations de 10 %, nous allons considérer par la suite que les droites d'étalonnage en milieu aqueux peuvent être utilisées pour quantifier la cocaïne et la BZE dans des échantillons urinaires dilués 50 fois avec de l'eau. Il est en plus possible d'effectuer des quantifications dans des milieux urinaires dilués plus de 50 fois, considérant que le biais sera inférieur à celui obtenu avec un facteur 50 de dilution.

Analyse d'échantillons urinaires réels avec les droites d'étalonnage en milieu aqueux

Les analyses effectuées précédemment ont été obtenues pour des échantillons urinaires dopés avec de la cocaïne et de la BZE. Cependant, il serait plus intéressant d'effectuer ce même type d'analyse pour des échantillons urinaires réels, donc provenant de personnes ayant consommé de la cocaïne. Ces échantillons ont été obtenus grâce au laboratoire Toxlab, laboratoire spécialisé en toxicologie médico-légale. Ces échantillons avaient initialement été testés par ce laboratoire par des méthodes qualitatives et avaient tous montré la présence de cocaïne et de BZE. Ils ont donc par la suite été analysés par la méthode développée sur puce après les avoir dilués 50 fois avec de l'eau. Pour cette première étude, il a été observé que les concentrations de BZE étaient trop élevées considérant la gamme linéaire de la méthode développée, de ce fait, les échantillons ont été dilués d'avantage de façon à ce que les concentrations de BZE entrent dans la gamme linéaire étudiée (0,05 à 10 ng.mL⁻¹). En ce qui concerne la cocaïne, présente en moindre concentration que la BZE, il a été vérifié que les concentrations obtenues sont supérieures à la limite de quantification dans l'urine diluée 50 fois, donc supérieures à

0,063 ng.mL⁻¹, sauf pour l'échantillon 0676 pour lequel la concentration finale obtenue pour la cocaïne est en dessous de la LDQ et donc sa quantification n'a finalement pas été effectuée. Les résultats obtenus avec notre méthode ainsi que ceux obtenus par Toxlab pour deux des échantillons sont présentés dans le Tableau II- 6.

Echantillon	Facteur de dilution	Concentration initiale (droites d'étalonnage en eau) (µg.mL ⁻¹) +/- ET (CV)		Concentration méthode LLE/GC/MS (Toxlab) (µg.mL ⁻¹)	
		cocaïne	BZE	cocaïne	BZE
1101	1/100	0,034+/-0,005 (15%)	0,58+/-0,029 (5%)	0,019	0,469
0837	1/10000	1,95+/-0,26 (13%)	17,9+/-0,96 (5%)	2,224	11,164
1514	1/1000	0,22+/-0,039 (17%)	0,82+/-0,096 (12%)		
1715	1/10000	0,78+/-0,082 (10%)	4,03+/-0,45 (11%)		
0676	1/1000	< LDQ	0,97+/-0,098 (10%)		

Tableau II- 6 : Résultats de la quantification de cocaïne et de BZE d'échantillons urinaires réels dilués avec de l'eau. Ces résultats ont été obtenus avec la méthode 7 décrite en annexe 2, ou par la méthode LLE/GC/MS utilisée par Toxlab. (ET=écart type, CV=coefficient de variation, n=3).

Une assez bonne répétabilité a été obtenue pour la quantification de la cocaïne et la BZE dans les échantillons réels avec des niveaux de concentration très variables en fonction de l'échantillon, allant de 0,58 µg.mL⁻¹ à 17,9 µg.mL⁻¹ pour la BZE, et de 0,034 µg.mL⁻¹ à 1,95 µg.mL⁻¹ pour la cocaïne. Ces valeurs entrent dans les valeurs usuellement rencontrées dans ce type de matrice (Tableau I- 2). Pour pouvoir comparer l'analyse effectuée avec la puce, deux des échantillons réels ont été sélectionnés pour que leur quantification soit effectuée par le laboratoire Toxlab. Cette quantification a été réalisée par GC-MS avec une méthode validée pour l'analyse de la cocaïne dans le sang adaptée à l'analyse d'urine et utilisant des étalons internes deutérés. En effet, la quantification de la cocaïne se fait dans le sang et pas dans les urines qui sont plutôt utilisées pour l'analyse qualitative. Pour la méthode utilisée par le laboratoire Toxlab, et que nous appellerons par la suite méthode LLE/GC/MS, une étape de LLE dans un Toxi-tube A est effectuée avant l'analyse. Le choix s'est porté vers les échantillons ayant la quantité de BZE la plus faible (1101) et la plus élevée (0837). En ce qui concerne l'échantillon le plus dilué, la quantification effectuée avec la puce est surestimée de 79 % pour la cocaïne et de 23 % pour la BZE par rapport à la valeur obtenue par la méthode LLE/GC/MS. La surestimation de la concentration de cocaïne dans l'échantillon pourrait avoir pour origine une décomposition de celle-ci entre l'analyse effectuée sur puce et l'analyse externe effectuée par la méthode LLE/GC/MS puisque cette dernière a été effectuée un mois après l'analyse sur puce, et l'échantillon urinaire était conservé à 4°C sans être acidifié. Par contre, la surestimation de la BZE par la méthode sur puce ne permet pas de confirmer cette hypothèse. En ce qui concerne l'échantillon le plus concentré (0837), la

quantification effectuée avec la puce est sous-estimée de 12 % pour la cocaïne et elle est surestimée de 60 % pour la BZE par rapport à la valeur obtenue par la méthode LLE/GC/MS. Le résultat pour la BZE est assez surprenant considérant que la valeur obtenue pour la cocaïne est assez proche de celui obtenu par la méthode LLE/GC/MS si on considère l'écart type de la méthode sur puce. En plus, la concentration de la solution diluée entre bien dans la gamme linéaire de la méthode sur puce. Considérant qu'il pourrait s'agir d'un effet de matrice lié à une nature variable de la matrice de ces échantillons particuliers d'urine, une nouvelle méthode d'analyse par ajouts dosés a été effectuée pour ces deux échantillons pour la quantification de la cocaïne et de la BZE.

Analyse d'échantillons urinaires réels par une méthode d'ajouts dosés

Considérant que précédemment il avait été trouvé qu'il existe un biais d'environ 8 % pour la détermination de la concentration en milieu urinaire dilué 50 fois lorsqu'une droite d'étalonnage en milieu aqueux est utilisée, une deuxième méthode qui tient mieux en compte la nature de la matrice complexe étudiée, la méthode des ajouts dosés, a été évaluée pour quantifier la cocaïne et la BZE des échantillons urinaires 1101 et 0837. Pour cette étude, une série de solutions a été préparée contenant l'urine diluée ainsi qu'une quantité variable $x C_i$, avec x égal à 0, 1, 2 et 3, d'une solution de concentration connue C_{COC} de cocaïne et C_{BZE} de BZE. Des droites reportant l'aire du pic pour la transition MRM de la cocaïne ou de la BZE en fonction de $x C_i$ ont alors été obtenues pour pouvoir extrapoler la valeur de la concentration des deux molécules dans les échantillons urinaires étudiés. Les pentes des droites d'étalonnage obtenues en milieu aqueux, et des droites obtenues pour les ajouts dosés ont été comparées de la même façon qu'il avait été fait pour comparer les droites en milieu aqueux et en milieu urinaire dilué 50 fois. Les résultats de cette étude sont présentés dans le Tableau II- 7.

Échantillon	Molécule	Comparaison des pentes	Cfinale (ng.mL ⁻¹)	Dilution	Cinitiale (µg.mL ⁻¹)	Cinitiale droites d'étalonnage +/-ET (µg.mL ⁻¹)	Cinitiale LLE/GC/MS (µg.mL ⁻¹)
1101	Cocaïne	Significativement différentes	41	100	0,041	0,034+/-0,005	0,019
	BZE	Significativement différentes	4,63	100	0,463	0,58+/-0,029	0,469
0837	Cocaïne	Pas significativement différentes	0,272	10000	2,72	1,95+/-0,26	2,224
	BZE	Pas significativement différentes	1,85	10000	18,5	17,9+/-0,96	11,164

Tableau II- 7 : Résultats obtenus pour la méthode des ajouts dosés et pour les deux autres méthodes de quantification utilisées.

Les résultats obtenus alors pour l'échantillon 1101 montrent une différence significative des pentes obtenues pour les deux méthodes pour la cocaïne et la BZE, tandis que pour l'échantillon 0837, la différence des pentes n'est pas significative pour les deux molécules. En effet, l'échantillon 1101 est moins dilué que l'urine 0837 et risque donc de présenter plus

d'effets de matrice. La différence entre les deux pentes est de 15 % et de 16% pour la cocaïne et la BZE respectivement. Donc pour cet échantillon, les valeurs obtenues pour les concentrations résultant de l'utilisation des droites d'étalonnage obtenues en milieu aqueux pourraient conduire à une erreur supérieure à 10 %. En effet, pour l'échantillon 1101, la concentration de la cocaïne est 20 % au-dessus du résultat obtenu pour les droites d'étalonnage et celle de la BZE est 20 % plus faible. Considérant que lors de l'application de la méthode des ajouts dosés les effets de matrice de l'échantillon sont pris en compte, les valeurs obtenues par cette méthode sembleraient être les plus proches de la réalité. Par rapport aux valeurs reportées par le laboratoire externe pour la méthode LLE/GC/MS, la concentration de cocaïne obtenue par des ajouts dosés est 116 % fois plus importante que le résultat obtenu par la méthode LLE/GC/MS, et celle de BZE est supérieure de seulement 1 %. Pour la BZE, les résultats des ajouts dosés sont très proches de ceux obtenus par la méthode LLE/GC/MS, cependant, pour la cocaïne la différence est très importante. D'une part, il est possible, comme énoncé précédemment, qu'entre les analyses faites par les deux laboratoires il y ait eu une importante dégradation de la cocaïne, cependant, aucune augmentation significative de son produit d'hydrolyse, la BZE, n'est observée. D'autre part, la méthode LLE/GC/MS utilisée par Toxlab fait usage d'étalons internes deutérés, mais la quantité ajoutée de ces étalons internes est égale à 200 ng pour 1 mL d'urine. Or, considérant les concentrations qui ont été obtenues par la méthode LLE/GC/MS pour l'échantillon 1101, la quantité de cocaïne dans l'échantillon analysé est environ 10 fois plus faible que celle de l'étalon interne, tandis que celle de la BZE est seulement 2 fois plus importante. Ceci indique que la concentration obtenue pour la cocaïne pourrait être faussée puisque les effets de matrice au niveau de la MS peuvent être différents entre la cocaïne et l'étalon interne deutéré à cause de l'importante différence de concentration entre ces deux composés.

Pour l'échantillon 0837, les pentes obtenues pour la droite d'étalonnage en milieu aqueux et la droite des ajouts dosés ne sont pas significativement différentes, probablement à cause de l'importante dilution de l'échantillon avant son analyse. Il y a cependant une différence de concentration de la cocaïne entre les deux méthodes utilisées car elle est 23 % plus importante que lors de l'utilisation de la droite d'étalonnage. Le coefficient de variation associé à la méthode par ajouts dosés n'a pas été évalué, mais celui des droites d'étalonnage est d'environ 13 %, ce qui pourrait en partie expliquer cette différence. En ce qui concerne la BZE, la concentration obtenue par les ajouts dosés est très proche de celle obtenue par la droite d'étalonnage considérant l'erreur attribuée à la mesure. Enfin, la concentration de la cocaïne obtenue par ajouts dosés est 22% plus importante que celle obtenue par la méthode LLE/GC/MS utilisée par Toxlab et celle de la BZE est 65 % plus élevée. Encore une fois, l'étalon interne utilisé pour la méthode LLE/GC/MS a une concentration assez différente de celle de l'analyte correspondant, car la quantité de cocaïne est 11 fois plus importante que

celle de son étalon interne, et pour la BZE sa quantité est 56 fois plus importante que son étalon interne, ce qui pourrait expliquer ces différences.

Finalement, trois méthodes de quantification ont été comparées : des droites d'étalonnage en milieu aqueux, pour des échantillons urinaires dilués au moins 50 fois avec de l'eau, des ajouts dosés, et un étalonnage interne. La méthode développée pour les droites d'étalonnage semble être limitée car les résultats obtenus sont variables non seulement en fonction de la dilution effectuée, mais aussi en fonction de l'échantillon analysé. Cette méthode est donc intéressante pour des niveaux de dilution assez élevés, probablement supérieurs à 50. La méthode des ajouts dosés présente alors une bonne alternative qui tient en compte la nature variable de la matrice des échantillons analysés, mais elle risque d'être trop longue pour effectuer des analyses de routine car il a été nécessaire de préparer 4 solutions pour chaque échantillon analysé. Finalement, l'étalonnage interne avec des produits deutérés peut régler un certain nombre de problèmes liés à la détection par la MS puisque l'étalon interne a le même temps de rétention que l'analyte et son ionisation est assez semblable. Cependant, il est important d'établir une concentration d'étalon interne qui ne soit pas trop éloignée de celle de l'analyte, notamment lorsqu'un traitement de l'échantillon est effectué au préalable. Dans le cas présent, 200 ng d'étalons internes deutérés ont été utilisés pour la quantification de la cocaïne et la BZE pour des échantillons ayant des quantités d'analyte allant de 19 ng jusqu'à 11 µg. Avec de tels écarts de concentration, il a été observé que la quantification par étalonnage interne différait des résultats obtenus dans ce travail pour les méthodes effectuées sur la puce.

Conclusions

Une méthode de SPE-LC sur puce couplée à la spectrométrie de masse a été optimisée pour l'analyse de la cocaïne et de la BZE. Malgré les dimensions miniaturisées du système, un volume important d'échantillon a pu être injecté grâce à l'intégration d'un canal d'enrichissement sur la puce. L'optimisation de cette méthode a permis d'obtenir une méthode très sensible. De plus, la miniaturisation du système analytique ainsi que l'utilisation d'un détecteur très sensible ont conduit à l'obtention de très faibles limites de quantification. Les résultats ainsi obtenus ont montré un gain de sensibilité de 20 par rapport à une méthode LC-MS² classique, grâce à l'intégration d'une étape de SPE sur la puce.

Le potentiel de la méthode a été confirmé pour l'application à l'analyse d'échantillons biologiques. Pour l'analyse d'extraits de cheveux, la LDQ obtenue pour la cocaïne est de 12 pg.mg⁻¹, qui comparée au seuil de positivité de 0,5 ng.mg⁻¹, est 40 fois plus sensible. Dans le cas de l'urine, qui est une matrice très complexe, l'ajout d'une étape initiale de dilution en

plus de la SPE sur puce, a permis la quantification de la BZE sans avoir d'effets de suppression d'ions. La LDQ obtenue pour la BZE pour l'urine diluée 50 fois est de $1,1 \text{ ng.mL}^{-1}$, donc 300 fois inférieure au seuil de positivité pour l'urine de 300 ng.mL^{-1} .

La validation de la méthode dans l'urine a été effectuée, notamment en évaluant les différences entre les droites d'étalonnage en milieu urinaire dilué 50 fois et celles obtenues en milieu aqueux pur. Il s'est avéré qu'un biais sur les concentrations de la cocaïne et la BZE de seulement 8% est obtenu en utilisant la droite d'étalonnage en milieu aqueux pour quantifier des échantillons d'urine dopés et dilués 50 fois. La méthode a donc été appliquée à des échantillons réels fournis par Toxlab. Étant donné qu'une partie des résultats n'était pas comparable pour les deux méthodes, une approche de quantification par ajouts dosés a été effectuée. Il s'est donc avéré qu'il était important de considérer qu'une dilution de l'urine de 1/50 peut ne pas être suffisante et dépend de la nature de l'échantillon analysé. En ce qui concerne la méthode LLE/GC/MS utilisée par Toxlab, une partie des résultats obtenus semble affectée par la quantité d'étalon interne utilisée qui s'est avérée très différente des niveaux de concentrations retrouvés dans les échantillons urinaires par la méthode des ajouts dosés.

Finalement, la méthode développée sur puce pour l'analyse de cocaïne et de BZE a démontré un grand potentiel pour la détermination de traces de petites molécules dans des matrices biologiques. Le traitement de l'échantillon est rapide et simple, et une très grande sensibilité est obtenue. Une telle méthode devrait être transposable à l'analyse d'autres petites molécules. Cependant, la méthode semble limitée lorsqu'il s'agit de l'appliquer à des molécules très polaires comme la BZE qui est faiblement retenue dans la colonne d'enrichissement. En effet, un compromis a dû être trouvé afin de retenir suffisamment la BZE dans le canal d'enrichissement en réduisant en parallèle l'adsorption de la cocaïne dans le système analytique. L'utilisation de la puce de très grande capacité (500 nL) a rendu cette analyse possible, mais en parallèle l'efficacité de la colonne a été réduite car les dimensions de la pré-colonne sont alors proches de celles de la colonne de séparation. En plus, le choix de la phase stationnaire de la colonne de séparation est limité, et celle actuellement disponible ne semble pas être adaptée à l'analyse de composés développant des interactions avec des silanols résiduels tels que les amines. Malgré l'intérêt que présente ce système, notamment pour le couplage d'un système miniaturisé à la spectrométrie de masse, l'instabilité du spray ne permet pas son utilisation en routine et demande une importante maîtrise technique de l'appareillage ainsi que la maîtrise d'importantes notions de base en sciences séparatives. Une solution plus simple que d'augmenter la rétention de la pré-colonne en augmentant la quantité de phase de pré-concentration, serait d'intégrer un adsorbant plus sélectif au sein de la puce pour limiter les effets de matrice.

Chapitre III : Développement d'un polymère à empreintes moléculaires pour l'extraction sélective de la cocaïne et application à des matrices biologiques

Introduction

Dans le chapitre précédent, l'intérêt de la miniaturisation a été démontré pour un microsystème intégrant une colonne d'enrichissement et une colonne de séparation couplées à la MS. Cependant, le manque de sélectivité de l'adsorbant utilisé pour l'enrichissement limite fortement les applications de ce type de dispositifs pour l'analyse de petites molécules dans des milieux complexes. Les MIP semblent apporter une solution assez simple pour rendre une extraction plus sélective. Cependant, avant de pouvoir intégrer ce type de support dans un système miniaturisé, il est nécessaire de s'assurer qu'ils sont vraiment sélectifs dans le milieu étudié. Cette sélectivité dépend en grande partie de la molécule utilisée pour faire l'empreinte moléculaire, mais le choix des réactifs de synthèse du support a aussi une importance capitale pour la formation de cavités spécifiques dans le polymère. L'étude bibliographique présentée en chapitre I (partie I.2.3.5.6) a permis de démontrer la faisabilité de MIP pour la reconnaissance spécifique de la cocaïne ou de la BZE dans des milieux organiques ou aqueux. Cependant, malgré l'obtention de cavités spécifiques dans ces MIP, aucune étude en SPE n'a été réalisée pour l'extraction sélective de cocaïne et de BZE d'échantillons réels. Compte tenu de ce manque d'applications en milieux biologiques réels, nous avons voulu développer ce type d'application pour des échantillons biologiques, c'est pourquoi une série de synthèses a tout d'abord été réalisée pour obtenir un support sélectif non-seulement pour la cocaïne mais aussi pour son métabolite principal, la BZE, qui est souvent ciblé pour l'analyse de la cocaïne dans des matrices biologiques. Pour pouvoir caractériser les MIP synthétisés, il a été néanmoins nécessaire au préalable de développer une méthode d'analyse par LC/UV et LC/MS de la cocaïne et de la BZE.

III.1 Méthodes d'analyse de la cocaïne et de ses métabolites

III.1.1 Analyse par LC-UV

Avant de pouvoir évaluer différentes voies de synthèse pour des MIP imprimés avec de la cocaïne, des méthodes d'analyse ont été développées pour quantifier les molécules cibles dans les différentes fractions résultant du protocole d'extraction. Les molécules étudiées sont la cocaïne, et ses métabolites principaux, la BZE et l'EME. Malgré les propriétés hydrophiles des deux métabolites (voir Tableau I- 1), la plupart des méthodes de séparation utilisées pour leur analyse se font avec de la chromatographie à polarité de phase inversée [30, 50, 51]. Donc dans les deux cas, pour la LC-UV et la LC-MS, la séparation chromatographique a été effectuée avec une colonne remplie de silice greffée C18 (Symmetry Shield RP18, Waters) de dimensions 150 mm x 2,1 mm d.i., avec un diamètre de particules de 3,5 μm .

Pour le développement de la méthode en LC-UV, seules la cocaïne et la BZE ont été étudiées car l'EME n'a pas de groupements chromophores et elle n'est donc pas détectable en UV. La détection a été réalisée par spectrophotométrie UV avec un détecteur à barrettes d'iodes et la quantification a été réalisée à une longueur d'onde de 233 nm pour les deux molécules. Une phase mobile appliquée en mode gradient et constituée d'un tampon formate d'ammonium 5 mM pH = 3,2 et de MeCN à un débit de 0,2 mL min⁻¹ a été choisie car elle permet la séparation des deux molécules en moins de 8 minutes. En plus, il s'agit d'une phase mobile qui pourrait être transposable à l'analyse par LC-MS. Enfin, le mode gradient a été utilisé pour pouvoir par la suite faire l'analyse d'échantillons réels tout en nettoyant la colonne analytique après chaque injection. La méthode complète est détaillée en annexe 2 sous le nom de méthode LC-UV. Les pics obtenus ont des aires assez proches. Une bonne linéarité de la méthode a été observée entre 0,05 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ et 0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ avec des coefficients de régression linéaire supérieurs à 0,999 pour les deux molécules. Avec cette méthode et en injectant un volume de 20 μL , les LDD, correspondant à un rapport de signal sur bruit de 3 (S/B = 3), sont de 3 ng.mL⁻¹ et 2 ng.mL⁻¹ pour la cocaïne et la BZE respectivement. Les LDQ, pour lesquelles le rapport signal sur bruit est égal à 10 (S/B = 10), sont de 10 ng.mL⁻¹ et 7 ng.mL⁻¹ pour la cocaïne et la BZE respectivement. Un chromatogramme correspondant à l'analyse de ces deux composés est présenté en Figure III- 1.

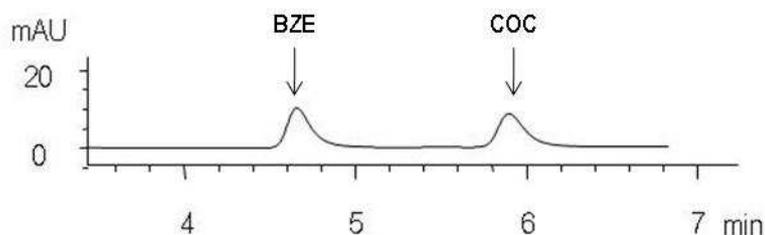


Figure III- 1 : chromatogramme LC-UV d'une solution d'eau avec 10 % de MeCN dopée avec 50 ng.mL⁻¹ de cocaïne et de BZE. Détection UV à $\lambda = 233\text{nm}$. Gradient tampon formate d'ammonium 5 mM pH = 3,2 et MeCN. Débit = 0,2 mL.min⁻¹. $V_{\text{injection}} = 20 \mu\text{L}$. Température = 35°C. Méthode décrite en annexe 2 comme méthode LC-UV.

Considérant que la sensibilité reste faible pour ce type de détection, lors de l'étude de profils d'extraction, une évaporation totale des fractions a été réalisée, suivie d'une reprise avec

200 μL d'une solution eau/MeCN 90/10 (v/v). En effet, cette procédure permet non seulement d'avoir un échantillon compatible avec la phase mobile au début du gradient, mais aussi de pré-concentrer les analytes cinq fois avant leur analyse par LC-UV.

III.1.2 Analyse par LC-MS

La méthode d'analyse par LC-MS a été développée pour la séparation et quantification de la cocaïne et ses deux métabolites principaux. Le système utilisé ici ainsi que les paramètres de détection sont les mêmes que dans le cas de la méthode décrite dans le chapitre II pour la LC-MS conventionnelle, mais la colonne analytique utilisée dans cette partie est celle de la méthode LC-UV présentée dans ce chapitre. Il s'agit donc d'une colonne remplie de silice greffée C18 Symmetry Shield RP18 (Waters, 150 mm x 2,1 mm d.i., 3,5 μm). Le gradient et la composition de la phase mobile sont différents par rapport à la méthode LC-UV utilisée pour l'étude de la cocaïne et la BZE seules. La phase mobile est constituée d'eau (A) et de MeCN (B) avec 0,1 % d'acide formique pour les deux. Finalement, le tampon formate d'ammonium n'a pas été utilisé car des signaux plus importants ont été obtenus avec de l'eau acidifiée avec 0,1 % d'acide formique. Un gradient a été utilisé car l'EME étant une molécule très polaire, elle est éluée pratiquement au temps de rétention nulle même avec une phase mobile 100 % aqueuse. Le débit utilisé est de 0,2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ et le volume injecté est de 5 μL . Le gradient commence à 0 % de B jusqu'à 1,5 minutes, puis il augmente de 0 % jusqu'à 15 % en 1,5 minutes, ensuite il reste à 15 % pendant 5 minutes, et enfin il augmente jusqu'à 80 % en 2 minutes et reste à 80 % pendant 1 minute. Cette méthode sera par la suite nommée LC-MS Symmetry Shield, et elle est présentée en détail dans l'annexe 2. Les chromatogrammes correspondant à cette méthode sont présentés sur la Figure III- 2.

L'optimisation des paramètres de détection du triple quadripôle avait été réalisée dans le chapitre II, donc les chromatogrammes obtenus correspondent aux transitions suivantes :

Cocaïne (COC) : $m/z = 304 \rightarrow m/z = 182$

Benzoylcgonine (BZE) : $m/z = 290 \rightarrow m/z = 168$

Ecgonine méthylester (EME) : $m/z = 200 \rightarrow m/z = 182$

On constate que le pic de cocaïne et celui de BZE sont inversés pour la première fois, en effet, le changement de phase mobile a modifié fortement les interactions de ces molécules avec la phase stationnaire. On peut aussi noter que pour la colonne Zorbax SB18 utilisée en méthode conventionnelle dans le chapitre II (Annexe 2, méthode LC-MS conventionnelle), il n'y avait pas eu cet inversement des pics, donc les interactions avec la colonne Symmetry Shield utilisée ici semblent être assez différentes de celles de la colonne Zorbax SB18.

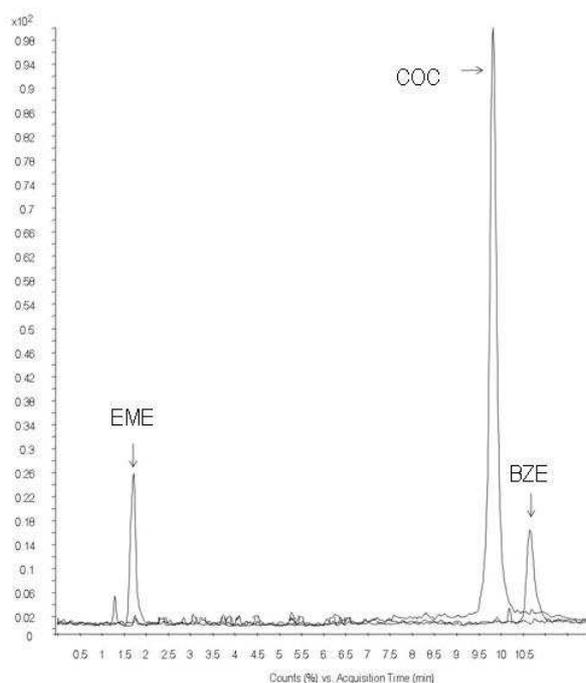


Figure III- 2 : Chromatogrammes LC-MS des transitions MRM de la cocaïne, la BZE et l'EME d'une solution dopée avec $0,5 \text{ ng.mL}^{-1}$ de chacune des molécules cibles. Méthode LC-MS Symmetry Shield décrite en annexe 2.

Dans ces conditions de travail, la cocaïne et la BZE sont séparées avec une résolution de 1,3 et le pic d'EME ne se trouve pas tout à fait au temps mort ($k = 0,3$). Les LDD sont de $0,02 \text{ ng.mL}^{-1}$, $0,08 \text{ ng.mL}^{-1}$ et $0,04 \text{ ng.mL}^{-1}$ pour la cocaïne, la BZE et l'EME respectivement. Les LDQ obtenues pour cette méthode sont de $0,08 \text{ ng.mL}^{-1}$, $0,20 \text{ ng.mL}^{-1}$ et $0,53 \text{ ng.mL}^{-1}$ pour la cocaïne, la BZE et l'EME respectivement. Une bonne linéarité a été obtenue pour un intervalle de concentration entre $0,5 \text{ ng.mL}^{-1}$ et 10 ng.mL^{-1} pour les trois molécules avec des coefficients de corrélation de régression linéaire supérieurs à 0,998 pour les trois molécules. Grâce à ce mode de détection beaucoup plus sensible, le gain en sensibilité est de l'ordre de 500 pour la cocaïne et de 100 pour la BZE par rapport à la détection UV. Nous disposons donc de deux méthodes plus ou moins sensibles, utilisables en fonction de la disponibilité des appareils, pour la caractérisation des MIP.

III.2 Synthèse d'un MIP sélectif pour la cocaïne

III.2.1 Discussion sur le choix des conditions de synthèse du MIP

Dans le chapitre I, une étude a été réalisée afin de recenser les différentes synthèses de MIP déjà effectuées et ciblées pour la cocaïne ou ses métabolites. La plupart de ces synthèses ont été effectuées afin de développer un capteur de cocaïne. Le Tableau III- 1 résume les conditions de synthèse utilisées au cours de ces divers travaux.

Molécule empreinte	Monomère(s) fonctionnel(s)	Agent(s) réticulant(s)	Solvant porogène	Mode d'initiation	Sélectivité	Observations	Applications	Source
Anilide de benzoylecgonine	MAA	TRIM	Toluène	UV puis thermique	$IF_{(BZE)}=5,61$ (MeCN/H ₂ O/CH ₃ COOH 98/1/1, v/v/v) $SPE_{(BZE)}(H_2O) : 77\%$ MIP et 23% NIP	Synthèse en parallèle avec EGDMA et en initiation thermique	SPE en milieu organique et aqueux purs	[131]
Cocaïne	MAA	EGDMA	Chloroforme	Thermique	$IF_{(COC)}=1,8$ $IF_{(BZE)}=1,09$ (MeCN) $IF_{(COC)}=0,96$ $IF_{(BZE)}=0,83$ (H ₂ O/CH ₃ COOH 95/5, v/v)	Les MIP ont subi un traitement de surface à l'huile minérale	Étude préliminaire pour l'application en capteurs	[132]
Cocaïne	Acide itaconique et acrylamide	EGDMA	DMF	UV puis thermique	$IF_{(COC)} = 1,8$ (chloroforme/CH ₃ COOH, 95/5, v/v)	Modélisation moléculaire utilisée initialement pour le choix du monomère fonctionnel	Étude préliminaire pour l'application en capteurs	[133]
Cocaïne	TFMAA	EGDMA	Toluène	UV puis thermique	$IF_{(COC)}=2,6$ (H ₂ O / CH ₃ COOH 80/20, v/v)	Synthèse en parallèle avec DMF mais moins de sélectivité	Étude préliminaire pour l'application en capteurs	[134]

Tableau III- 1 : Conditions de synthèse de MIP dédiés à la cocaïne et ses métabolites.

III.2.1.1 Choix du mode de polymérisation

Pour toutes les synthèses présentées dans le Tableau III- 1, les MIP ont été synthétisés par une approche non-covalente, donc pour être en accord avec les études antérieures, une approche non covalente a été utilisée pour la synthèse de MIP sélectifs pour la cocaïne dans ce travail. De même que pour l'approche de synthèse, le format de synthèse utilisé dans toutes les études antérieures est la polymérisation en bloc. C'est-à-dire que tous les réactifs sont mis en présence dans un tube en verre avec une quantité de solvant assez faible pour que le polymère puisse occuper la totalité du tube lors de la réaction. Par la suite, la réaction de polymérisation est initialisée photochimiquement et/ou thermiquement et le polymère ainsi obtenu est broyé et tamisé pour pouvoir l'utiliser sous forme de particules. La polymérisation en bloc a donc été choisie pour réaliser la synthèse des MIP au cours de ce travail pour conserver une certaine proximité avec les études antérieures mais aussi car elle est simple à mettre en œuvre. À la fin de chaque synthèse, le polymère en bloc obtenu a été récupéré en cassant le tube en verre utilisé comme réacteur. Ensuite, chaque polymère a été broyé dans un broyeur automatique avec des billes d'acier recouvertes de téflon, puis tamisé avec un tamiseur automatique pour l'obtention de particules avec des tailles entre 25 µm et 36 µm. Finalement, les particules les plus fines qui auraient pu rester attrapées suite au tamisage ont été éliminées par une sédimentation dans un mélange MeOH/H₂O 80/20 v/v. La sélectivité des différents supports a été évaluée par SPE, donc des cartouches d'extraction ont été préparées avec les particules en chargeant 25 mg d'adsorbant retenu entre deux frittés dans des cartouches de polypropylène de 1 mL. L'annexe 5 présente le protocole détaillé pour la synthèse de MIP en bloc, ainsi que leur broyage, tamisage et la mise en cartouche.

III.2.1.2 Choix de la molécule empreinte

Dans la majorité des études portant sur la synthèse d'un MIP pour la cocaïne, dont les conditions de synthèse et les performances sont rappelées dans le Tableau III- 1, la cocaïne a elle-même été prise comme molécule empreinte pour la synthèse du polymère imprimé. Il s'agit en effet d'une molécule qui a des propriétés basiques et des groupements polaires (Figure I- 1) dans sa structure, facilitant l'établissement de plusieurs sites d'interaction entre la molécule empreinte et les monomères fonctionnels [127]. En plus, l'utilisation de cette molécule peut servir à l'extraction de ses métabolites qui ont des structures assez analogues à celle de la cocaïne (Figure I- 2) comme cela semble être le cas pour la BZE (Tableau III- 1). Finalement, cette molécule empreinte n'inhibe pas la polymérisation radicalaire en chaîne, elle ne subit pas elle-même de polymérisations et elle est stable dans les conditions usuelles de synthèse des MIP, c'est-à-dire à des températures proches de 60°C ou à l'exposition à des radiations UV. C'est donc la cocaïne qui a été choisie comme molécule empreinte.

III.2.1.3 Choix du monomère fonctionnel

Considérant la structure et les fonctionnalités chimiques de la cocaïne, elle peut développer des interactions de type liaison hydrogène et/ou électrostatiques avec les monomères fonctionnels. La nature de ces interactions dépend du choix du monomère fonctionnel ainsi que du solvant utilisé comme porogène. L'utilisation d'un monomère acide est donc souhaitable pour créer des interactions polaires avec la cocaïne. Les monomères acides utilisés précédemment pour la synthèse de MIP sélectifs pour la cocaïne et ses métabolites sont : le MAA, l'acide itaconique et le TFMAA (Tableau III- 1). C'est le MAA, le plus souvent utilisé, qui a été choisi pour mener cette étude car il permet l'obtention des interactions souhaitées [131, 132], et c'est l'un des monomères les plus couramment utilisés et qui confère souvent une bonne sélectivité des MIP dédiés à la SPE [126]. Lors de l'utilisation d'une approche non-covalente, le monomère fonctionnel est généralement utilisé en excès par rapport à la molécule empreinte pour favoriser la formation du complexe monomère fonctionnel/molécule empreinte [121]. Par conséquent, un rapport molaire de 1/4 entre la molécule empreinte et le monomère fonctionnel, qui est majoritairement reporté dans la littérature pour la synthèse en bloc, a été utilisé.

III.2.1.4 Choix de l'agent réticulant

L'agent réticulant utilisé pour la synthèse d'un MIP a trois rôles principaux : il contrôle la morphologie de la matrice polymérique, il sert à stabiliser les cavités de reconnaissance sélective, et finalement il confère une stabilité mécanique au polymère [121]. Lors de la synthèse de copolymères, comme dans le cas des MIP, il est important de prendre en compte les réactivités relatives des monomères utilisés. D'ailleurs, pour une impression efficace, la réactivité de l'agent réticulant et celle du monomère fonctionnel doivent être proches. En effet, ceci permet une distribution plus homogène des monomères fonctionnels dans le réseau polymérique. En plus, pour stabiliser la structure polymérique, il est nécessaire d'avoir un niveau de réticulation important. Pour l'obtention de réseaux tridimensionnels, les agents réticulants doivent avoir plus d'une fonction polymérisable et ils se trouvent généralement en excès molaire par rapport aux autres réactifs. Cet excès d'agent réticulant entraîne la formation de matériaux macroporeux stables mécaniquement. La quantité d'agent réticulant doit rester tout de même contrôlée pour éviter de bloquer les cavités de reconnaissance spécifique. Le ratio utilisé pour cette étude est de 1 mol de molécule empreinte pour 20 mol d'agent réticulant, il s'agit d'un rapport assez souvent utilisé, y compris pour les synthèses de MIP cocaïne antérieures [131, 132, 134]. Lorsqu'un agent réticulant est choisi, il est aussi important de prendre en compte les interactions non spécifiques qu'il peut développer avec la molécule empreinte. Considérant que trois des quatre synthèses antérieures ont utilisé comme

agent réticulant l'EGDMA (Tableau III- 1), cet agent réticulant a donc été utilisé pour la synthèse du MIP cocaïne pour ce travail. De plus, il s'agit d'un agent réticulant couramment utilisé pour la synthèse de MIP, notamment lorsque le MAA est utilisé comme monomère fonctionnel, donc il semble être tout à fait adapté pour cette synthèse.

III.2.1.5 Choix du solvant porogène

Le solvant employé pour la synthèse d'un MIP a une importance capitale pour l'obtention d'une reconnaissance moléculaire car il doit permettre la stabilisation du complexe monomère fonctionnel/molécule empreinte. En effet, cette stabilité dépend des propriétés physico-chimiques du solvant utilisé [127]. Pour favoriser les interactions de type liaison hydrogène ou électrostatiques du complexe monomère fonctionnel/molécule empreinte, un solvant peu polaire et aprotique est nécessaire, comme le dichlorométhane, le chloroforme, le toluène ou même le MeCN. En plus de renforcer les interactions du complexe de pré-polymérisation, le solvant doit pouvoir solubiliser tous les réactifs utilisés pour la synthèse du MIP pour que la polymérisation se produise dans une seule phase. Enfin, le solvant doit aussi favoriser la formation de pores dans le polymère [121], d'où le qualificatif de porogène. Dans les études antérieures, les solvants utilisés étaient le toluène, le DMF et le chloroforme (Tableau III- 1), cependant, dans cette étude c'est le MeCN qui a été choisi comme solvant porogène car il permet d'obtenir le même type d'interactions que les autres solvants. En plus il s'agit d'un solvant couramment utilisé dans notre laboratoire pour la synthèse de MIP de diverses molécules et qui en général permet d'obtenir une bonne sélectivité des MIP résultants [130, 203, 206].

III.2.1.6 Choix du mode d'initiation

La polymérisation radicalaire en chaîne a été utilisée pour toutes les synthèses de MIP réalisées précédemment et dans tous les cas, l'initiateur employé était l'AIBN, un azonitrile qui peut être initié par voie photochimique ainsi que par voie thermique. D'ailleurs ces deux types d'initiation ont déjà été utilisés, l'initiation photochimique étant la plus courante des deux (Tableau III- 1). En effet, l'intérêt d'une synthèse initiée photochimiquement est que la température de synthèse peut être diminuée de façon à mieux stabiliser le complexe molécule empreinte/monomère fonctionnel. Cependant, cette baisse de température peut augmenter la durée de la synthèse et avoir un effet sur la réticulation du polymère obtenu ainsi que sur la bonne formation des cavités spécifiques. Il peut être intéressant d'étudier les deux modes de

polymérisation, thermique et photochimique, pour pouvoir choisir celui qui donne lieu à un MIP plus sélectif. La voie thermique a été étudiée en premier.

III.2.1.7 Conclusion : bilan sur les conditions de synthèse des MIP cocaïne

Les conditions de synthèse choisies pour la synthèse de MIP sélectifs pour la cocaïne sont résumées dans le Tableau III- 2. La synthèse de MIP a été réalisée dans ces conditions avec une initiation thermique (MIPth). Un NIP, a été synthétisé dans les mêmes conditions que le MIP mais sans la molécule empreinte, de façon à pouvoir confirmer la présence de cavités spécifiques dans le MIP. Des cartouches de 25 mg de NIP et de MIP ont donc été préparées.

Paramètre	Choix
Molécule empreinte (ME)	Cocaïne
Monomère fonctionnel (MF)	MAA
Agent réticulant (AR)	EGDMA
ME/MF/AR (mol/mol/mol)	1/4/20
Solvant porogène (P)	MeCN
P/ME (mL/mmol)	5,6
Initiateur	AIBN
Quantité d'initiateur (mg/mmol)	40
Type d'initiation	Thermique 24h à 60°C

Tableau III- 2 : Conditions de synthèse sélectionnées pour la synthèse du MIPth.

III.2.2 Développement d'un protocole d'extraction sélectif sur le MIPth en milieu organique

III.2.2.1 Relargage

La première synthèse de MIP pour l'extraction sélective de la cocaïne a été initiée thermiquement (MIPth). Après la mise en cartouches du MIPth et du NIPth correspondant, une série de lavages ont été réalisés pour éliminer les excédents de réactifs, et surtout pour éliminer la molécule empreinte de façon à pouvoir effectuer des protocoles d'extraction quantitatifs et répétables. Ces lavages sont très importants car, en effet, une partie du composé

utilisé pour la synthèse peut rester piégée dans le réseau polymérique puis être éluée à un moment donné du support. En ce qui concerne le MIPth synthétisé dans ce travail, une première série de lavages de la cartouche a été réalisée avec 10 mL de MeCN, pour éliminer les réactifs de polymérisation, suivis de 10 mL de MeOH contenant 5 % d'acide acétique. Ce deuxième lavage a été choisi car les interactions attendues de la cocaïne avec le MIPth sont principalement des liaisons H, qui peuvent être rompues avec du MeOH, mais aussi des interactions électrostatiques, qui peuvent être rompues grâce à l'action de l'acide acétique. Après ces premiers lavages, plusieurs solvants ont été percolés sur les cartouches de MIPth et analysés par la suite par LC-UV pour vérifier si la cocaïne avait en effet été complètement éluée. Les solvants utilisés pour cette étude étaient du MeCN, un mélange MeCN/MeOH 95/5 v/v et un mélange MeOH/acide acétique 95/5 v/v, et pour les trois solvants utilisés un volume de 1 mL a été percolé. Le résultat de cette étude a montré que dans les trois solutions percolées il y avait une quantité importante de cocaïne relarguée, et plus particulièrement dans le solvant acidifié puisqu'il contenait plus de 200 ng de cocaïne.

Le MIPth a donc été reconditionné avec 4 mL de MeCN et une nouvelle série de 3 lavages de 10 mL chacun a été effectuée avec un mélange MeOH/acide acétique 95/5 v/v. Les solutions de lavage ainsi obtenues ont été analysées et de la cocaïne a été détectée par LC-UV uniquement pour le premier lavage. Il semblait donc que la cocaïne aurait pu être complètement éluée après ces lavages. Un nouveau profil blanc, dans les mêmes conditions que celui décrit précédemment, a alors été effectué. Malheureusement, de la cocaïne était toujours présente dans les différentes fractions analysées jusqu'à des quantités de 100 ng. Une nouvelle solution de lavage a ensuite été utilisée avec une solution très acide afin de rompre les liaisons électrostatiques établies avec les cavités du MIPth. Une solution contenant de l'acide chlorhydrique à une concentration de 0,1 mol.L⁻¹ donc avec un pH = 1 a été appliquée. Après ce lavage, le MIPth a été reconditionné dans le MeCN et le profil blanc obtenu juste après le reconditionnement ne présentait aucune trace de cocaïne visible par LC-UV.

Il semblait donc que le relargage de la cocaïne du MIPth était enfin éliminé. Ainsi, quelques jours plus tard, un autre profil blanc correspondant à la percolation de 5 mL de MeCN, puis 2 mL de MeCN, puis 2 mL de MeCN/MeOH 95/5 v/v, puis finalement 3 mL de MeOH/acide acétique 95/5 v/v a été étudié. Seule la première fraction analysée, donc les premiers 5 mL de MeCN percolés, contenait de la cocaïne à une teneur de 10 ng. Des quantités rémanentes de cocaïne étaient donc encore présentes dans le MIPth mais en quantités plus faibles. Il semblerait que pendant de longues périodes de rangement de la cartouche de MIPth, de la cocaïne rémanente peut migrer par diffusion lente dans le polymère et par la suite être éluée. Il a donc été décidé d'inclure une étape de conditionnement des cartouches avec 5 mL de MeCN avant d'effectuer une procédure d'extraction. En plus de cette étape de conditionnement, à la fin de chaque procédure d'extraction et avant le stockage des cartouches, une étape de rinçage et de reconditionnement avec 1 mL de MeOH/acide acétique

95/5 v/v, 3 mL de MeOH puis 5 mL de MeCN a été fixé pour éliminer toute trace de cocaïne et d'acide acétique qui pourraient rester dans la cartouche, de façon à éviter d'affecter la rétention de la cocaïne pendant le stockage et lors des procédures d'extraction suivantes. Deux profils blancs (1 mL MeCN, 1 mL MeCN/MeOH 95/5 v/v, 1 mL MeOH/acide acétique 95/5 v/v) ont alors été appliqués avec une étape de conditionnement utilisant 5 mL de MeCN et une étape de rinçage après le profil. Les fractions de ces deux profils n'ont pas montré de présence de cocaïne, ce qui implique que le relargage a enfin été contrôlé.

Toutes les procédures effectuées sur le MIPth ont été réalisées en parallèle sur le NIPth de façon à ce que les deux supports aient subi les mêmes traitements.

III.2.2.2 Sélectivité du MIPth et étude des mécanismes de rétention

Une fois le relargage de la cocaïne contrôlé, l'étape suivante a consisté à définir les conditions de rétention et d'élution du MIPth et donc d'élucider les mécanismes mis en jeu.

Un volume de 1 mL d'une solution de percolation contenant $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cocaïne dans du MeCN a donc été percolé sur les cartouches de NIPth et de MIPth. En effet, le MeCN a été utilisé pour la percolation car, étant le solvant utilisé pour la synthèse du MIPth, il devrait favoriser la rétention de la cocaïne sur le MIPth. Après la percolation de l'échantillon dopé, trois fractions de 1 mL de MeCN ont été percolées les unes à la suite des autres sur le MIPth et le NIPth pour évaluer le pouvoir de rétention du MIP dans ce milieu. Par la suite, les cartouches ont été lavées comme indiqué dans la partie précédente (1 mL MeOH/acide acétique 95/5 v/v + 3 mL MeOH + 5 mL MeCN). Les rendements d'extraction ainsi obtenus sont reportés en Figure III- 3.

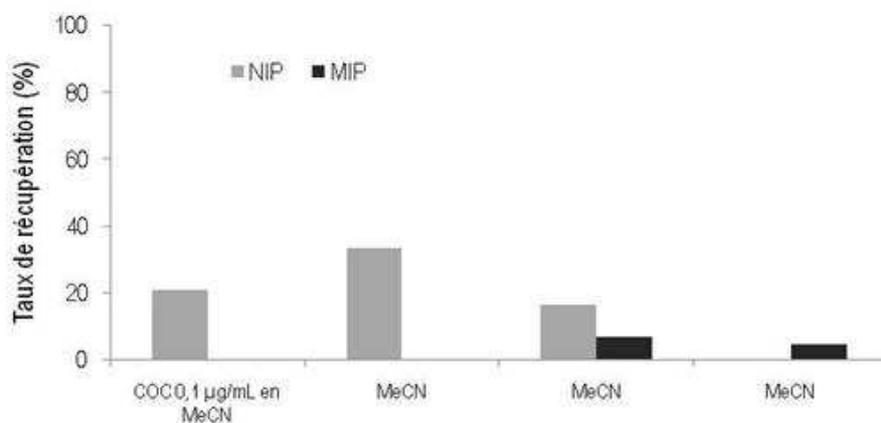


Figure III- 3 : Evaluation de la rétention de la cocaïne sur le MIPth et le NIPth lors de l'utilisation de MeCN comme solvant d'élution. Fractions de 1 mL.

Le MeCN n'a effectivement pas une force éluante suffisante pour éluer la cocaïne du MIPth considérant que seulement 10 % de la cocaïne est éluee par 3 mL de ce solvant. Cependant pour le NIPth, environ 60 % de la cocaïne est éluee entre la percolation et le premier lavage avec du MeCN. Ce résultat montre qu'il y a une vraie différence de rétention de la cocaïne entre le NIPth et le MIPth soulignant ainsi la présence de cavités spécifiques.

Le MeCN n'ayant pas élué la cocaïne du MIPth, il a été nécessaire de trouver un solvant plus approprié. Considérant que la cocaïne peut créer des interactions par liaison hydrogène avec les cavités spécifiques du MIPth, le MeOH, solvant protique polaire, a été évalué pour son élution. Ainsi, 1 mL d'une solution de MeCN dopés avec $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cocaïne a été percolé sur les cartouches de NIPth et MIPth, puis cinq fractions de 1 mL de MeOH ont été percolées et analysées par LC-UV. Les taux de récupération obtenus pour les différentes fractions sont reportés en Figure III- 4.

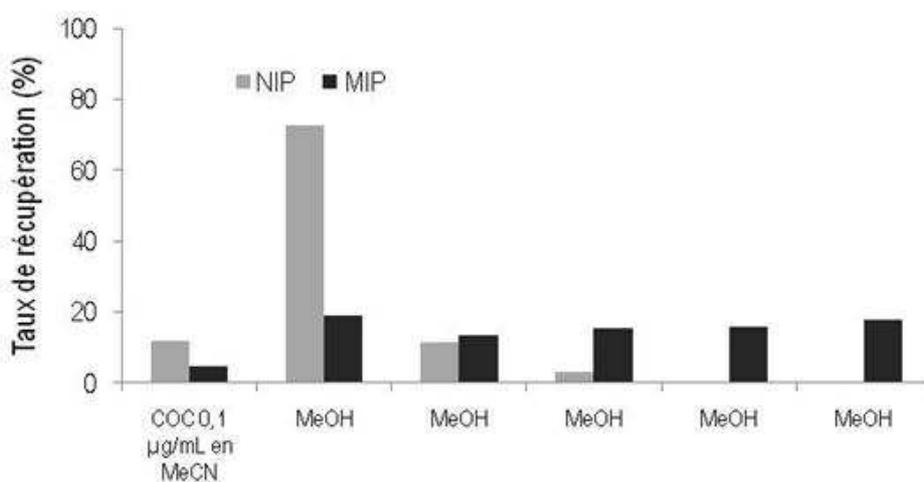


Figure III- 4 : Evaluation de la rétention de la cocaïne sur le MIPth et le NIPth lors de l'utilisation de MeOH comme solvant d'élution. Fractions de 1 mL.

Le rendement d'élution de la cocaïne pour chacune des fractions analysées est proche de 15 % et les 5 mL de MeOH ont permis d'éluer plus de 80 % de la cocaïne percolée du MIPth. Le MeOH, bien qu'il arrive à éluer la quasi-totalité de la cocaïne, n'est pas suffisamment éluant car le volume utilisé est très grand par rapport au volume percolé. Idéalement, l'étape d'élution devrait se faire avec un faible volume de solvant pour pouvoir pré-concentrer l'échantillon en plus de le purifier, donc le MeOH ne convient pas pour cette étape. En ce qui concerne le NIPth, la cocaïne est faiblement retenue en milieu MeOH, indiquant que le MeOH permet de rompre des liaisons H non spécifiques développées avec le NIPth.

Un deuxième type d'interactions spécifiques de la cocaïne avec le MIPth pourraient exister. Il s'agit des interactions électrostatiques puisque la cocaïne est une base qui peut se trouver protonée, donc avec une charge positive, et le monomère fonctionnel (MAA) est un acide qui pourrait se trouver déprotoné, donc avec une charge négative. Pour rompre ce type

d'interactions, l'effet du MeOH contenant 5 % d'acide acétique a été évalué. Pour cette étude, 1 mL d'une solution de MeCN dopé avec $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cocaïne a été percolé sur les cartouches de NIPth et MIPth, puis trois fractions de 1 mL de MeOH/acide acétique 95/5 v/v ont été percolées et analysées par LC-UV. Les taux de récupération obtenus sont reportés en Figure III- 5.

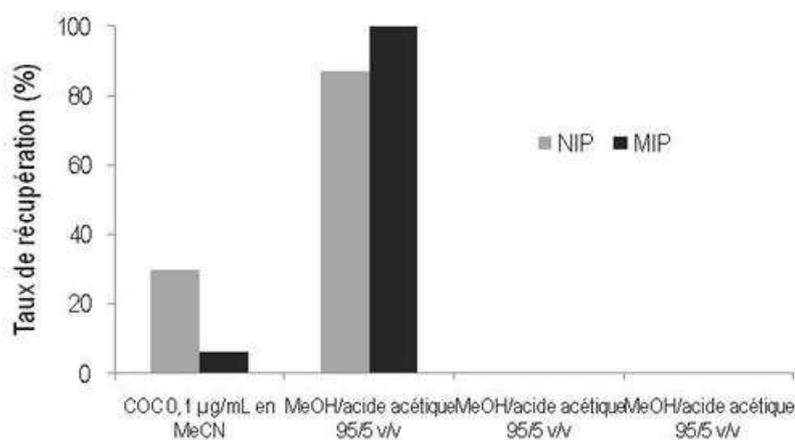


Figure III- 5 : Évaluation de la rétention de la cocaïne sur le MIPth et le NIPth lors de l'utilisation de MeOH/acide acétique 95/5 v/v comme solvant d'éluant. Fractions de 1 mL.

Finalement, avec l'ajout de 5 % d'acide acétique au MeOH, l'éluant de la cocaïne du MIPth est totale avec seulement 1 mL de MeOH/acide acétique 95/5 v/v percolé. Ces résultats confirment la présence d'interactions électrostatiques entre la cocaïne et les cavités spécifiques du MIPth. La force éluante est en revanche trop grande pour différencier le MIPth du NIPth. Ainsi, pour que l'extraction soit bien considérée comme un protocole sélectif, il est nécessaire de développer une étape de lavage permettant d'éliminer les interactions non-spécifiques avec le MIPth.

III.2.2.3 Optimisation des profils d'éluant

Les interactions que le NIPth développe avec les molécules cibles sont des interactions non spécifiques développées en surface du polymère. Donc, pour confirmer la présence de cavités spécifiques dans le MIPth, et donc pour obtenir un protocole d'extraction sélectif, il faut développer une étape de lavage qui puisse, dans le cas idéal, éluer la totalité de la cocaïne et la BZE du NIPth, et donc rompre les interactions de surface, sans les éluer du MIPth qui doit pouvoir générer des interactions multiples avec la molécule de cocaïne grâce aux cavités en trois dimensions.

Dans la partie précédente, la rétention de la cocaïne a été évaluée sur le NIPth et le MIPth avec trois types de solvants qui sont du MeCN (Figure III- 3), du MeOH (Figure III- 4) et du MeOH/acide acétique 95/5 v/v (Figure III- 5). Lors de l'utilisation du MeCN comme solvant d'élution, la totalité de la cocaïne était retenue sur le MIPth, tandis que sur le NIPth, environ 60 % de la cocaïne était éluée entre la percolation et le premier millilitre de MeCN percolé. Ce résultat a montré que parmi les interactions non spécifiques du NIPth, une grande partie sont des interactions polaires car le MeCN permet de les rompre moins efficacement que le MeOH. Donc il y a certainement quelques interactions non-spécifiques de la cocaïne avec le NIPth du type liaison hydrogène. Donc pour trouver des conditions de lavage correctes pour la cocaïne, des mélanges de MeCN et de MeOH peuvent être utilisés. De plus, considérant que le métabolite principal de la cocaïne, la BZE, se trouve souvent à une concentration plus importante que la cocaïne dans les matrices biologiques, notamment dans les matrices aqueuses, il est intéressant d'étudier aussi sa rétention sur le MIPth.

Pour évaluer la rétention de la BZE sur le MIPth, un premier profil d'extraction a été effectué avec des lavages utilisant du MeCN pur pour limiter la force éluante de ce lavage. Ainsi, 1 mL d'une solution de MeCN contenant $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cocaïne et BZE a été percolée sur le NIPth et le MIPth. Ensuite, des lavages avec du MeCN ont été effectués, puis l'élution a été réalisée avec une solution de MeOH/acide acétique 95/5 v/v. Les profils d'extraction ainsi obtenus pour la cocaïne et pour la BZE sont présentés en Figure III- 6.

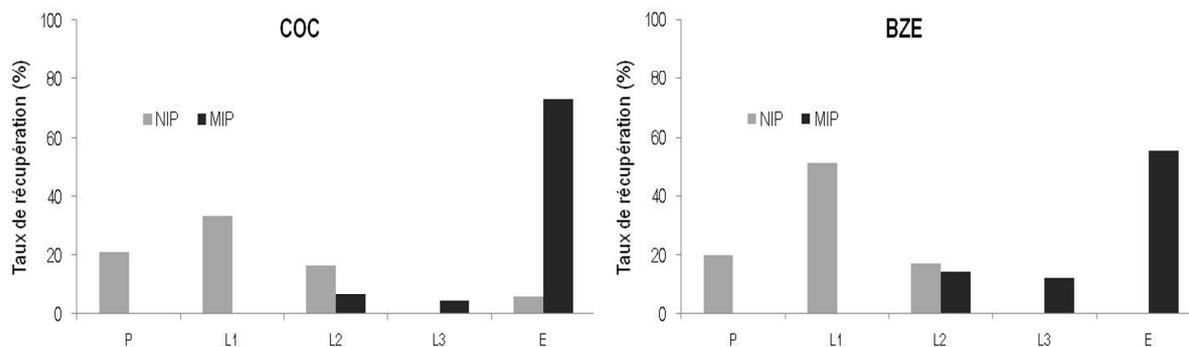


Figure III- 6 : Profils d'extraction de la cocaïne et la BZE avec le MIPth et le NIPth. Percolation (P) : 1mL MeCN dopé de cocaïne et BZE à $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, lavages (L1, L2, L3) : 1 mL MeCN, élution : 1 mL MeOH/acide acétique 95/5 v/v.

Dans ces conditions, l'extraction de la cocaïne est sélective et confirme les résultats précédents avec des rendements à l'élution de 6 % pour le NIPth et 75 % sur le MIPth. Dans le cas de la BZE, une extraction sélective est aussi obtenue avec un rendement à l'élution de 55 % sur le MIPth et 0 % sur le NIPth. Cependant, le rendement sur le MIPth n'est pas très élevé car les étapes de lavage L2 et L3 éluent une partie de la BZE du MIPth. Si les lavages L2 et L3 étaient éliminés, le protocole serait toujours sélectif pour la cocaïne et la BZE, mais conduisant à un taux de récupération de 20 % sur le NIPth pour la BZE.

Pour améliorer la sélectivité de l'étape de lavage, des quantités croissantes de MeOH (0 %, 1 %, 2,5 % et 5 %) ont été ajoutées aux fractions de lavage après une première étape de lavage avec 1 mL de MeCN. En ce qui concerne la cocaïne, l'augmentation du pourcentage de MeOH dans l'échantillon conduit parallèlement à une diminution des interactions non spécifiques observées sur le NIPth. Cependant, à partir de 2,5 % de MeOH, une partie de la cocaïne est aussi éluée du MIPth lors l'étape de lavage. Finalement, le protocole le plus sélectif est celui incluant un lavage à 5 % de MeOH puisque la totalité des interactions non spécifiques sont éliminées (rendement d'éluion nul sur le NIPth) et que le rendement à l'éluion pour le MIPth est assez élevé (77 %). Dans le cas de la BZE, tous les protocoles sont sélectifs, mais il y a cependant une éluion trop importante de la BZE du MIPth à partir d'une teneur de 2,5 % de MeOH dans l'échantillon puisqu'un rendement de 30 % seulement est obtenu sur le MIPth.

Ainsi, le protocole le mieux adapté pour l'extraction simultanée de la cocaïne et de la BZE dans un milieu MeCN pur serait celui comportant un deuxième lavage avec 1% de MeOH dans du MeCN car il permet de réduire une partie des interactions non spécifiques en même temps qu'il conserve de bons rendements sur le MIPth à l'éluion. De ce fait, la répétabilité de ce protocole a été testée et les profils d'extraction correspondants sont présentés en Figure III-7. Une bonne répétabilité est obtenue avec des taux de récupération pour la cocaïne de 108 ± 3 % sur le MIPth et de 30 ± 2 % sur le NIPth. Pour la BZE les taux de récupération sont de 84 ± 2 % pour le MIPth et de 12 ± 4 % pour le NIP.

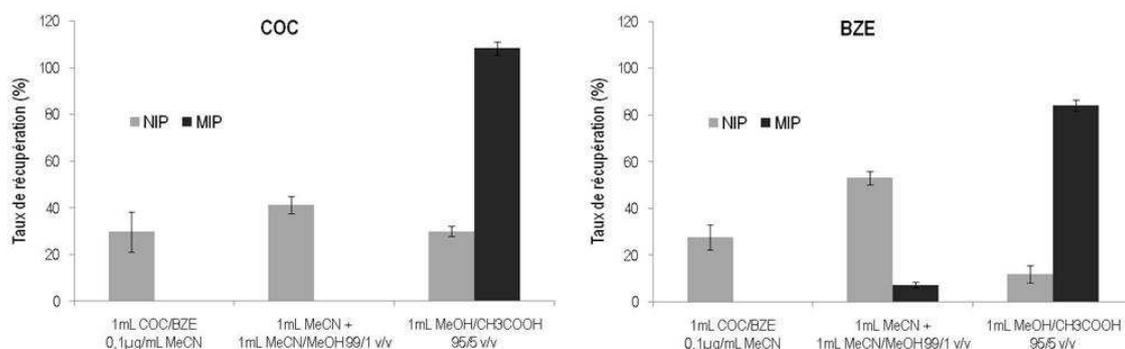


Figure III- 7 : Profils d'extraction optimisés de la cocaïne et la BZE sur le MIP th et sur le NIPth (n = 3).

Le protocole optimisé obtenu permet donc d'extraire sélectivement la cocaïne et la BZE tout en conservant toutefois quelques interactions non-spécifiques pour la cocaïne afin de ne pas éluier la BZE du MIPth.

III.2.2.4 Conclusion

La procédure de synthèse développée (MIPth Tableau III- 2) a conduit à l'obtention d'un MIP sélectif pour la cocaïne, mais aussi pour la BZE. Il est apparu intéressant d'évaluer par la suite l'initiation par voie photochimique qui devrait permettre de moins déstabiliser le complexe molécule empreinte/monomère fonctionnel au cours de la synthèse.

III.2.3 Caractérisation du MIP UV obtenu par voie photochimique

Le MIP UV ayant été obtenu par une initiation par voie photochimique (MIP UV/NIP UV), a été soumis aux mêmes étapes de lavage que celles utilisées pour éliminer la molécule empreinte pour le MIPth. Il en a été de même pour l'étape de conditionnement et de rinçage des cartouches. Le relargage de cocaïne du MIP UV a ainsi été contrôlé comme dans le cas du MIPth puisque les profils blancs réalisés par la suite ne présentaient pas de pics pour la cocaïne en LC-UV.

III.2.3.1 Solvant d'élution

Comme dans le cas du MIPth, le solvant d'élution a été étudié pour pouvoir éluer la cocaïne et la BZE du MIP UV avec un faible volume de solvant. Le MeCN n'a pas été étudié car il avait été démontré que pour le MIPth il n'arrivait pas à éluer la cocaïne, il est donc très improbable que celle-ci soit éluee du MIP UV avec du MeCN. Le pouvoir éluant du MeOH a été évalué et a conduit à un comportement assez proche de celui du MIPth (Figure III- 4). Comme dans le cas de ce dernier, il s'est avéré nécessaire d'y ajouter un agent qui permette de rompre les interactions électrostatiques, donc de l'acide acétique. Ainsi, comme dans le cas du MIPth, du MeOH contenant 5 % d'acide acétique a donc été utilisé pour l'étape d'élution. 1 mL d'une solution de MeCN dopé avec $0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de cocaïne et de BZE a été percolé sur les cartouches de NIP UV et MIP UV, puis trois fractions de 1 mL de MeOH/acide acétique 95/5 v/v ont été percolées par la suite les unes après les autres et analysées par LC-UV. Le résultat obtenu est assez encore semblable à celui du MIPth (Figure III- 5) : la cocaïne et la BZE sont éluees du MIP UV dès le premier millilitre percolé de MeOH/CH₃COOH 95/5 v/v. En effet, pour les deux MIP synthétisés, le même type d'interactions de la cocaïne et la BZE avec les cavités spécifiques sont attendues puisque les réactifs sont exactement les mêmes, il est donc normal d'avoir des comportements semblables entre les deux supports. Le solvant d'élution a donc été fixé à 1 mL de MeOH/CH₃COOH 95/5 v/v, et par la suite l'étape de lavage a été étudiée.

III.2.3.2 Solvant de lavage et profil optimisé

Les premiers lavages évalués ont consisté à percoler une solution de MeCN contenant 5 % de MeOH, puis du MeOH pur après la percolation de 1 mL d'une solution de MeCN dopée avec $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cocaïne et de BZE, l'élution étant assurée par la percolation de 1 mL de MeOH/CH₃COOH 95/5 v/v. Les résultats ainsi obtenus sont présentés en Figure III- 8.

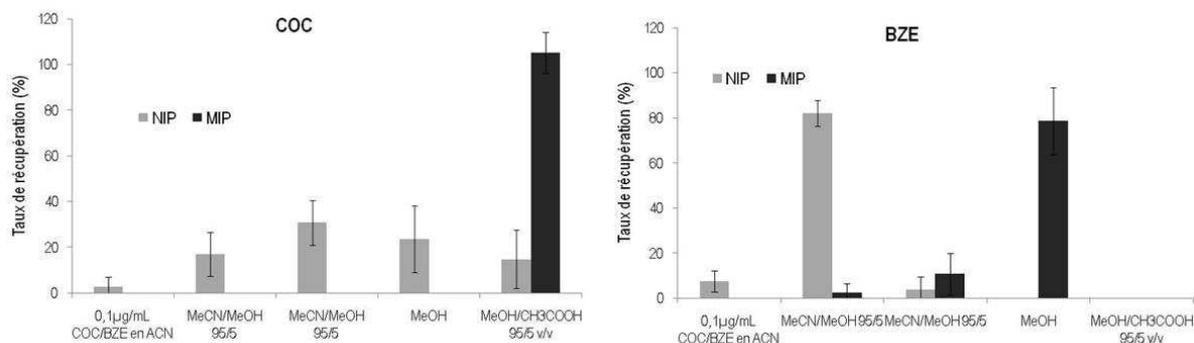


Figure III- 8 : Evaluation de solvants de lavage pour les profils d'extraction de la cocaïne et la BZE avec le MIP UV et le NIP UV (n=3). Fractions de 1 mL.

Pour la cocaïne, la procédure d'extraction est bien sélective puisque à l'élution on retrouve $105 \pm 9 \%$ sur le MIP UV et seulement $15 \pm 13 \%$ sur le NIP UV. Une importante différence est observée par rapport au MIPth puisque le MIP UV retient bien la cocaïne même avec 5 % de MeOH dans l'étape de lavage. Donc le MIP UV présente une plus forte rétention vis-à-vis de la cocaïne que le MIPth. Cependant, c'est aussi le cas du NIP UV, ce qui veut dire que cette augmentation de la rétention n'est pas due uniquement à des interactions spécifiques et donc à l'augmentation du nombre de cavités. Dans le cas de la BZE, un profil sélectif peut être obtenu si le protocole s'arrête à l'étape du lavage avec 5 % de MeOH dans le MeCN puisque à ce moment-là les rendements de la BZE sont de $79 \pm 15 \%$ pour le MIP UV et de 0 % pour le NIP UV. Ainsi, une rétention plus forte de la BZE sur le MIP UV et du NIP UV par rapport au MIPth et au NIPth respectivement est observée.

Même si pour ce même protocole d'extraction, la BZE et la cocaïne peuvent être extraites sélectivement, les fractions où se retrouvent ces deux molécules sont différentes. Comme la BZE présente une rétention moins importante que la cocaïne sur le MIP UV, elle est éluée plus tôt. De nouveaux essais ont donc été réalisés en vue de récupérer sélectivement les deux molécules dans une même fraction d'élution du profil d'extraction. La Figure III- 9 présente les résultats obtenus après la percolation de 1 mL d'une solution de MeCN dopée avec $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cocaïne et de BZE, suivi d'un premier lavage de 1 mL avec du MeCN, puis un deuxième lavage de 1 mL d'une solution de MeCN avec 2,5 % de MeOH, et finalement l'élution avec 1 mL d'une solution de MeOH avec 5 % d'acide acétique.

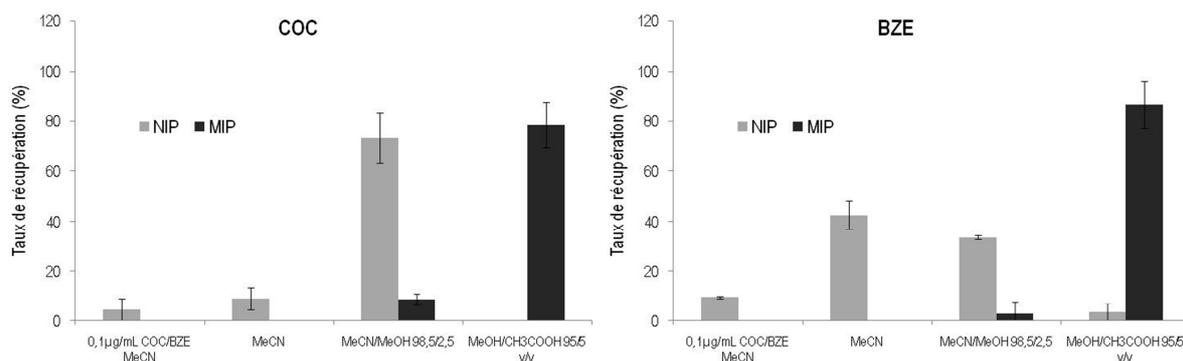


Figure III- 9 : Profils d'extraction optimisés de la cocaïne et la BZE avec le MIP UV et le NIP UV. Fractions de 1 mL.

Le protocole obtenu avec ces nouveaux lavages est sélectif pour la cocaïne et pour la BZE qui se retrouvent toutes deux éluées du MIP UV dans la même fraction d'élution. Le lavage au MeCN ne semble pas apporter de sélectivité pour la rétention de la cocaïne, mais il est vraiment nécessaire pour éluer une partie de la BZE du NIP UV. Le deuxième lavage, bien que moins éluant que celui utilisé en Figure III- 8, permet d'éliminer les interactions non-spécifiques de la cocaïne sur le NIP UV. Il se pourrait que le lavage avec du MeCN ait facilité l'élution de la cocaïne.

Étape	Volume	Solvant
Conditionnement	5 mL	MeCN
Percolation	1 mL	Solution de MeCN dopée avec COC et BZE
Lavages	1 mL	MeCN
	1 mL	MeCN/MeOH 97,5/2,5 (v/v)
Élution	1 mL	MeOH/acide acétique 95/5 (v/v)
Rinçage	1 mL	MeOH/acide acétique 95/5 (v/v)
	3 mL	MeOH
	5 mL	MeCN

Tableau III- 3 : Procédure d'extraction optimisée de la cocaïne et la BZE sur le MIP UV et le NIP UV.

Ainsi, il apparaît que le MIP UV permet aussi l'extraction sélective de la cocaïne et de la BZE d'un milieu MeCN avec la procédure décrite dans le Tableau III- 3. Il semblerait que le MIP UV conduise à une meilleure rétention que le MIPth, et en développant moins d'interactions non spécifiques au regard des plus faibles rendements obtenus sur le NIP UV. Pour la suite c'est donc le MIP UV, qui sera caractérisé et appliqué à l'extraction sélective dans des matrices biologiques.

Cette étude a montré que pour la rétention sélective de la cocaïne et de la BZE, l'initiation photochimique à 15°C apporte une sélectivité et une rétention plus importantes que l'initiation thermique à 60°C. C'est certainement la différence de température qui est à l'origine des différences observées entre les deux MIP [128]. En effet, à 15°C le complexe monomère fonctionnel/molécule empreinte est certainement plus stable qu'à 60°C et donc les

interactions dans les cavités du MIP UV doivent être plus fortes que celles du MIP th. Il faut, après cette étude de sélectivité, poursuivre la caractérisation du support.

III.3 Caractérisation du MIP UV en milieu organique

III.3.1 Étude de la capacité du MIP UV

La reconnaissance spécifique de la cocaïne et de la BZE a été évaluée montrant d'excellents résultats en termes de sélectivité. Cette sélectivité résulte de la présence de cavités spécifiques des molécules ciblées dont le nombre doit être suffisamment élevé pour permettre la rétention de ces deux composés à des niveaux de concentration élevés. Il est donc important de déterminer la capacité du support qui correspond à la quantité maximale d'un composé qui peut être retenue par le MIP utilisé dans des conditions d'extraction particulières. Cette capacité peut être déterminée par le tracé d'une courbe de saturation qui est obtenue en étudiant la quantité de composé cible extraite, en fonction de la quantité percolée de ce composé sur MIP pour un volume constant de solution contenant des quantités croissantes d'analyte [125]. Ainsi, pour poursuivre la caractérisation du MIP UV, sa capacité pour la rétention de la cocaïne a donc été évaluée. Pour ce faire, le protocole d'extraction optimisé pour le MIP UV a été utilisé (Tableau III- 3) et appliqué à des fractions de MeCN dopées par des concentrations croissantes de cocaïne, en effectuant à chaque fois les différentes étapes du protocole d'extraction optimisé. Les fractions d'élution ont ainsi été récupérées, évaporées, reprises en eau/MeCN 90/10 (%v/v), et analysées par LC-UV. La même procédure a été effectuée pour le NIP UV pour confirmer la faible rétention de la cocaïne et démontrer ainsi que la nature de la rétention de la cocaïne dans les cavités du MIP UV est purement sélective. La courbe de saturation obtenue est représentée sur la Figure III- 10.

La courbe de saturation pour le MIP UV présente deux parties distinctes. Pour de faibles quantités de cocaïne percolée, la quantité extraite augmente rapidement et de façon linéaire indiquant que le rendement d'extraction de la cocaïne est constant. Ce rendement est donné par la pente de la droite reliant les différents points de cette partie linéaire, c'est-à-dire pour des quantités de cocaïne percolée entre 4 µg et 50 µg. Le rendement correspondant est égal à 88 %. Cette valeur est en accord avec les rendements obtenus pour le MIP UV avec le même protocole d'extraction dans la partie précédente (Figure III- 9). Dans la deuxième partie de la courbe, un plateau est obtenu pour des quantités élevées de cocaïne percolées. En effet, lorsque les sites d'interaction spécifique sont saturés, il y a une perte de rendement puisque l'excès de cocaïne n'est pas retenu, et la capacité du support est atteinte.

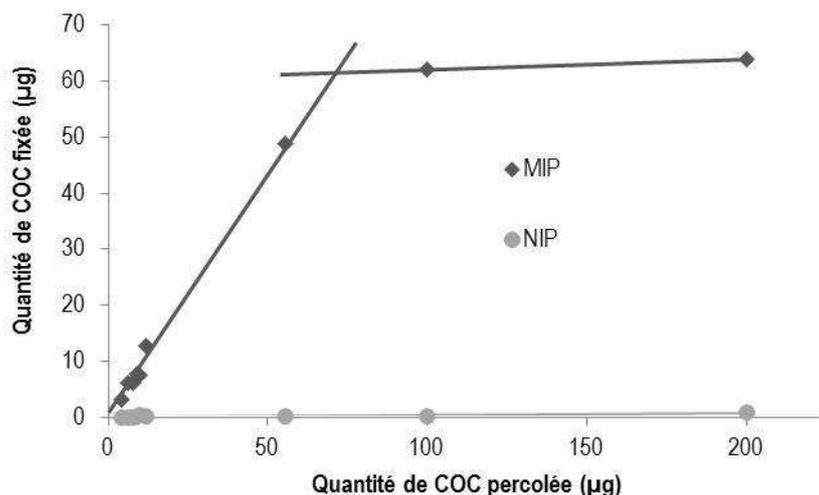


Figure III- 10 : Courbes de saturation du MIP UV (◆) et du NIP UV (●) correspondant pour la cocaïne lors de son extraction après la percolation de 1 mL de solution de MeCN contenant des concentrations croissantes de cocaïne. Le protocole d'extraction est détaillé dans le Tableau III- 3.

Le point d'intersection entre les deux droites peut être considéré comme la quantité maximale de cocaïne retenue avec un rendement constant sur le MIP UV, ce qui correspond à une quantité de 68 µg de cocaïne. La cartouche contenant 25 mg d'adsorbant, la capacité obtenue est alors de 2,72 mg.g⁻¹ de MIP UV soit 8,96 µmol.g⁻¹. Au-delà de cette valeur, les analyses quantitatives ne sont pas fiables car le rendement d'extraction n'est plus constant.

La capacité du MIP obtenue pour la cocaïne est en accord avec des valeurs couramment retrouvées dans la littérature, entre 1 µmol.g⁻¹ et 40 µg.mol⁻¹ [125]. Cette capacité est aussi suffisante pour l'analyse de traces de cocaïne dans des matrices biologiques (voir Tableau I- 2). En ce qui concerne le NIP UV, le rendement d'extraction est nul. Ce résultat confirme que la capacité du MIP provient bien de la présence de cavités spécifiques car il n'y a pas d'interactions non-spécifiques générées par le support non imprimé obtenu dans des conditions de synthèse similaires. L'étude en parallèle de la rétention de la cocaïne sur le NIP UV a donc confirmé encore une fois l'importante sélectivité du MIP UV pour cette molécule.

III.3.2 Étude de la répétabilité intercartouches

Lors de l'optimisation du protocole d'extraction sur ce MIP UV, la répétabilité du protocole avait été étudiée pour une même paire de cartouches de NIP UV et de MIP UV (Figure III- 9). Dans cette étude, les écarts type obtenus ne dépassent pas 9 % pour le MIP UV, et sont même inférieurs à 6 % pour le NIP UV (n = 3). Ceci montre d'une part que le problème de relargage souvent associé à l'utilisation de MIP est contrôlé, sinon le protocole d'extraction ne serait

pas répétable. D'autre part, ces résultats montrent que les cartouches peuvent être utilisées plusieurs fois sans qu'elles ne perdent leur sélectivité. D'ailleurs, les premières cartouches préparées ont pu être utilisées pendant toute la durée de la thèse sans qu'une perte de sélectivité n'ait été observée, même après le passage d'échantillons biologiques dans les cartouches.

En ce qui concerne la répétabilité d'une cartouche à l'autre, trois cartouches différentes de NIP et de MIP ont été préparées et lavées de la même façon. Ensuite le protocole d'extraction optimisé (Tableau III- 3) a été appliqué à ces trois paires de cartouches de NIP et MIP et les fractions du profil d'extraction ont été analysées par LC-UV. Les moyennes et écarts type obtenus sont présentés sur le Tableau III- 4

Etape	BZE NIP		BZE MIP		COC NIP		COC MIP	
	moyenne	ecart type						
Percolation	11	5	0	0	2	3	0	0
Lavage 1	43	1	0	0	5	5	0	0
Lavage 2	35	6	2	2	74	9	7	2
Elution	5	2	91	8	3	5	93	9

Tableau III- 4 : Moyennes et écarts type obtenus pour les rendements (en %) d'extraction de la cocaïne et la BZE en milieu MeCN avec le protocole du Tableau III- 3 par trois cartouches différentes de NIP et de MIP

Comme dans le cas des profils d'extraction obtenus sur une même cartouche, lors de l'étude de la répétabilité entre trois cartouches différentes, les écarts type ne dépassent pas 9 %, que ce soit pour l'extraction de la cocaïne ou de la BZE, sur le NIP ou le MIP. Donc le protocole est répétable d'une cartouche à l'autre pour une même synthèse, malgré l'inhomogénéité des particules obtenues qui résulte du broyage et tamisage des polymères. En effet, la répartition des particules sur une gamme de tailles variées aurait pu induire une différence plus importante d'une cartouche à l'autre. Ainsi, les résultats obtenus sont très satisfaisants.

Considérant qu'une synthèse en bloc nécessite d'une quantité de cocaïne d'environ 100 mg et qu'il s'agit d'un produit assez cher et qui nécessite une autorisation de vente, une seule synthèse a été effectuée dans les conditions décrites pour le MIP UV.

III.3.3 Étude de la rétention sélective de l'ecgonine méthylester (EME)

Jusqu'à présent, le MIP UV n'a été utilisé que pour l'extraction de la cocaïne et de la BZE en milieu MeCN pur. Ayant montré une importante sélectivité pour la cocaïne, mais aussi une importante sélectivité croisée pour la BZE dans ce milieu, il devrait être possible d'obtenir un protocole sélectif pour le deuxième métabolite principal de la cocaïne, c'est-à-dire l'EME. De

la même façon que pour la cocaïne et la BZE, le protocole d'extraction optimisé a été utilisé (Tableau III- 3) mais avec une solution de percolation contenant de l'EME à une concentration de 10 ng.mL^{-1} . En effet, la méthode d'analyse utilisée dans ce cas est la LC-MS (l'EME ne possédant pas de chromophore) qui est plus sensible que la LC-UV et qui permet donc l'utilisation de concentrations plus faibles. Pour confirmer que la cocaïne et la BZE sont toujours retenues en présence de l'EME et à de faibles niveaux de concentration, elles ont été ajoutées à la solution de percolation à une concentration de 10 ng.mL^{-1} . Les profils d'extraction ainsi obtenus sont présentés sur la Figure III- 11.

Les résultats obtenus pour la cocaïne et la BZE sont quasiment identiques à ceux obtenus pour la méthode LC-UV (Figure III- 9), ce qui confirme les résultats obtenus précédemment. Dans le cas de l'EME, on observe une forte rétention sur le MIP UV avec un rendement à l'élution de $79 \pm 9 \%$. Le rendement sur le NIP est de $23 \pm 9 \%$, ce qui implique qu'une partie de la rétention sur le MIP UV provient d'interactions non-spécifiques. Le protocole est tout de même sélectif pour ce deuxième métabolite et il est donc possible d'extraire sélectivement les trois molécules avec un même protocole d'extraction en milieu organique pur. Si toutefois il était nécessaire de réduire les interactions non-spécifiques de l'EME, il suffirait de rendre le lavage plus éluant, mais au risque d'abaisser les rendements à l'élution de la cocaïne et la BZE du MIP UV.

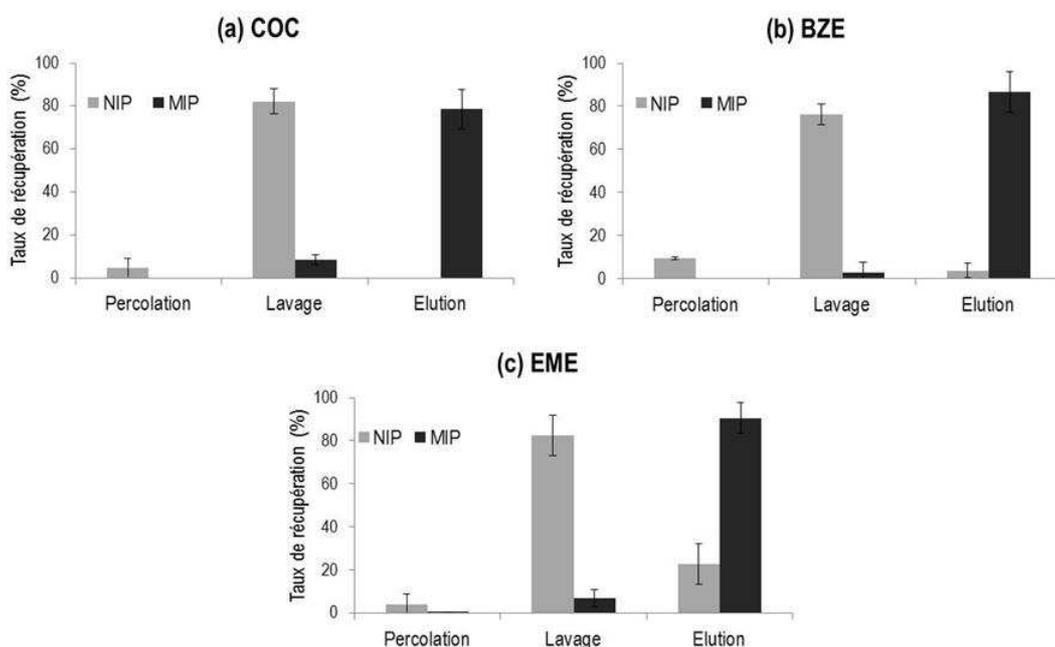


Figure III- 11 : Profils d'extraction de la cocaïne (a), la BZE (b) et l'EME (c) du MIP et de son NIP correspondant dans les conditions décrites sur le Tableau III- 3, mais pour une percolation de 1 mL d'une solution de MeCN dopée avec 10 ng.mL^{-1} de cocaïne, BZE et EME ($n = 3$).

Ainsi, le MIP UV obtenu est sélectif pour la cocaïne et ses deux métabolites principaux, la BZE et l'EME, en milieu MeCN pur. De plus, la capacité de ce support en milieu organique

est élevée, ce qui pourrait s'avérer intéressant pour piéger non seulement la cocaïne mais aussi ses deux métabolites principaux. Il serait donc intéressant d'évaluer l'extraction de la cocaïne et de ses métabolites dans un milieu réel.

III.4 Développement d'une extraction sélective en milieu aqueux et hydro-organique

III.4.1 Étude de la rétention sur MIP UV en milieu hydro-organique

Les échantillons de sérum, de plasma ou de sang subissent généralement une première étape de purification par la précipitation des protéines avant de réaliser des procédures d'extractions plus sélectives comme la SPE. Cette étape est généralement effectuée en ajoutant 50 % de MeCN à l'échantillon. Précédemment, la sélectivité d'un MIP UV a été confirmée en milieu MeCN pur pour la cocaïne et ses deux métabolites principaux, il serait donc intéressant d'étudier cette rétention d'un milieu hydro-organique contenant du MeCN. Ainsi, une première étude de rétention de la cocaïne, la BZE et l'EME sur le MIP UV a été réalisée dans un milieu hydro-organique pur constitué d'un mélange eau/MeCN 50/50 (v/v). Le profil utilisant des conditions de lavage et d'élution optimisées pour un milieu MeCN pur (Tableau III- 3) a été tracé après percolation de 1 mL d'une solution de cocaïne, de BZE et de EME à 5 ng.mL^{-1} dans un mélange eau/MeCN 50/50 (v/v). Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure III- 12.

En milieu hydro-organique pur dopé, une forte rétention et une sélectivité élevée sont obtenues pour la cocaïne sur le MIP UV. Par rapport au profil en milieu MeCN pur (Figure III- 9), le NIP UV retient moins bien la cocaïne à la percolation, il semblerait alors qu'une grande partie des interactions non spécifiques de la cocaïne soient rompues par l'apport d'eau. Le reste des interactions non-spécifiques sont éliminées lors du premier lavage avec du MeCN pur. En revanche la BZE n'est pas retenue par le MIP UV dans ces conditions. Effectivement, la BZE est plus polaire que la cocaïne (Tableau I- 1), elle a donc une bonne affinité pour l'eau, ce qui expliquerait qu'elle ne soit pas bien retenue lors de la percolation. Mais ce n'est certainement pas la seule raison de ce manque total de rétention car l'EME, qui est aussi une molécule très polaire, est retenue environ à 65 % par le MIP. L'EME a donc une rétention moyenne sur le MIP UV, mais elle présente un profil d'extraction qui n'est pas très sélectif puisque à l'élution du NIP UV la contribution des interactions non spécifiques est proche de 30 %.

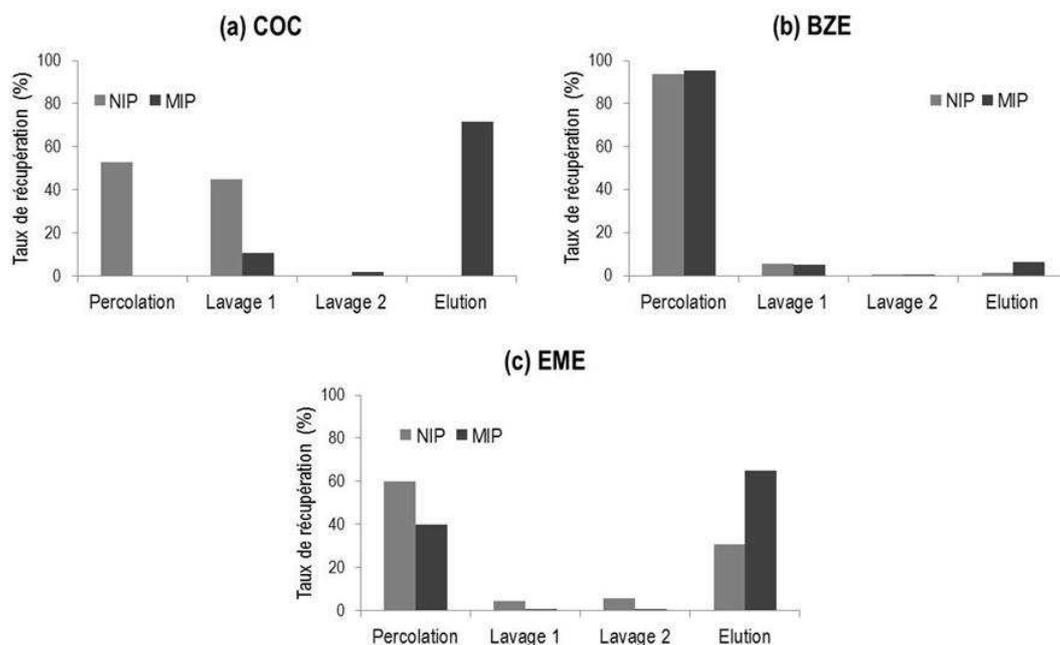


Figure III- 12 : Profils d'extraction de la cocaïne (a), la BZE (b) et l'EME (c) du MIP UV et de son NIP correspondant dans les conditions décrites sur le Tableau III- 3, mais pour une percolation de 1mL d'une solution constituée d'un mélange eau/MeCN 50/50 (v/v) dopée avec 5 ng.mL^{-1} de cocaïne, BZE et EME.

Quoi qu'il en soit, cette première étude montre qu'il est possible d'extraire de façon relativement sélective la cocaïne et l'EME d'un milieu hydro-organique pur, ce qui n'est pas possible pour la BZE. Ce qui différencie la BZE des deux autres molécules étudiées est la présence d'un groupement acide carboxylique (Figure I- 2). Considérant que les valeurs des pK_a de la BZE sont 2,25 et 11,2, cette molécule est doublement chargée (acide carboxylique déprotoné COO^- et amine protonée NH^+) dans une grande partie du domaine de pH des solutions aqueuses. Il sera donc judicieux d'étudier la rétention de la BZE en milieu hydro-organique en fonction du pH et sur des échantillons réels susceptibles de contenir des ions pour évaluer les risques d'effets de matrice sur les interactions électrostatiques. Cependant, avant de continuer l'étude en milieu hydro-organique, et sur des échantillons biologiques, il serait intéressant d'étudier la rétention des composés cibles en milieu aqueux pur.

III.4.2 Étude de la rétention sur MIP UV en milieu aqueux pur

III.4.2.1 Étude préliminaire

La rétention de la cocaïne et de ses deux métabolites principaux a été étudiée en milieu MeCN pur et dans un milieu hydro-organique composé d'eau et de MeCN 50/50 v/v. L'excellente sélectivité observée en milieu MeCN pur, ainsi qu'une sélectivité moyenne observée pour la

cocaïne et l'EME en milieu hydro-organique, laissent penser qu'il est possible d'obtenir une procédure d'extraction sélective en milieu aqueux. Donc la rétention en milieu aqueux a été étudiée. Dans un premier temps, les conditions optimisées en milieu MeCN ont été testées (Tableau III- 3) mais avec une solution de percolation contenant 50 ng.mL^{-1} de cocaïne, BZE et EME dans de l'eau. Les résultats ainsi obtenus sont présentés sur la Figure III- 13. Pour la cocaïne et l'EME, le MIP UV présente une forte rétention mais qui n'est pas sélective puisque le NIP UV retient également fortement ces deux molécules. Il est donc nécessaire de développer des lavages plus éluants qui permettent d'éluer les composés du NIP UV sans les éluer du MIP UV. En ce qui concerne la BZE, la rétention est plus importante sur le MIP UV que sur le NIP UV, mais le lavage semble trop éluant puisque 60 % de la BZE est élué du MIP UV à cette étape. La rétention de la BZE est tout de même plus importante que dans le milieu hydro-organique (Figure III- 12), probablement grâce à un renforcement des interactions hydrophobes par la présence d'un milieu 100 % aqueux.

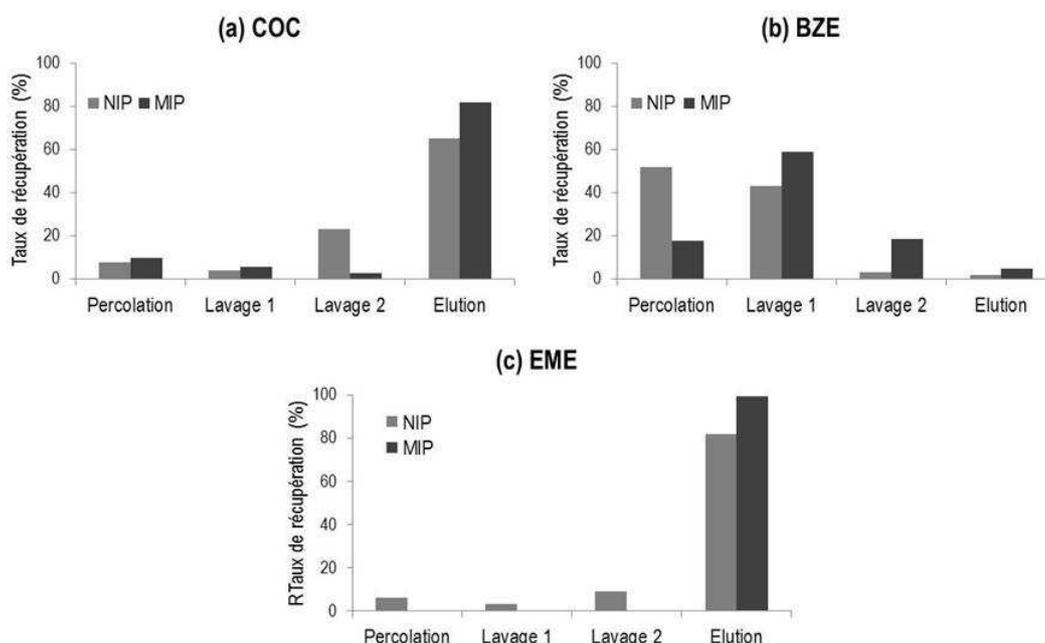


Figure III- 13 : Profils d'extraction de la cocaïne (a), la BZE (b) et l'EME (c) du MIP UV et de son NIP correspondant dans les conditions décrites sur le Tableau III- 3, mais avec une percolation de 1 mL d'une solution aqueuse dopée avec 50 ng.mL^{-1} de cocaïne, BZE et EME.

III.4.2.2 Amélioration des conditions d'extraction en milieu aqueux

Différentes conditions de lavage moins éluant ont été appliquées pour améliorer la rétention de la BZE sur le support imprimé. Parmi les solvants de lavage testés, les moins éluants étaient constitués d'un mélange eau/MeCN 95/5 (v/v), le protocole utilisé ainsi que le résultat obtenu sont présentés sur la Figure III- 14.

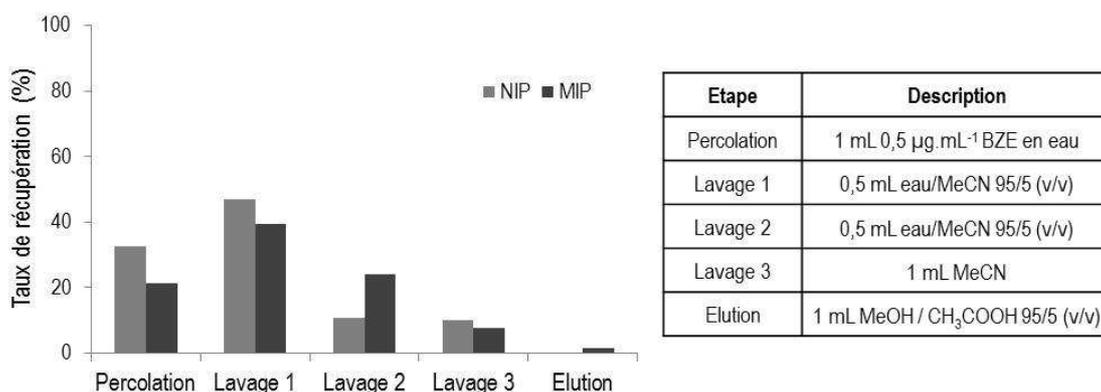


Figure III- 14 : Profils d'extraction de la BZE du MIP UV et de son NIP d'un milieu aqueux dans les conditions décrites sur la figure.

La BZE est toujours assez bien retenue à la percolation sur le MIP UV, mais même avec un faible volume d'une solution de lavage très peu éluante, la BZE est éluée du MIP UV à 40 % pour seulement 0,5 mL de solution de lavage. D'autres essais ont été réalisés pour essayer de retenir la BZE lors du lavage, notamment en changeant le pH de la solution percolée. La solution de percolation a été acidifiée à $\text{pH} = 1$, ainsi la fonction acide de la BZE doit être majoritairement protonée renforçant ses interactions hydrophobes avec la chaîne polymérique. Effectivement, une meilleure rétention a été observée à la percolation avec une perte de seulement 11 % de BZE du MIP UV. Par la suite, un lavage avec du MeCN a été utilisé avec ou sans séchage intermédiaire de la cartouche dans l'objectif de modifier les interactions de la BZE dans ce milieu et de s'approcher du profil sélectif observé en milieu organique pur (Figure III- 9), l'élimination de l'eau par le séchage permettant de régénérer a priori des extractions polaires dans le MeCN comme précédemment. Dans les deux cas, la totalité de la BZE a été éluée de la cartouche lors du lavage. Finalement, il semblerait que, comme dans le cas de l'étude en milieu hydro-organique, il n'est pas possible de retenir la BZE en milieu aqueux. En effet, encore une fois la polarité et la nature zwitterionique de la BZE doit être à l'origine de ce manque de rétention car la fonction acide de la BZE doit générer d'importantes répulsions de celle-ci avec les cavités spécifiques du MIP UV.

Concernant la cocaïne et l'EME, elles sont bien retenues en milieu aqueux. Cependant, elles sont aussi très retenues sur le NIP UV (Figure III- 13). Ainsi, des lavages plus éluants que ceux présentés dans le protocole optimisé en milieu MeCN pur (Figure III- 9) ont été évalués pour améliorer la sélectivité de la procédure. Sur la Figure III- 15 sont présentés les profils optimisés pour la cocaïne et l'EME dans l'eau, ainsi que le protocole d'extraction utilisé. Une importante quantité de MeOH dans la fraction de lavage a été nécessaire pour rompre les interactions non-spécifiques observées sur le NIP UV. En effet, le milieu aqueux a apparemment favorisé la rétention pour ces deux molécules y compris celles ne provenant pas des cavités spécifiques du MIP. Le protocole final a donc conduit à une bonne rétention, une bonne répétabilité et une bonne sélectivité pour la cocaïne et l'EME avec des rendements à

l'éluion de $95 \pm 5 \%$ pour la cocaïne et $86 \pm 8 \%$ pour l'EME sur le MIP UV, et seulement $10 \pm 8 \%$ pour la cocaïne et $14 \pm 10 \%$ pour l'EME ($n = 3$) pour le NIP UV.

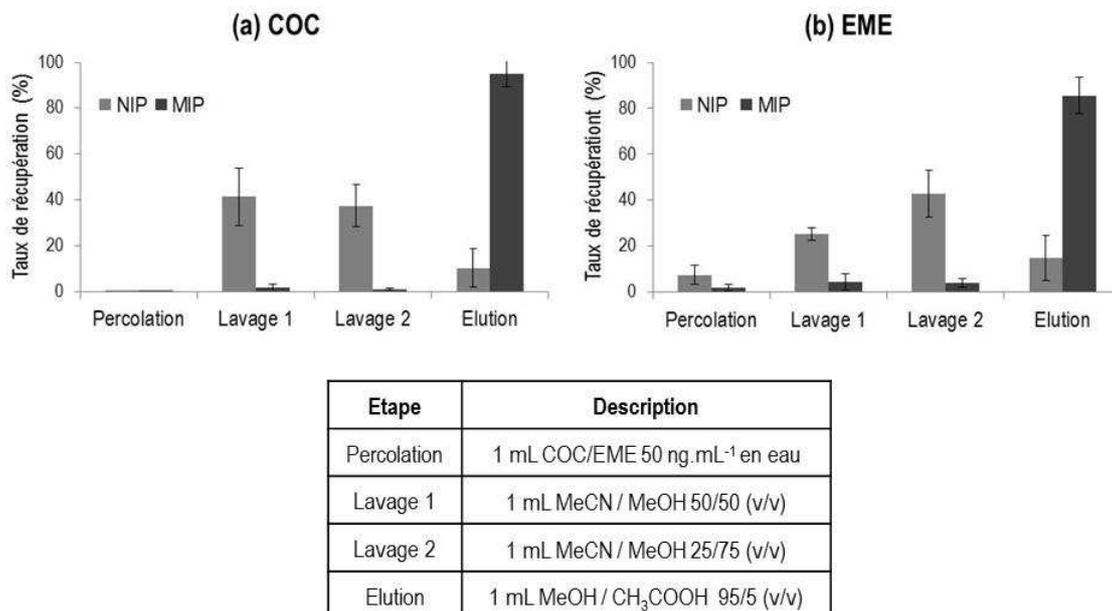


Figure III- 15 : Profils d'extraction de la cocaïne (a) et l'EME (b) avec le MIP UV et le NIP correspondant d'un milieu aqueux ($n=3$).

Les solvants utilisés peuvent laisser penser que le mécanisme sélectif engendré entre les molécules et le MIP UV résulte de l'établissement d'interactions de nature hydrophobe puisque l'on observe une forte rétention dans l'eau et que l'on élue avec un milieu hydrophobe. Cependant, compte tenu de la grande polarité de l'EME, la contribution d'interactions électrostatiques avec le MIP UV n'est pas à négliger. Or, ces extractions peuvent être sujettes à des phénomènes de compétition dans des milieux réels tels que le milieu urinaire. Il est alors important de le vérifier. Néanmoins, avant d'étudier des protocoles d'extraction en milieux biologiques, d'autres synthèses de MIP ont été réalisées dans différentes conditions pour essayer de trouver un support qui puisse aussi retenir la BZE en milieu aqueux.

III.4.3 Évaluation de différentes conditions de synthèse pour la synthèse de MIP

III.4.3.1 Utilisation de divinylbenzène comme agent réticulant

III.4.3.1.1 Conditions de synthèse

L'effet du DVB sur la rétention de la BZE en milieu aqueux a été évalué. En effet, le MIP UV préparé avec de l'EGDMA avait montré une faible rétention de la BZE en milieu aqueux. Considérant que cette molécule a un noyau aromatique, il était intéressant d'étudier ses interactions avec un support ayant lui-même des noyaux aromatiques pour favoriser sa rétention par des interactions π - π . De plus, la rétention en milieu aqueux devrait aussi être favorisée par l'augmentation des propriétés hydrophobes du polymère, le risque étant toutefois d'aboutir à des interactions non-spécifiques assez importantes. Un nouveau MIP a donc été synthétisé dans les mêmes conditions présentées sur le Tableau III- 2 mais avec du DVB à la place de l'EGDMA comme agent réticulant. Les NIP et MIP ainsi préparés ont par la suite été broyés et tamisés et les fines particules ont été éliminées par sédimentation. Lors de ces étapes de préparation du MIP, il a été observé que celui-ci était extrêmement fragile, et après l'étape de sédimentation il n'est pas resté de matériel utilisable avec une taille de particule acceptable. Dans le cas du NIP, il a été possible de récupérer des particules de bonne taille. Il semblerait donc que la structure du MIP synthétisé avec du DVB soit assez différente de celle du NIP, probablement à cause de la formation d'un nombre important de cavités contenant la cocaïne. Il a donc été nécessaire d'utiliser un mélange de 70 % de DVB et 30 % d'EGDMA comme agents réticulants. Dans ces conditions, des particules de NIP DVB et de MIP DVB avec une taille de particule acceptable, ont été obtenues. Le mode d'initiation utilisé est une initiation thermique à 60°C pendant 24 heures.

III.4.3.1.2 Protocole d'extraction en milieu acétonitrile

Une série de lavages a été appliquée aux cartouches de ce MIP DVB dans des conditions assez semblables que celles utilisées pour les MIP synthétisés antérieurement avec de l'EGDMA. Cette fois-ci, le relargage de la cocaïne a été moins bien contrôlé, puisque des signaux de cocaïne dans des profils blancs étaient observés même après ces lavages. Il a donc été nécessaire de laver les cartouches avec un solvant plus hydrophobe, l'isopropanol. Par la suite le relargage a enfin été réduit.

Considérant les résultats obtenus pour les MIP synthétisés avec l'EGDMA, la solution utilisée pour l'élution de la cocaïne et de la BZE n'a pas été modifiée et elle a été fixée à 1 mL d'une solution de MeOH avec 5 % d'acide acétique. En ce qui concerne les lavages, ils ont initialement été testés pour la BZE car pour ces premiers protocoles, le problème de relargage n'était pas encore résolu et que ce MIP DVB avait été principalement synthétisé pour la rétention de la BZE. Donc une première procédure d'extraction a été réalisée en percolant une solution de MeCN dopé avec 0,1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de BZE, puis deux lavages ont été réalisés, le premier avec 1 mL de MeCN, et le deuxième avec 1 mL d'un mélange MeCN/MeOH 95/5 v/v, et finalement l'élution a été effectuée avec 1 mL de MeOH contenant 5 % d'acide acétique. Le profil ainsi obtenu est présenté en Figure III- 16.

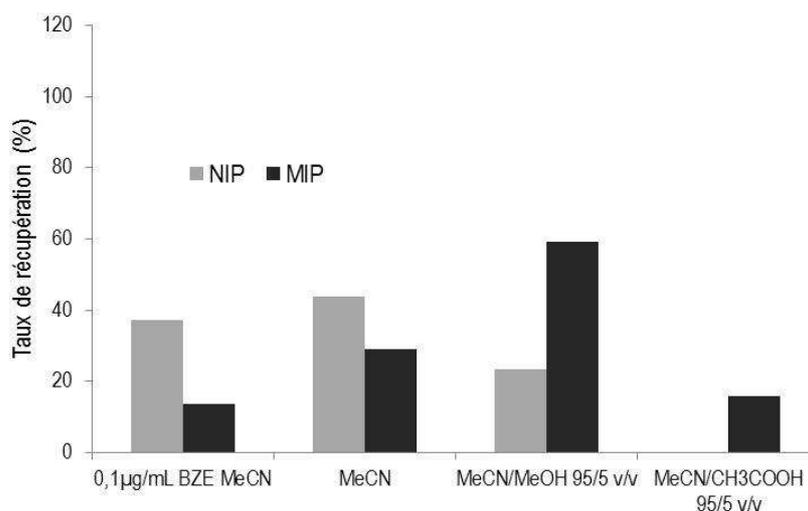


Figure III- 16 : Premier profil d'extraction de la BZE sur le MIP DVB et son NIP en milieu MeCN. Fractions de 1 mL.

Il apparaît que la rétention de la BZE sur le NIP DVB est assez faible puisqu'environ 80 % de cette molécule est élué entre la percolation et le premier lavage. Finalement le deuxième lavage avec 5 % de MeOH est suffisant pour rompre les interactions de la BZE avec le NIP DVB. Cependant, en ce qui concerne le MIP DVB, la rétention de la BZE est un peu meilleure à la percolation, mais suite au premier lavage, plus de 40 % de la BZE est éluée du MIP DVB. Le deuxième lavage est trop éluant pour la BZE sur le MIP DVB car presque 60 % de celle-ci est éluée seulement pour ce lavage. À la vue de ces résultats, il a été jugé inutile d'ajouter un lavage supplémentaire au premier lavage avec du MeCN, puisque la rétention de la BZE est assez faible sur le MIP DVB.

Une deuxième procédure d'extraction a alors été évaluée mais cette fois-ci la cocaïne a été incluse dans l'étude car le problème de relargage était sous contrôle. Pour ce deuxième profil, une percolation de 1 mL d'une solution de MeCN avec $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cocaïne et de BZE a été effectuée, suivie d'un lavage avec 1 mL de MeCN et une élution avec 1 mL d'une solution de MeOH avec 5 % d'acide acétique. Les résultats obtenus sont présentés en Figure III- 17. Les profils obtenus dans ces conditions montrent une faible rétention sur le MIP DVB de la cocaïne et surtout de la BZE. Néanmoins, la procédure montre une certaine sélectivité pour la cocaïne car les rendements à l'élution sont de $43 \pm 7 \%$ sur le MIP DVB et $13 \pm 1 \%$ sur le NIP DVB. En ce qui concerne la BZE, les deux supports semblent avoir plus ou moins le même comportement vis-à-vis de la rétention de la BZE, le protocole n'est donc pas sélectif.

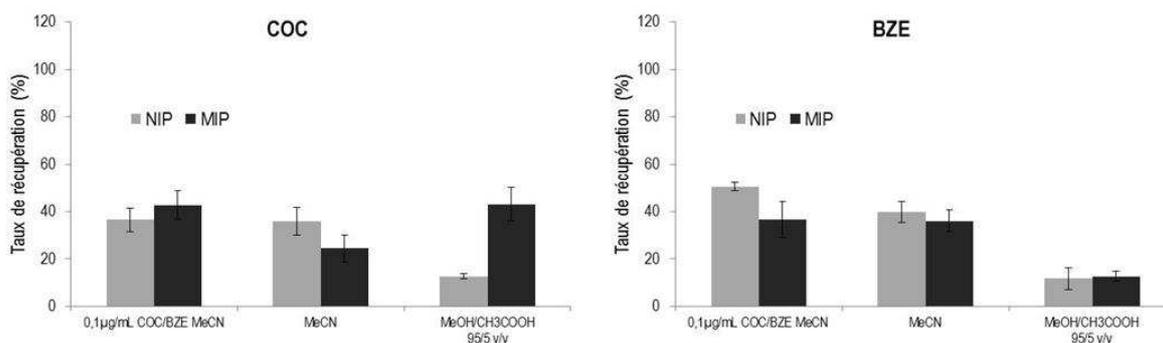


Figure III- 17 : Profil d'extraction optimisé en milieu MeCN de la cocaïne et la BZE sur le MIP DVB et son NIP. Fractions de 1 mL.

Avec les résultats obtenus, le MIP DVB ne semble pas être adapté pour l'extraction de la BZE en milieu aqueux. En effet, le MeCN a été utilisé pour la synthèse de ce support, donc les interactions entre le MIP DVB et la cocaïne (ou la BZE) devraient être les plus fortes dans ce même milieu [127]. Or, les résultats montrent que plus de 30 % des quantités percolées de cocaïne et de BZE sont éluées dès la percolation, et qu'au lavage, qui est fait encore une fois avec du MeCN, il y a encore plus de 20 % des molécules éluées du MIP DVB. Par conséquent, l'étude en milieu aqueux ne présentait aucun intérêt et d'autres conditions de synthèse ont été évaluées.

III.4.3.2 Utilisation de triméthylolpropane triméthacrylate

III.4.3.2.1 Conditions de synthèse

Une deuxième synthèse a été faite mais avec du TRIM comme agent réticulant (MIP TRIM). En effet, le TRIM possède trois fonctions polymérisables qui normalement modifient la structure du polymère pour favoriser la formation de cavités, donnant ainsi une meilleure porosité. Le TRIM avait déjà été utilisé pour la synthèse d'un MIP d'anilide de BZE dans du toluène [131]. Cette étude avait en plus permis d'obtenir des résultats satisfaisants pour l'extraction de la BZE d'un milieu aqueux pur puisque les rendements d'extraction obtenus étaient de 77 % pour le MIP et de 23 % pour le NIP. Pour notre étude, le toluène a été remplacé par du dichlorométhane qui a une polarité plus proche de celle du MeCN, mais la proportion en volume de solvant porogène a été conservée. De plus la molécule empreinte utilisée est la cocaïne au lieu de l'anilide de benzoylecgonine. Pour le reste des conditions de synthèse, ce sont celles de l'étude antérieure [131] qui ont été utilisées. L'ensemble des conditions de synthèse de ce nouveau MIP est présenté dans le Tableau III- 5.

Paramètre	Choix
Molécule empreinte (ME)	Cocaïne
Monomère fonctionnel (MF)	MAA
Agent réticulant (AR)	TRIM
ME/MF/AR (mol/mol/mol)	1/4/20
Solvant porogène (P)	Dichlorométhane
P/ME (mL/mmol)	10,9
Type d'initiation	Photochimique 24h à 3°C puis thermique 24h à 60°C

Tableau III- 5 : Conditions de synthèse pour la synthèse d'un MIP avec du TRIM comme agent réticulant.

III.4.3.2.2 Profil d'extraction en milieu organique

Cette nouvelle synthèse a pour objectif d'apporter une meilleure rétention de la cocaïne, et surtout de la BZE sur le MIP TRIM, ainsi qu'une meilleure sélectivité, de façon à appliquer le MIP TRIM à l'extraction de ces molécules en milieu aqueux. Néanmoins, avant de tester le milieu aqueux, il est pertinent d'évaluer la sélectivité du MIP TRIM dans du MeCN pour pouvoir le comparer au MIP synthétisé avec de l'EGDMA (MIP UV). De ce fait, la procédure d'extraction appliquée au MIP TRIM a été la même que la procédure optimisée du MIP UV (Tableau III- 3). Les résultats de cette étude sont présentés en Figure III- 18.

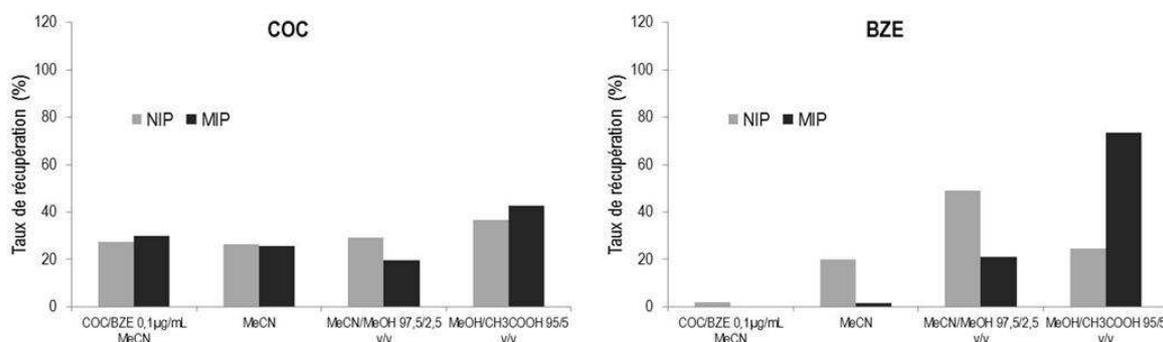


Figure III- 18 : Profils d'extraction de la cocaïne et la BZE en milieu MeCN sur les MIP TRIM et NIP TRIM. Fractions de 1 mL.

Le profil d'extraction obtenu pour la cocaïne n'est pas sélectif puisque la rétention sur le NIP TRIM est très proche de celle obtenue pour le MIP TRIM et la rétention de la cocaïne sur le MIP TRIM est très faible : 40 % de la cocaïne est éluée entre la percolation et le premier lavage. En ce qui concerne la BZE, sa rétention sur le MIP TRIM est plus forte que celle de la cocaïne. En plus, le protocole d'extraction est sélectif puisqu'à l'élution les rendements pour la BZE sont de 73 % pour le MIP TRIM et seulement 25 % pour le NIP TRIM. Dans les conditions testées, le MIP TRIM est moins sélectif que le MIP UV pour la BZE. Le protocole n'a pas été optimisé ultérieurement. En effet, le deuxième lavage avec 2,5 % de MeOH dans du MeCN n'élimine pas la totalité des interactions non-spécifiques mais il est suffisamment

éluant pour rompre une partie des interactions de la BZE avec le MIP TRIM, ce qui indique que la procédure d'extraction a peu de chances d'être meilleure que ce qui est observé en Figure III- 18.

Malgré une bonne sélectivité du MIP TRIM pour la BZE en milieu MeCN, la sélectivité pour la cocaïne reste assez faible puisque les deux supports, le NIP et le MIP, conduisent à une rétention semblable de la cocaïne. Ainsi, l'intérêt d'utiliser le TRIM pour la rétention sélective de la BZE dans du MeCN démontré dans une étude antérieure [131] et confirmé avec les résultats obtenus dans ce travail, n'est plus valable pour la cocaïne pour qui la sélectivité est quasiment inexistante. Ce support sera néanmoins étudié pour un milieu hydro-organique et pour un milieu aqueux, notamment pour voir si la BZE y est retenue.

III.4.3.2.3 Profil d'extraction en milieu hydro-organique

Comme dans le cas du milieu MeCN, le protocole optimisé pour le MIP UV, détaillé dans le Tableau III- 3, a été appliqué au MIP TRIM mais avec une solution de percolation de 1 mL de cocaïne et BZE à $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans un mélange eau/MeCN 50/50 v/v. Les profils d'extraction correspondant à cette étude sont présentés en Figure III- 19.

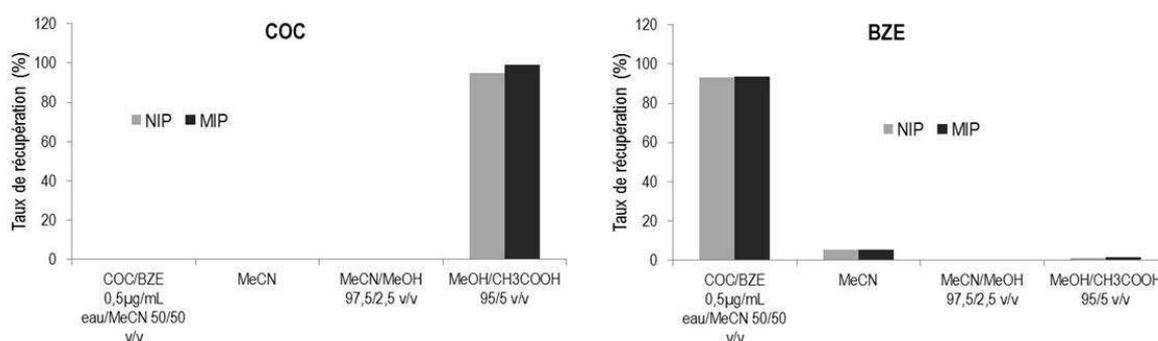


Figure III- 19 : Profils d'extraction de la cocaïne et la BZE en milieu hydro-organique sur les MIP TRIM et NIP TRIM. Fractions de 1 mL.

Les résultats montrent une très forte rétention de la cocaïne dans ce milieu, comme il avait été observé pour le MIP UV lors de la réalisation de cette même étude (Figure III- 12). Mais un inconvénient majeur que présente cette synthèse est que le NIP TRIM retient lui aussi très fortement la cocaïne et donc la procédure d'extraction n'est pas sélective, comme il avait déjà été observé en milieu MeCN. En ce qui concerne la BZE, elle n'est retenue ni par le NIP TRIM ni par le MIP TRIM, comme c'était le cas pour le MIP UV (Figure III- 12). Le MIP TRIM n'a donc pas plus d'intérêt pour la rétention de la BZE que le MIP UV dans un milieu hydro-organique. Il est cependant intéressant d'étudier son comportement en milieu aqueux pour pouvoir comparer la rétention de la BZE avec celle observée sur le MIP UV.

III.4.3.2.4 Profil d'extraction en milieu aqueux

La même procédure que celle utilisée en milieu MeCN et en milieu hydro-organique a été effectuée mais avec une percolation de 1 mL d'une solution d'eau dopée avec $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cocaïne et de BZE. Les profils d'extraction ainsi obtenus sont présentés en Figure III- 20.

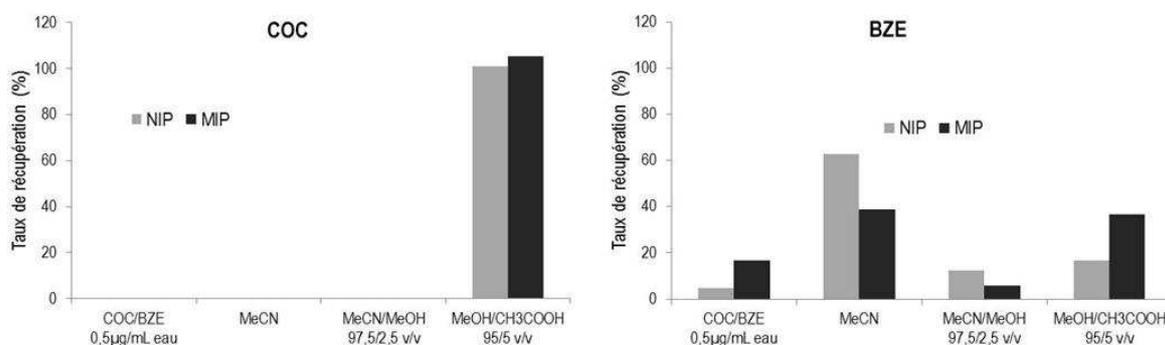


Figure III- 20 : Profils d'extraction de la cocaïne et la BZE en milieu aqueux pur sur les MIP TRIM et NIP TRIM. Fractions de 1 mL.

Le résultat obtenu pour la cocaïne est le même qu'en milieu hydro-organique, donc avec une très forte rétention par le MIP TRIM, mais aussi par le NIP TRIM, conduisant à une procédure d'extraction non sélective. Dans le cas du MIP UV, le même type de résultats avaient été obtenus pour la cocaïne en milieu aqueux (Figure III- 13), mais il avait quand même été possible de développer un protocole sélectif dans ce milieu par la suite (Figure III- 15). Cependant, en ce qui concerne le MIP TRIM, compte tenu des observations réalisées en milieu MeCN pur, il est peu probable qu'une procédure sélective soit obtenue pour la cocaïne. Dans le cas de la BZE, sa rétention sur le MIP TRIM n'est pas très forte car entre la percolation et le premier lavage, environ 60 % de cette molécule est élué du MIP TRIM. Il semblerait que la rétention soit toutefois plus importante que pour le MIP UV pour lequel 80 % de la BZE avait été élué entre la percolation et le premier lavage dans les mêmes conditions d'extraction (Figure III- 13). La rétention obtenue sur le MIP TRIM reste tout de même assez faible, et considérant que l'extraction n'est pas sélective pour la cocaïne, l'étude de ce support n'a pas été poursuivie.

III.4.3.3 Évaluation de l'utilisation d'un nouveau monomère basique

III.4.3.3.1 Conditions de synthèse

L'utilisation d'un monomère fonctionnel basique, en plus du MAA a été envisagée, pour tenter d'exploiter les interactions avec le groupement acide de la BZE. En effet la BZE est une molécule qui présente une fonction acide carboxylique et une fonction amine dont les pKa sont respectivement de 2,25 et 11,2 (Tableau I- 1). La BZE, en contact avec un support

synthétisé avec du MAA comme monomère fonctionnel, peut développer des interactions assez fortes avec les résidus acides de la chaîne polymérique, et cette interaction se fait grâce à sa fonction amine. Cependant, en milieu aqueux, il semblerait que la fonction acide de la BZE crée une répulsion envers la chaîne polymérique et très probablement contre les résidus acides de celle-ci. Pour essayer d'exploiter la fonction acide de la BZE, tout en conservant l'interaction de la fonction amine avec le MAA, l'utilisation d'un deuxième monomère fonctionnel a été envisagée. Le choix pour ce deuxième monomère s'est porté vers la 2-vinylpyridine (2-VP), car cette molécule contient une fonction amine qui peut interagir avec le groupement acide de la BZE. De plus, son noyau aromatique peut favoriser l'établissement d'interactions de type π - π avec le cycle aromatique de la BZE et de la cocaïne. Les conditions de synthèse de ce dernier MIP 2-VP sont exactement les mêmes que celles reportées dans le Tableau III- 2 mais avec un mélange de 50 % de MAA et 50 % de 2-VP comme monomères fonctionnels. Le mode d'initiation utilisé est une initiation photochimique pendant 24 heures à 15°C.

III.4.3.3.2 Profil d'extraction en milieu organique

Comme dans le cas du MIP TRIM, une première étude du MIP 2-VP a été effectuée en milieu MeCN de façon à pouvoir confirmer sa sélectivité. La procédure d'extraction appliquée à cette occasion était la même que la procédure optimisée du MIP UV (Tableau III- 3). Les résultats obtenus pour cette procédure d'extraction sont présentés en Figure III- 21.

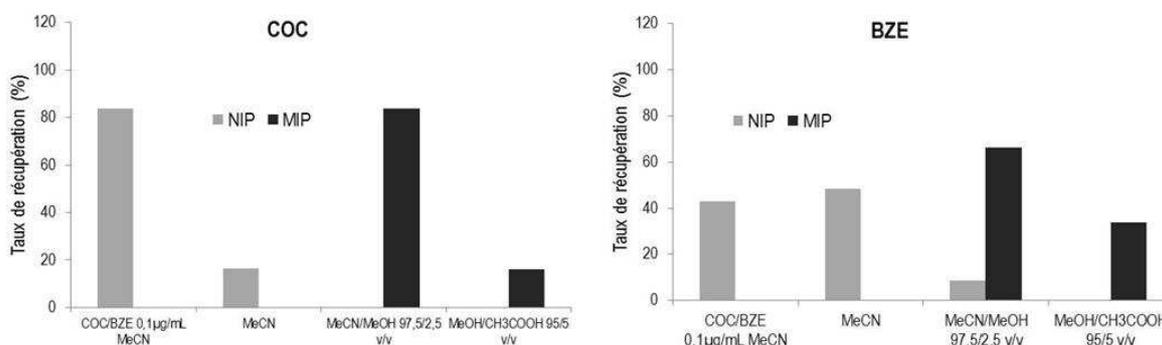


Figure III- 21 : Profils d'extraction de la cocaïne et la BZE en milieu MeCN sur les MIP 2-VP et NIP 2-VP. Fractions de 1 mL.

Les profils obtenus montrent que pour les deux molécules le NIP 2-VP et le MIP 2-VP présentent une grande différence de rétention. Le MIP 2-VP retient effectivement la cocaïne et la BZE plus fortement que le NIP 2-VP. Les procédures d'extraction ainsi obtenues sont donc sélectives pour les deux molécules puisque, lorsque l'on rassemble des deux dernières fractions, les rendements obtenus pour le NIP 2-VP sont de 0% pour la cocaïne et seulement de 9 % pour la BZE, tandis qu'ils dépassent les 90 % sur le MIP 2-VP pour les deux molécules. Malgré cette importante sélectivité, la rétention des deux molécules sur le MIP 2-VP est bien inférieure à celle obtenue avec le MIP UV pour lequel les deux molécules étaient

retenues à plus de 80 % après le passage de la solution de MeCN contenant 5 % de MeOH. Les résultats obtenus en milieu MeCN suggèrent que ce MIP 2-VP ne sera probablement pas capable de mieux retenir la BZE en milieu aqueux que le MIP UV. Pour la suite de l'étude de ce support, il était intéressant d'étudier les interactions en milieu hydro-organique avant le milieu aqueux pur.

III.4.3.3.3 Profil d'extraction en milieu hydro-organique

Comme précédemment, le protocole optimisé pour le MIP UV, détaillé dans le Tableau III- 3, a été appliqué au MIP 2-VP mais avec une solution de percolation de 1 mL de cocaïne et BZE à $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans un mélange eau/MeCN 50/50 v/v. Les profils d'extraction correspondant à cette étude sont présentés en Figure III- 22.

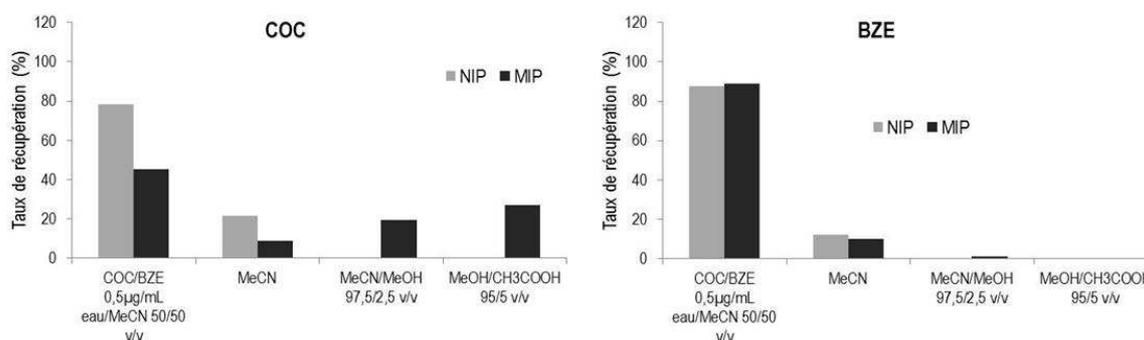


Figure III- 22 : Profils d'extraction de la cocaïne et la BZE en milieu hydro-organique sur les MIP 2-VP et NIP 2-VP. Fractions de 1 mL.

Comme pour les autres supports étudiés jusqu'à présent, le MIP 2-VP ne retient pas la BZE en milieu hydro-organique. En ce qui concerne la rétention de la cocaïne sur le MIP 2-VP, elle est, comme attendu, plus faible que celle du MIP UV en milieu hydro-organique. Il semblerait que le MIP 2-VP génère des liaisons hydrogène plus faibles que le MIP UV, et donc que l'ajout de 2-VP ne favorise pas vraiment la rétention de la BZE. Pour compléter l'étude de la rétention des molécules ciblées sur le MIP 2-VP, un profil d'extraction a tout de même été effectué en milieu aqueux.

III.4.3.3.4 Profil d'extraction en milieu aqueux

La même procédure que celle utilisée en milieu MeCN et en milieu hydro-organique a été effectuée mais avec une percolation de 1 mL d'une solution d'eau dopée avec $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cocaïne et de BZE. Les profils d'extraction ainsi obtenus sont présentés en Figure III- 23. Pour la cocaïne, le profil d'extraction en milieu aqueux est sélectif avec toujours une plus faible rétention que sur le MIP UV. En ce qui concerne la BZE, le profil d'extraction est très semblable à celui obtenu pour le MIP UV dans les mêmes conditions (Figure III- 13). Or, il avait été observé qu'avec le MIP UV il n'était pas possible de retenir la BZE en milieu aqueux, et sachant que les interactions du MIP 2-VP avec les molécules ciblées sont plus

faibles que celles du MIP UV, le MIP 2-VP ne permettra pas de surmonter le problème de rétention de la BZE en milieu aqueux.

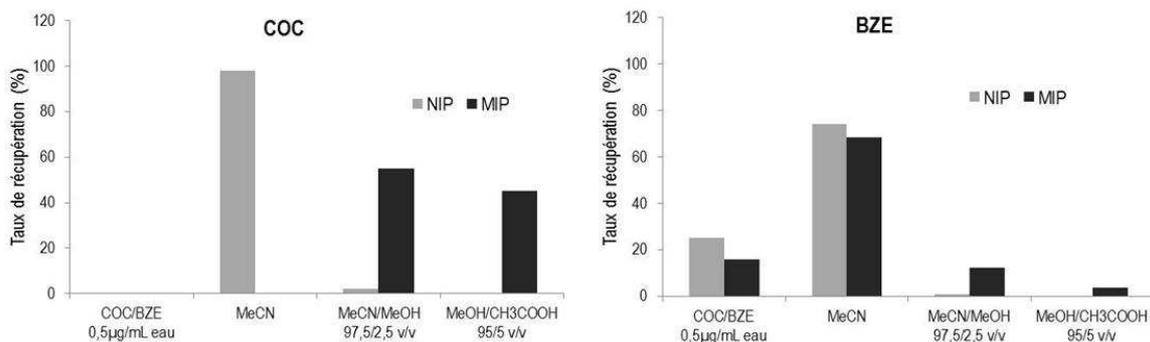


Figure III- 23 : Profils d'extraction de la cocaïne et la BZE en milieu aqueux pur sur les MIP 2-VP et son NIP. Fractions de 1 mL.

III.4.4 Conclusions

Le MIP UV synthétisé avec du MAA, de l'EGDMA et du MeCN par une initiation photochimique à 15°C, a montré une très grande sélectivité pour la cocaïne en milieu hydro-organique et en milieu aqueux pur suite à quelques ajustements du protocole d'extraction. L'extraction de l'EME a aussi présenté une importante sélectivité en milieu aqueux, et en milieu hydro-organique même si sa rétention était tout de même assez faible dans ce dernier. Malgré la forte rétention de la BZE sur le MIP UV en milieu MeCN, lors du passage à un milieu aqueux ou hydro-organique, le MIP UV ne retient plus la BZE indépendamment du solvant utilisé par la suite pour les lavages. Comme il s'agit du métabolite le plus recherché dans les matrices biologiques aqueuses lors de l'analyse de la cocaïne, diverses synthèses ont été effectuées en changeant d'agent réticulant ou de monomère fonctionnel, mais dans tous les cas, la rétention de la BZE était moins importante que sur le MIP UV en milieu MeCN, et donc l'utilisation de ces supports en milieu aqueux n'aurait pas permis de retenir cette molécule.

Considérant l'importante sélectivité du MIP UV pour la cocaïne dans tous les milieux purs testés, il était intéressant pour la suite d'appliquer ces protocoles d'extraction à des échantillons biologiques, et ainsi étudier l'apport d'une purification sur MIP avant l'analyse chromatographique des molécules ciblées. Pour la suite de l'étude, ce MIP UV sera nommé tout simplement MIP.

III.5 Applications du MIP dans des milieux réels

III.5.1 Application à l'extraction sélective de cocaïne et de BZE d'extraits de cheveux

Compte tenu des bons résultats obtenus pour le MIP en termes de rétention et de sélectivité pour la cocaïne et la BZE en milieu MeCN, le protocole d'extraction a été appliqué tout d'abord à des extraits de cheveux dopés avec de la cocaïne et de la BZE. L'EME étant un métabolite assez polaire, elle n'est quasiment pas intégrée dans les cheveux, donc elle n'a pas été étudiée pour cette application. La même procédure d'extraction de la matrice cheveux que celle décrite dans le chapitre II (Figure II- 14) a été utilisée. Dans un premier temps, des concentrations de 4 ng de cocaïne et de BZE par milligramme de cheveux ont été utilisées pour tester la sélectivité du protocole d'extraction sur le MIP dans ce milieu. Le protocole d'extraction est celui présenté sur le Tableau III- 3 mais avec, pour solution de percolation, un extrait dans du MeCN de cheveux contenant $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cocaïne et de BZE (équivalent à $4 \text{ ng}\cdot\text{mg}^{-1}$ de cheveux). Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure III- 24.

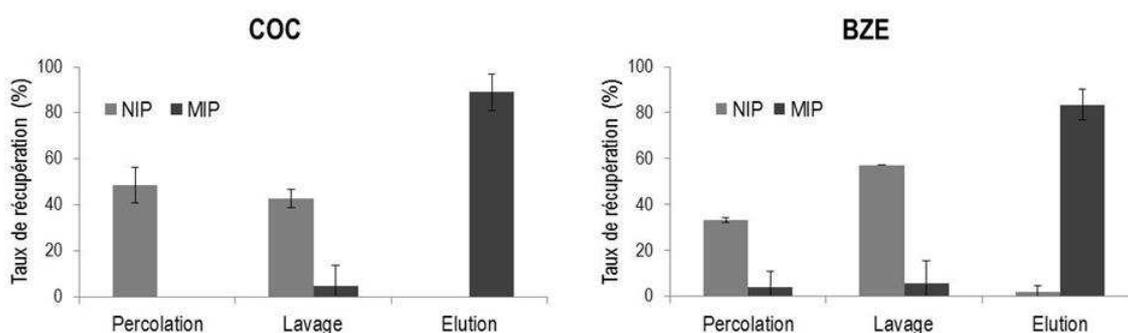


Figure III- 24 : Profils d'extraction de la cocaïne et la BZE avec le MIP et son NIP après percolation de 1 mL d'extrait de cheveux en MeCN dopé à $4 \text{ ng}\cdot\text{mg}^{-1}$ de cheveux de cocaïne et de BZE ($n = 3$). Les conditions d'extraction sont celles du (Tableau III- 3).

La Figure III- 24 montre que la cocaïne et de la BZE sont fortement retenues sur le MIP pour ces échantillons dopés d'extraits d'une matrice biologique. Les rendements obtenus pour la cocaïne et la BZE sur le MIP sont respectivement de $89 \pm 8 \%$ et de $83 \pm 7 \%$. En ce qui concerne le NIP, les rendements de la cocaïne et la BZE à l'éluion sont respectivement de 0% et de $2 \pm 3 \%$, ce qui démontre que le protocole d'extraction est toujours très sélectif. Les profils d'extraction dans ce type d'échantillon sont assez semblables à ceux obtenus en milieu MeCN pur (Figure III- 9), néanmoins, on observe une différence pour le NIP pendant les étapes de percolation et de lavage. En effet, la cocaïne et la BZE sont bien retenues sur le NIP à la percolation pour le profil en milieu organique pur, mais dans le cas de l'extrait de cheveux, une moindre rétention à la percolation est observée. Ces résultats pourraient s'expliquer par la présence de protéines et autres composés provenant des cheveux qui se retrouvent dans l'extrait et qui peuvent interagir avec le NIP limitant ainsi la rétention par des interactions non spécifiques des composés ciblés sur le NIP à la percolation. Les interactions

spécifiques au sein du MIP de la cocaïne et la BZE semblent suffisamment fortes pour contrer cet effet de la matrice extraite des cheveux observé pour le NIP. Les chromatogrammes correspondant à l'analyse par LC-UV d'un extrait blanc de cheveux ainsi que d'un extrait de cheveux dopé avec de la cocaïne et la BZE à 4 ng.mg^{-1} avant et après l'extraction sur le MIP sont présentés sur la Figure III- 25.

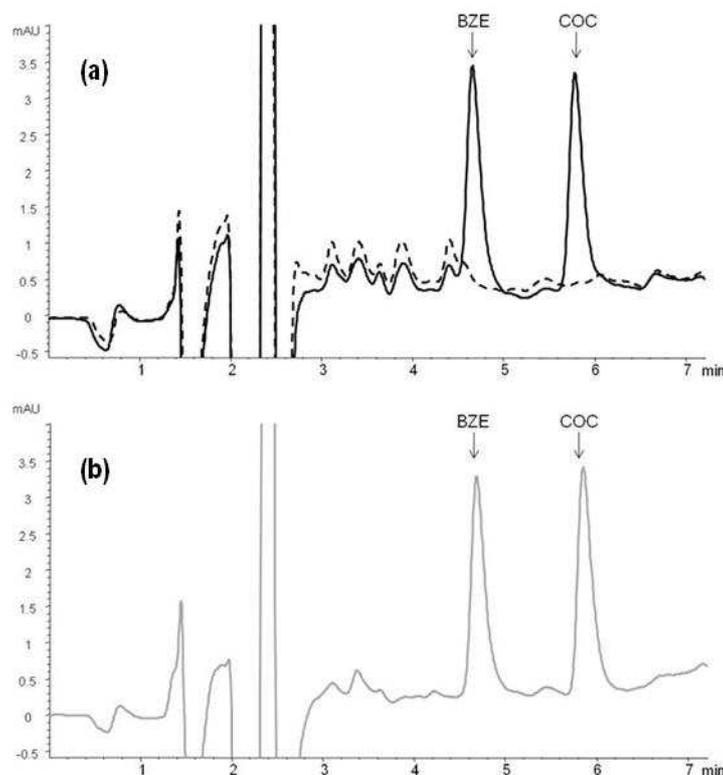


Figure III- 25 : Chromatogrammes LC-UV d'extraits de cheveux dans du MeCN dopés (ligne noire unie) et non-dopé (ligne noire pointillée) avec de la cocaïne et de la BZE à 4 ng mg^{-1} (a), et d'un extrait MeCN de cheveux dopé à 4 ng.mg^{-1} après une étape de SPE sur le MIP (b).

Même si la LC-UV n'est pas particulièrement adaptée à l'analyse de traces dans des milieux biologiques, son manque de sélectivité permet d'apprécier en revanche la sélectivité apportée par le MIP. En effet, on observe que sans le nettoyage apporté par le MIP (Figure III- 25 (a)), le pic de BZE subit une co-élution d'un composé interférent pouvant nuire à sa quantification. Sur la Figure III- 25 (b), on observe que l'utilisation du MIP permet de purifier l'échantillon car le composé interférent n'est plus présent sur le chromatogramme. L'analyse de la cocaïne et la BZE dans les cheveux a également été réalisée pour des échantillon dopés au seuil de positivité utilisé par la « Society of Hair Testing » et qui correspond à $0,5 \text{ ng}$ de chaque analyte par milligramme de cheveux (Tableau I- 2). Les chromatogrammes obtenus en LC-MS en mode MRM sont présentés en Figure III- 26. La LC-MS qui est préconisée pour l'analyse de traces dans des matrices biologiques par sa sensibilité et aussi par son importante sélectivité conduit à l'obtention de chromatogrammes très propres avant et après le nettoyage de l'échantillon dopé par le MIP.

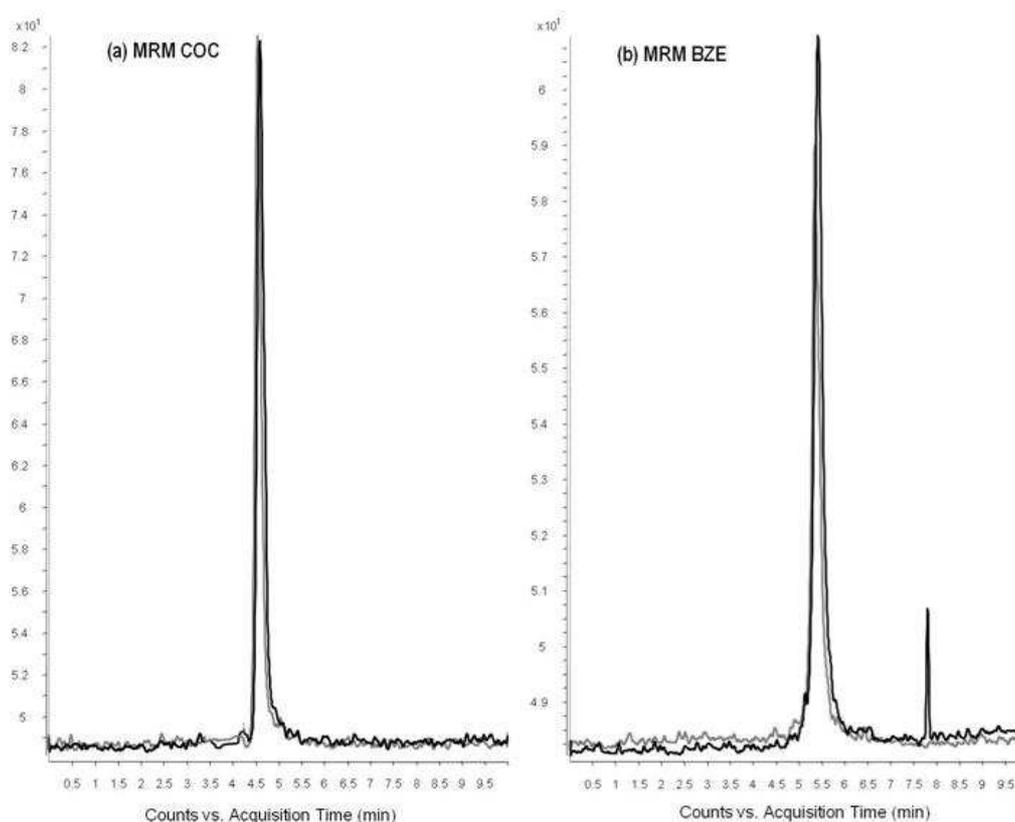


Figure III- 26 : Chromatogrammes LC-MS des transitions MRM de la cocaïne (a) et de la BZE (b) d'un extrait MeCN de cheveux dopé avec $0,5 \text{ ng}\cdot\text{mg}^{-1}$ de cocaïne et de BZE avant (ligne noire) et après (ligne grise) purification par le MIP.

Les résultats observés en LC-UV ont donc démontré le potentiel du MIP pour le nettoyage de composés interférents d'une matrice biologique en vue de la quantification de traces de petites molécules. Sans l'étape de purification avec le MIP, une étape de séparation plus rapide n'est pas envisageable en LC-UV, car la co-élution de composés interférents avec les analytes cibles générerait un problème de quantification. D'ailleurs, ces co-élutions risquent de causer des problèmes en LC-MS à l'étape d'ionisation car le signal pourrait se trouver supprimé ou exalté.

Les performances de la méthode de traitement de l'échantillon suivie de l'analyse chromatographique par LC-MS pour des échantillons de cheveux ont été déterminées en termes des limites de détection et de quantification de la méthode. L'estimation des LDD et LDQ a été basée sur les résultats obtenus sur un chromatogramme LC-MS correspondant à l'analyse d'un extrait de cheveux dopé à $0,5 \text{ ng}\cdot\text{mg}^{-1}$ avec de la cocaïne et de la BZE après une extraction par le MIP puis une dilution de 1/20 de la fraction d'élution. Ainsi, les LDD et LDQ des solutions injectées ont été obtenues en considérant des rapports signal sur bruit de 3 et de 10 respectivement. Considérant les rapports de dilution et d'extraction de la matrice cheveux, au final, les LDD obtenues sont de $10 \text{ pg}\cdot\text{mg}^{-1}$ et $20 \text{ pg}\cdot\text{mg}^{-1}$ de cheveux pour la cocaïne et la BZE respectivement, et les LDQ sont de $40 \text{ pg}\cdot\text{mg}^{-1}$ pour la cocaïne et $70 \text{ pg}\cdot\text{mg}^{-1}$ pour la BZE. Ces LDQ sont presque 10 fois plus faibles que le seuil décisionnel

de confirmation, et elles sont aussi inférieures aux niveaux normalement retrouvés dans les cheveux (Tableau I- 2). Néanmoins, les LDQ pourraient être encore plus basses considérant que pour la méthode utilisée les échantillons ont été dilués 20 fois avant d'être injectés pour obtenir une solution plus proche de la phase mobile utilisée. Si au lieu de diluer les fractions d'élution, elles avaient été évaporées puis reprises avec 200 μL de phase mobile, comme c'était le cas lors des analyses par LC-UV, les LDQ seraient certainement beaucoup plus basses. Des LDQ de l'ordre de 0,7 $\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}$ pourraient très probablement être atteintes.

III.5.2 Application du MIP dans le sérum

Le MIP a montré un fort potentiel pour l'analyse de traces de cocaïne, BZE et EME dans un milieu organique tel que le MeCN. Des applications à l'analyse d'extraits de cheveux ont démontré qu'il était possible de nettoyer cette matrice pour obtenir des chromatogrammes propres et pour pouvoir quantifier les molécules cibles en LC-UV et en LC-MS. Cependant, les extraits de cheveux restent une matrice biologique assez propre et ne permettent donc pas d'observer le vrai potentiel des MIP pour le traitement d'échantillons complexes. Contrairement aux cheveux, des échantillons biologiques tels que le sérum sont des matrices très complexes pour lesquelles le traitement de l'échantillon est une étape incontournable pour l'analyse quantitative.

Précédemment, la rétention de la cocaïne et ses métabolites dans un milieu hydro-organique a été étudiée (Figure III- 12). Cette étude a montré la nécessité d'étudier la rétention de la BZE dans un milieu hydro-organique en fonction du pH de l'échantillon à cause de la nature zwitterionique de ce métabolite que l'on cherche à retenir sur un support contenant des résidus de MAA ionisables. Pour cette étude, des échantillons de sérum, dont les protéines majoritaires ont été préalablement précipitées avec du MeCN (50 % v/v), ont été dopés avec de la cocaïne et de la BZE à 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ et percolés sur le MIP et le NIP (annexe 4). L'utilisation de sérum au lieu de solution hydro-organiques pures permet effectivement d'évaluer non-seulement l'effet du pH mais aussi celui des autres molécules interférentes se retrouvant dans la matrice biologique notamment les sels. Avant de réaliser l'étude de la rétention en fonction du pH de percolation, il a été nécessaire d'évaluer l'impact de la matrice de l'échantillon sur la rétention de la cocaïne et de la BZE. La rétention de l'EME n'est pas testée pour cette étude puisque ses propriétés acido-basiques sont assez proches de celles de la cocaïne, et donc la cocaïne pourra servir de référence.

III.5.2.1 Évaluation des effets de la matrice sérum sur les profils d'extraction

Une série de protocoles d'extraction a été testée en milieu sérum avant de réaliser l'étude du pH de l'échantillon. Sur le Tableau III- 6 sont présentés les différents protocoles étudiés et sur la Figure III- 27 les profils d'extraction de la cocaïne correspondants.

Étape	Percolation	Lavages	Élution	Quantité de MIP UV
Profil 1	1mL COC et BZE 0,5 µg.mL ⁻¹ en sérum/MeCN 50/50 (v/v)	1 mL MeCN 100 % 1 mL MeCN/MeOH 97,5/2,5 (v/v)	2mL MeCN/MeOH 97,5/2,5 (v/v)	25 mg
Profil 2	0,5mL COC et BZE 0,5 µg.mL ⁻¹ en sérum/MeCN 50/50 (v/v)			25 mg
Profil 3	0,5mL COC et BZE 1 µg.mL ⁻¹ en sérum/MeCN 50/50 (v/v)			50 mg

Tableau III- 6 : Protocoles d'extraction testés en milieu sérum/MeCN 50/50 (v/v) pour le MIP et son NIP correspondant.

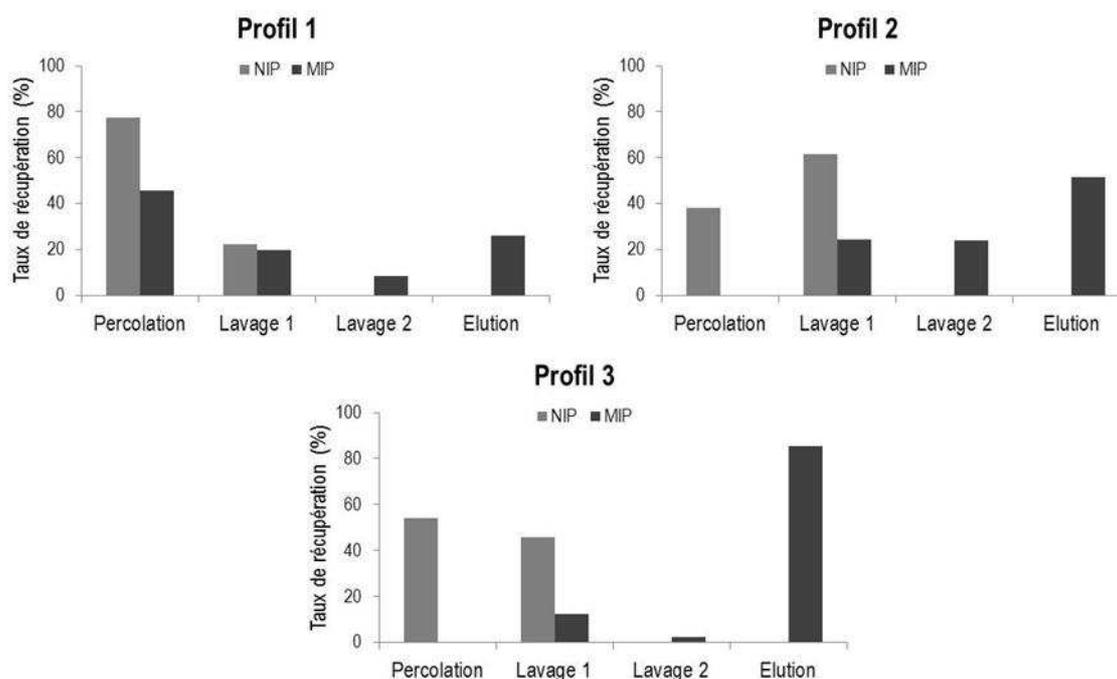


Figure III- 27 : Profils d'extraction de la cocaïne d'un échantillon de sérum dopé après la précipitation des protéines par du MeCN. Les protocoles correspondant à chaque profil sont détaillés sur le Tableau III- 6.

La Figure III- 27 ne présente que les profils d'extraction de la cocaïne car pour la BZE les résultats sont assez semblables à ceux obtenus en milieu hydro-organique, c'est-à-dire qu'elle est éluee du MIP à plus de 70 % lors de la percolation. Pour le profil 1, le même protocole que celui utilisé en milieu hydro-organique a été appliqué mais pour une quantité plus faible de cocaïne percolée. Il apparaît que 45 % de ce composé est élué du MIP lors de la percolation, indiquant une influence des composés du sérum traité sur la rétention de la cocaïne. Afin de

favoriser la rétention, le volume de percolation a été réduit à 0,5 mL (profil 2) pour que la quantité d'interférents soit moins importante. Effectivement, une meilleure rétention est obtenue pour la cocaïne puisqu'elle est retenue sur le MIP lors de la percolation. Cependant, lors des lavages, environ 50 % de la cocaïne est éluée du MIP, soulignant encore l'impact du milieu sur la rétention de la cocaïne. Finalement, pour favoriser la rétention de la cocaïne en augmentant le nombre de sites spécifiques, la quantité d'adsorbant a été doublée (profil 3). Cette fois-ci une bonne sélectivité est obtenue avec un rendement pour le MIP à l'élution de 85 %. Donc, pour la suite de l'étude du pH de percolation, ce sont les conditions correspondant au profil 3 qui ont été utilisées, c'est-à-dire basé sur l'utilisation de 50 mg de MIP.

III.5.2.2 Influence du pH sur la rétention des analytes ciblés sur le MIP

La Figure III- 28 présente les taux de récupération de la cocaïne et la BZE dans la fraction d'élution (Figure III- 28 (a)) ainsi que les pourcentages de cocaïne et de BZE élués lors de la percolation (Figure III- 28 (b)) en fonction du pH de la solution de percolation pour un pH compris entre 3 et 11. La préparation des échantillons de sérum est décrite en annexe 4.

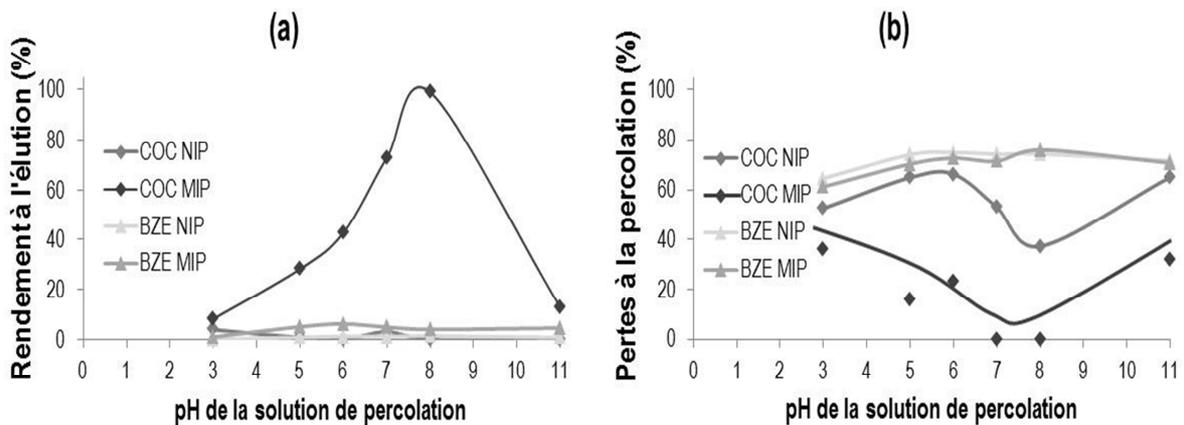


Figure III- 28 : Pourcentage de cocaïne et de BZE des fractions d'élution (a) et de percolation (b) en fonction du pH après application du protocole d'extraction du profil 3 (Tableau III- 6).

Pour la cocaïne ($pK_a = 8,6$), les rendements sur le MIP augmentent entre $pH = 3$ et $pH = 8$, puis ils diminuent très rapidement pour des $pH > 8$ (Figure III- 28 (a)). De la même façon, la rétention de la cocaïne sur le MIP UV à la percolation (Figure III- 28 (b)) augmente entre $pH = 3$ et $pH = 8$, puis diminue pour $pH > 8$. Les interactions spécifiques de la cocaïne avec le MIP semblent être principalement des interactions électrostatiques entre le groupement amine protoné de la cocaïne et les groupements acides déprotonés des résidus de MAA intégrés dans la chaîne polymérique du MIP. Le pK_a de la cocaïne étant égal à 8,6 (Tableau I- 1), son

groupement amine se trouve sous forme protonée pour $\text{pH} < \text{pK}_a$, et à des pH proches ou supérieurs à 8,6, la cocaïne se trouve déprotonée et les interactions électrostatiques ne sont plus possibles, d'où la chute du rendement à $\text{pH} > 8$. En ce qui concerne les groupements acides de la chaîne polymérique, une étude a montré que le pK_a du MAA au sein du polymère est proche de 6,8 [134], donc le pH doit être supérieur à 6,8 pour que les groupements acides soient déprotonés. La baisse du rendement d'extraction de la cocaïne sur le MIP UV pour des $\text{pH} < 7$ est donc bien justifiée puisque les résidus acides de monomère du MIP se trouvent protonés et donc non chargés. Les rendements sont finalement les plus élevés pour un intervalle de pH entre 7 et 8. Comme le pH du sang est égal à 7,4, il ne sera donc pas nécessaire d'ajuster le pH des échantillons pour l'extraction sélective de la cocaïne. Cependant, cette étude a principalement été réalisée pour améliorer la rétention de la BZE, mais malheureusement le rendement du MIP pour cette molécule ne dépasse pas 5 % dans tout le domaine de pH testé. En effet, dans tout cet intervalle de pH, une importante quantité de BZE (> 60 %) est perdue dès la percolation. Donc, même si des lavages moins éluants étaient utilisés, il ne serait pas possible de développer un protocole d'extraction sélectif pour la BZE dans ce milieu car elle n'est même pas retenue à la percolation. Ce manque de rétention de la BZE doit certainement être lié à la présence du groupement acide carboxylique, dont le pK_a est égal à 2,25. La BZE a effectivement une charge négative dans tout l'intervalle de pH testé et elle doit alors certainement subir des répulsions avec les groupements MAA déprotonés de la chaîne polymérique, ce qui empêche sa rétention ; rétention qui n'est pas plus facilitée en milieu hydro-organique compte tenu du caractère polaire de cette molécule.

III.5.2.3 Performances de la méthode

La répétabilité de la méthode développée précédemment pour l'extraction de la cocaïne a été évaluée après élimination du deuxième lavage, c'est-à-dire le lavage avec un mélange MeCN/MeOH 97,5/2,5 v/v, celui-ci n'étant pas vraiment nécessaire au regard des résultats obtenus pour le profil 3 de la Figure III- 27. Donc pour évaluer la répétabilité de l'extraction de la cocaïne en milieu sérum, des échantillons de 0,5 mL de sérum après précipitation des protéines par l'ajout de 50 % de MeCN, dopés avec $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de cocaïne et sans ajustement de pH, ont été percolés. L'élution a été réalisée avec 2 mL d'une solution de MeOH avec 5 % d'acide acétique après le lavage des cartouches avec 1mL de MeCN pur. Les résultats sont présentés sur la Figure III- 29.

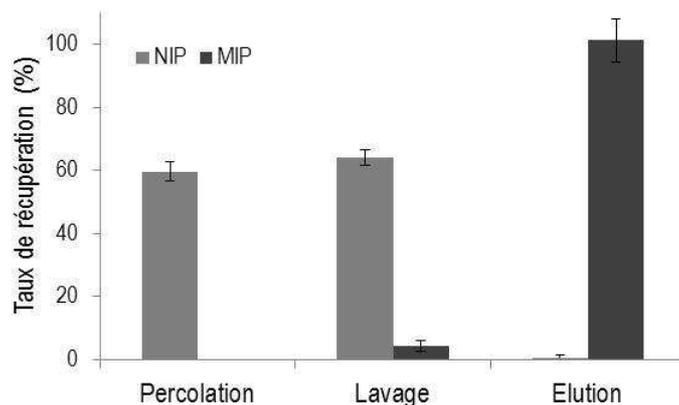


Figure III- 29 : Profils d'extraction de la cocaïne sur le MIP et le NIP obtenus après percolation de 0,5 mL d'un échantillon de sérum traité par 50 % de MeCN, dopé avec $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de cocaïne ($n = 3$).
Lavage : 1 mL de MeCN, élution : 2 mL MeOH/acide acétique 95/5 v/v.

Le protocole conduit à une bonne rétention de la cocaïne, une excellente sélectivité et une bonne répétabilité, avec des rendements de $101 \pm 7 \%$ pour le MIP et de $0,6 \pm 1 \%$ pour le NIP à l'élution ($n = 3$). Ce même protocole a été appliqué à des échantillons de sérum dopés au seuil décisionnel de positivité dans le sang, c'est-à-dire à 50 ng.mL^{-1} (Tableau I- 2). Les chromatogrammes obtenus par LC-UV correspondants sont présentés sur la Figure III- 30.

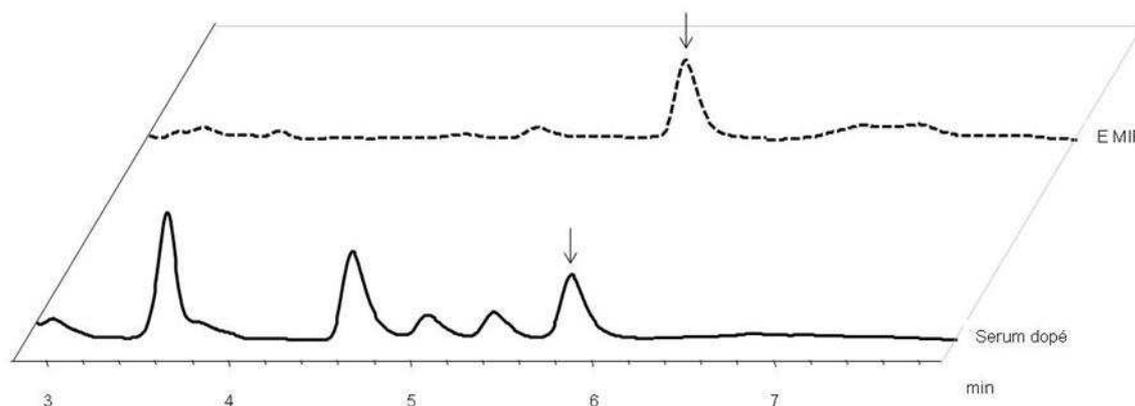


Figure III- 30 : Chromatogrammes LC-UV d'échantillons de sérum dopés avec 50 ng.mL^{-1} de cocaïne (pic montré par une flèche), avant extraction (ligne continue), et après l'extraction avec le MIP (tirets).

L'intérêt de l'utilisation du MIP est bien justifié puisque le chromatogramme correspondant à l'élution du MIP est plus propre que celui obtenu avant l'extraction. Il est donc possible de faire un dépistage dans le sang avec une détection par UV après l'extraction sélective de la cocaïne du sérum par le MIP après une simple étape de précipitation de protéines. La détection en MS serait toutefois nécessaire pour atteindre des niveaux de quantification plus faibles, notamment pour l'étape de confirmation où le seuil de positivité se trouve à 5 ng.mL^{-1} (Tableau I- 2) avec un moindre risque de perturbation de l'ionisation de la cocaïne grâce à la sélectivité apportée par le MIP.

III.5.2.4 Extraction de l'EME du sérum humain sur MIP

Considérant que l'EME est aussi un métabolite couramment détecté dans le sang et qu'il n'a pas de fonction acide, le protocole d'extraction optimisé pour la cocaïne a été évalué pour l'extraction de l'EME (Figure III- 31).

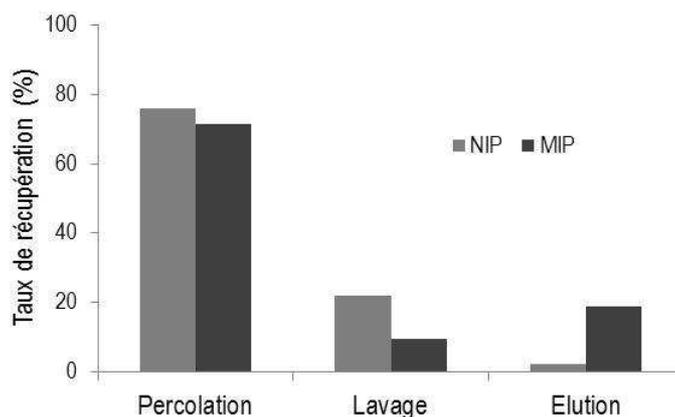


Figure III- 31 : Profils d'extraction de l'EME obtenus avec le MIP et le NIP après percolation de 0,5 mL d'un échantillon de sérum traité par 50 % de MeCN et dopé 50 ng.mL⁻¹ d'EME. Lavage : 1 mL MeCN, élution : 2 mL MeOH/acide acétique 95/5 v/v.

Dans ces conditions, l'EME n'a pas été retenue sur le MIP à la percolation. Le pK_a du groupement amine de l'EME est de 9,3, elle se trouve donc protonée au pH physiologique et peut développer, comme la cocaïne, des interactions électrostatiques avec les cavités spécifiques du MIP. Par contre, l'EME est plus polaire que la cocaïne et de plus petite taille, ceci peut donc expliquer que son affinité pour les sites de reconnaissance soit inférieure. Néanmoins, en comparant les profils en milieu hydro-organique (Figure III- 12) et en milieu sérum (Figure III- 31), on observe que la rétention s'affaiblit d'avantage en milieu sérum puisque l'EME est éluee à 80 % dès la percolation. Les ions présents dans la matrice sérum doivent être à l'origine de ce manque de rétention puisqu'ils entrent en compétition avec l'EME pour interagir avec les sites de reconnaissance spécifique. Si la cocaïne subit moins cet effet c'est parce qu'elle est moins polaire et donc qu'elle compense à priori les interférences agissant sur les interactions électrostatiques par une rétention par effet hydrophobe en milieu hydro-organique. Ceci implique que la dilution par de l'eau de l'échantillon pour abaisser le pourcentage en MeCN utilisé pour la précipitation des protéines peut permettre une amélioration de la rétention de l'EME. D'ailleurs, dans la partie précédente, il a été observé qu'en milieu aqueux pur, l'EME peut effectivement être retenue et même extraite sélectivement par le MIP. Cependant, les interactions sélectives observées en milieu aqueux pur peuvent, comme observé pour le sérum, être sujettes à des phénomènes de compétition

dans un milieu plus complexe. Il est donc important de le vérifier et le milieu biologique aqueux choisi pour cette étude est l'urine.

III.5.3 Extraction de la cocaïne sur MIP d'échantillons urinaires

III.5.3.1 Développement d'un protocole d'extraction de la cocaïne sur MIP d'échantillons urinaires

Ayant obtenu une bonne sélectivité pour la cocaïne sur le MIP en milieu aqueux (Figure III-15), celui-ci a été évalué en milieu urine. Le même protocole d'extraction que celui décrit en Figure III- 15 a été appliqué mais avec une solution de percolation contenant 50 ng.mL^{-1} de cocaïne dans de l'urine dont le pH a été ajusté à 7,4 avec un tampon phosphate salin (PBS) compte tenu de l'étude de l'influence du pH menée précédemment. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure III- 32.

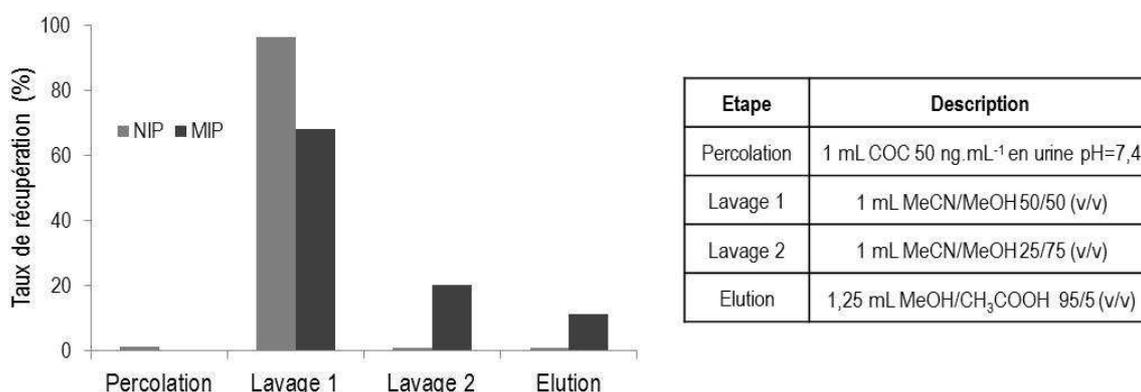


Figure III- 32 : Profils d'extraction de la cocaïne sur MIP et NIP après la percolation d'urine dopée.

La cocaïne est retenue par le MIP à la percolation, mais dès le premier lavage, 60 % de celle-ci est perdu. Il semblerait donc que le protocole optimisé en milieu aqueux ne soit pas l'idéal pour le milieu urine. L'importante quantité d'ions présents dans l'urine doit effectivement occuper les sites d'interaction spécifique du MIP empêchant la cocaïne d'y accéder, phénomène déjà observé en milieu sérum (Figure III- 27 profil 1).

Le protocole d'extraction a donc été modifié afin d'obtenir une extraction sélective de la cocaïne. L'étape de lavage étant trop éluante lors de la percolation d'échantillons urinaires, elle a été modifiée de façon à favoriser la rétention de la cocaïne sur le MIP. Un premier essai de lavage a été réalisé avec 100 % de MeCN entre la percolation et l'élution effectuées dans les mêmes conditions que celles décrites sur la Figure III- 32. Dans ces conditions, la cocaïne a été éluée du MIP à 70 % lors de l'étape de lavage. Sachant qu'en milieu MeCN pur et même en milieu aqueux, un lavage avec du MeCN n'affectait pas la rétention de la cocaïne, il

semblerait que le problème soit lié à des ions présents dans l'urine qui interfèrent avec la rétention de la cocaïne. Un deuxième essai de lavages a consisté à effectuer une étape intermédiaire de lavage du MIP avec de l'eau (entre 1 mL et 3 mL), entre la percolation et un deuxième lavage au MeCN, pour essayer d'éliminer ces ions. Malheureusement, ce lavage intermédiaire à l'eau, même s'il permet la rétention de la cocaïne sur le NIP et le MIP, n'a pas permis de retenir par la suite la cocaïne lors du deuxième lavage au MeCN. Compte tenu de résultats obtenus pour le lavage au MeCN, il a été remplacé par un lavage moins éluant réalisé avec une solution eau/MeCN 50/50 v/v. Le volume utilisé pour ce lavage était de 1 mL et il a été précédé d'un premier lavage avec 2 mL d'eau. En effet, si la première étape de lavage avec de l'eau n'est pas effectuée ou avec un volume trop faible, la rétention de la cocaïne lors du deuxième lavage avec la solution eau/MeCN 50/50 v/v diminue. Dans ces conditions, la rétention de la cocaïne sur le MIP est plus importante puisque seulement 10 % de celle-ci est élué. Ce protocole permet donc de retenir la cocaïne sur le MIP, mais, en ce qui concerne le NIP, il retient environ 40 % de la cocaïne après l'étape de lavage. Pour rendre plus sélectif le protocole d'extraction, le volume de lavage avec la solution eau/MeCN 50/50 v/v a été augmenté à 2 mL. Enfin, dans ces conditions, la sélectivité du MIP pour la cocaïne est meilleure comme en témoigne la Figure III- 33 où le protocole optimisé, ainsi que le profil d'extraction sont présentés.

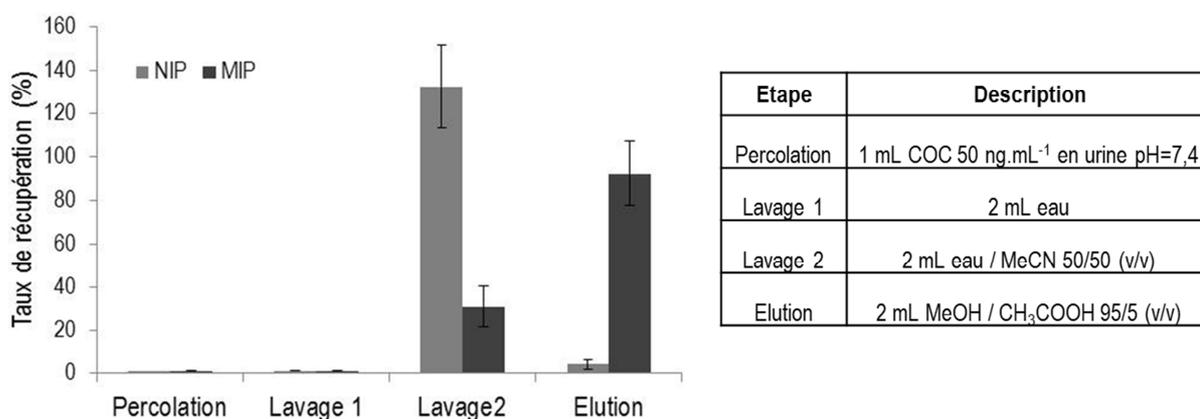


Figure III- 33 : Profils d'extraction optimisés de la cocaïne sur MIP et NIP après percolation d'urine dopée et protocole d'extraction associé (n=3).

Considérant que les ions présents dans l'urine interfèrent avec la rétention de la cocaïne, un premier lavage avec de l'eau a permis d'éliminer une partie de ces ions. Lors de cette étape, la cocaïne est retenue sur les deux supports, le NIP et le MIP. Par la suite, un lavage de 2 mL avec une solution à 50 % de MeCN dans de l'eau a permis d'éliminer les interactions non-spécifiques du NIP en éluant tout de même une partie de la cocaïne du MIP (24 ± 4 %). Finalement, dans les conditions décrites sur la Figure III- 33, la cocaïne est extraite sélectivement de l'échantillon urine avec un rendement de 74 ± 4 % sur le MIP et seulement 3 ± 2 % de rendement pour le NIP (n = 3). Afin d'évaluer l'apport en sélectivité de cette

procédure, l'analyse de la cocaïne dans des fractions d'éluion du MIP et du NIP a été réalisée par LC-UV, en appliquant le protocole d'extraction présenté en Figure III- 33. Les chromatogrammes ainsi obtenus sont présentés en Figure III- 34.

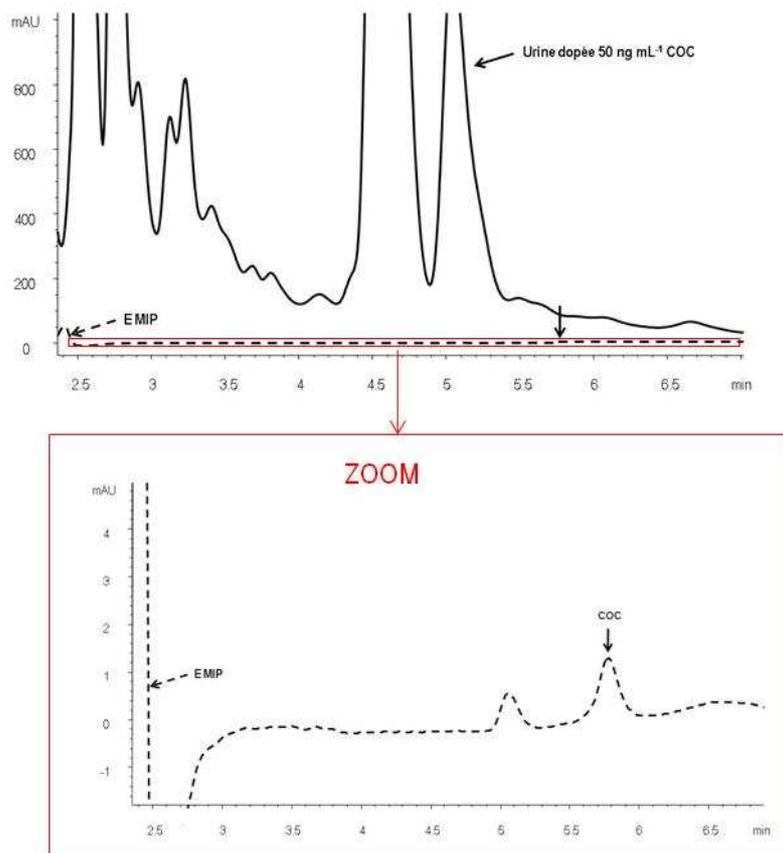


Figure III- 34 : Chromatogrammes LC-UV d'échantillons d'urine dopés avec 50 ng.mL⁻¹ de cocaïne, avant extraction (ligne continue), et après l'extraction sur MIP (tirets). Encadré inférieur : zoom de la partie encadrée.

Les chromatogrammes de la Figure III- 34 ont été obtenus dans les mêmes conditions de concentration pour l'échantillon urinaire avant et après extraction sur le MIP. En ce qui concerne la fraction d'éluion du MIP, elle a été évaporée complètement (2 mL) et reprise avec le même volume de phase mobile (donc 2 mL) de façon à avoir des concentrations comparables à celles des échantillons dopés avant l'extraction. Par conséquent, les chromatogrammes obtenus sont comparables en termes de concentration. Il est clair que l'analyse de l'urine par injection directe n'est pas possible par LC-UV car le chromatogramme présente énormément d'interférents. L'intérêt d'utiliser le MIP est bien démontré puisque le chromatogramme obtenu à l'éluion est très propre.

III.5.3.2 Extraction de l'EME sur MIP d'échantillons urinaires

Considérant que l'EME, comme la cocaïne, avait été extraite sélectivement par le MIP en milieu aqueux pur (Figure III- 15), ce métabolite a été évalué en milieu urine. Le même protocole d'extraction que celui décrit en Figure III- 15 a été appliqué mais avec une solution de percolation contenant 50 ng.mL^{-1} d'EME dans de l'urine dont le pH a été ajusté à 7,4 avec un tampon phosphate salin (PBS). Lors de l'analyse en LC/MS, l'ion correspondant à la transition de l'EME disparaît complètement en présence de la matrice urine. En effet, l'EME est certainement co-éluee avec un grand nombre d'interférents polaires de l'urine puisque son temps de rétention est très court. Il y a donc un effet de suppression totale de l'ion correspondant à la transition de l'EME. Malgré le traitement de l'échantillon d'urine sur le MIP, aucun signal n'est détecté pour l'EME dans aucune des fractions de percolation, de lavage et d'élution. Suite à l'optimisation du protocole d'extraction de la cocaïne (Figure III- 33), cette procédure optimisée a été appliquée à l'EME mais, malgré ces nouvelles conditions, l'EME n'est toujours pas observée par LC-MS car son signal est complètement supprimé.

L'extraction par le MIP en milieu urine ne permet pas d'observer de pics pour l'EME, ce qui implique que cette molécule est certainement éluee dès la percolation, en même temps que des interférents polaires de la matrice urine qui sont à l'origine de la suppression du signal. Pour pouvoir confirmer cette hypothèse il est nécessaire de contrer les effets de matrice. Pour ce faire, les échantillons ont été dilués de façon à réduire la quantité d'interférents. Dans un premier temps, différents facteurs de dilution ont été utilisés pour analyser par LC-MS un échantillon d'urine dopé avec 10 ng.mL^{-1} d'EME. Les résultats ont été comparés avec des solutions aqueuses contenant la même concentration d'EME que les échantillons d'urine à chaque facteur de dilution utilisé. Sur le Tableau III- 7 sont présentés les pourcentages de suppression du signal de l'EME en fonction du facteur de dilution de l'échantillon urine.

Dilution de l'urine avec de l'eau	Suppression du signal
Pas de dilution	- 98 %
1 / 2	- 96 %
1 / 10	- 81 %
1 / 20	- 71 %
1 / 50	- 46 %

Tableau III- 7 : Suppression du signal obtenu pour la transition de l'EME en fonction du facteur de dilution (avec de l'eau) d'un échantillon urine dopé avec 10 ng.mL^{-1} d'EME.

Les résultats obtenus confirment qu'il s'agit bien d'un effet de matrice qui est observé pour l'EME, puisqu'en diluant l'urine, la perte de signal est moins importante. La suppression est considérable puisqu'il faut diluer jusqu'à 50 fois l'urine pour avoir, en milieu urine diluée, plus de 50 % du signal en milieu aqueux. Compte tenu de cela, un protocole d'extraction proche du protocole optimisé pour la cocaïne (Figure III- 33) a été utilisé mais en diluant toutes les fractions 50 fois avec de l'eau. Le protocole ainsi que les résultats obtenus sont présentés sur la Figure III- 35.

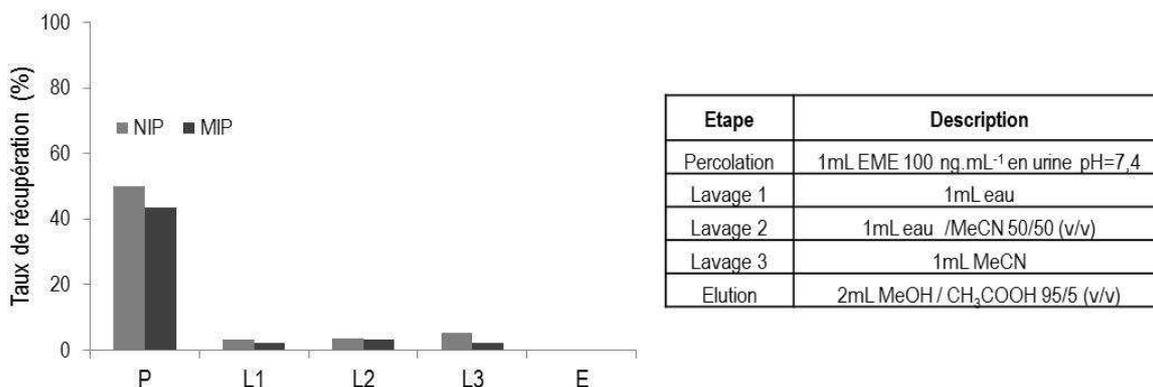


Figure III- 35 : Profils d'extraction de l'EME sur MIP et NIP après percolation d'urine dopée. Les fractions obtenues avec le protocole présenté sur cette figure sont diluées 50 fois avant leur analyse par LC-MS.

Les rendements représentés sur le profil d'extraction sont calculés par rapport à des droites d'étalonnage réalisées dans un milieu aqueux. Finalement, il semblerait que l'EME ne soit pas retenue par le MIP puisqu'à la percolation 44 % (rendement par rapport au signal en eau pure) de l'EME est éluée. Considérant que le signal est supprimé à 46 % (Tableau III- 7), la perte correspondante est proche de 95 % de l'EME pour la percolation sur le MIP. Comme dans le cas des échantillons sérum, la présence d'ions dans l'échantillon semble empêcher la rétention de l'EME sur le MIP.

Pour tenter de retenir l'EME, des dilutions ont été réalisées mais cette fois-ci ce sont les échantillons d'urine qui ont été dilués avant la percolation sur le MIP. Par conséquent, la quantité d'ions dans la solution se retrouve réduite et il devrait y avoir moins de contraintes pour la rétention de l'EME. Le protocole d'extraction et le profil correspondant sont présentés sur la Figure III- 36.

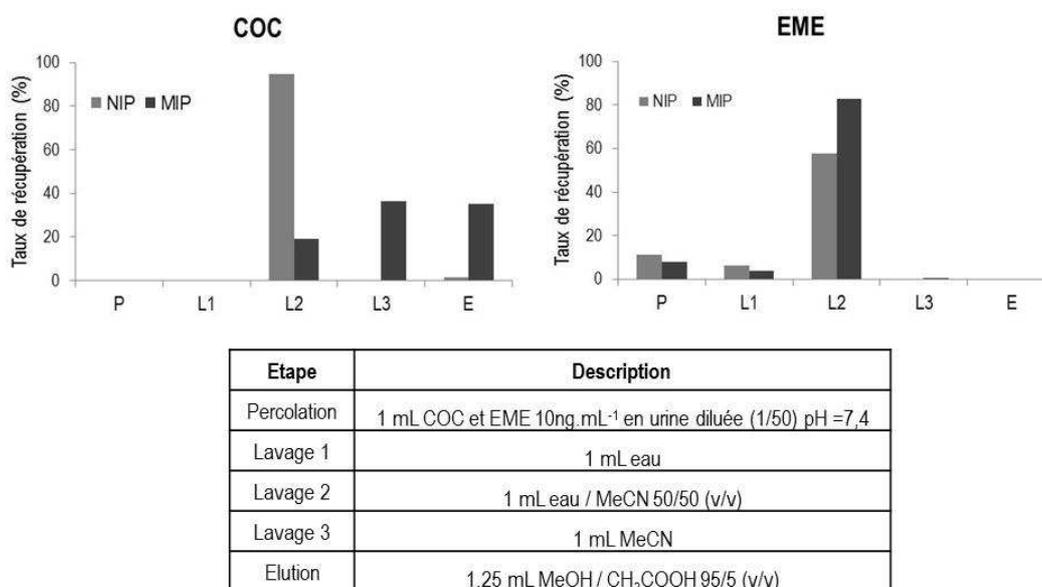


Figure III- 36 : Profils d'extraction de la cocaïne et l'EME sur le MIP et le NIP après percolation d'un échantillon d'urine dopé et dilué 50 fois avec de l'eau suivant le protocole décrit sur la figure.

Le protocole d'extraction utilisé est assez semblable à celui qui a été optimisé pour la cocaïne précédemment (Figure III- 33), d'ailleurs les résultats de la cocaïne sont semblables à ceux obtenus pour l'urine non diluée si l'on rassemble les fractions L3 et E. En ce qui concerne l'EME, les rendements totaux sont proches de 100 %, donc, les effets de suppression d'ions sont pratiquement éliminés. Cependant, le protocole ainsi obtenu n'est pas sélectif puisque lors du lavage avec un mélange eau/MeCN 50/50 (v/v), le NIP et le MIP ne retiennent pas l'EME. Apparemment, la nature polaire de l'EME empêche une rétention convenable sur le MIP comme ce qui avait été observé pour des échantillons de sérum. Cette étude réalisée avec le MIP a donc montré qu'il est impossible d'extraire la BZE et l'EME directement du milieu urinaire mais que l'extraction sélective de la cocaïne dans ce milieu est possible. Par la suite, il semble intéressant de comparer les résultats obtenus pour le MIP avec une approche conventionnelle, c'est-à-dire avec l'utilisation d'un support conventionnel pour la SPE à la place du MIP.

III.5.3.3 Comparaison des performances du MIP à celles d'un support conventionnel

Les résultats obtenus avec le MIP ont été comparés à ceux obtenus avec un support conventionnel à savoir une phase polymérique apolaire (Oasis HLB). Ce support a déjà été utilisé pour l'analyse de la cocaïne et ses métabolites de l'urine ainsi que d'autres matrices biologiques (Tableau I- 4). Un protocole d'extraction général a donc été utilisé sur une cartouche d'Oasis HLB de 30 mg. Un volume de 1 mL d'urine à un pH ajusté à 7,4 et dopée avec 50 ng.mL⁻¹ de cocaïne, BZE et EME a été percolé sur la cartouche. Ensuite la cartouche a été lavée avec 1 mL d'un mélange eau/MeOH 95/5 (v/v), et finalement l'élution a été réalisée avec 1 mL de MeOH pur. Les trois fractions ainsi obtenues ont été évaporées puis reprises pour leur analyse par LC-MS et par LC-UV. Avec ce support, le même problème de suppression d'ions a été observé pour l'analyse d'EME par LC-MS. Les rendements d'extraction obtenus sur ce support pour la cocaïne et la BZE sont de 102 % et 82 % respectivement. Les chromatogrammes LC-UV correspondant à l'urine dopée, à la fraction d'élution de la cartouche Oasis et à une solution aqueuse avec des concentrations similaires en cocaïne et en BZE sont présentés en Figure III- 37 (a) et les chromatogrammes LC-MS correspondant à l'élution du support Oasis HLB sont présentés en Figure III- 37 (b). Dans tous les cas, les échantillons n'ont pas été dilués ni concentrés (volume percolé identique au volume de la fraction d'élution analysée) donc les chromatogrammes obtenus correspondent à l'injection d'échantillons avec des concentrations similaires des analytes.

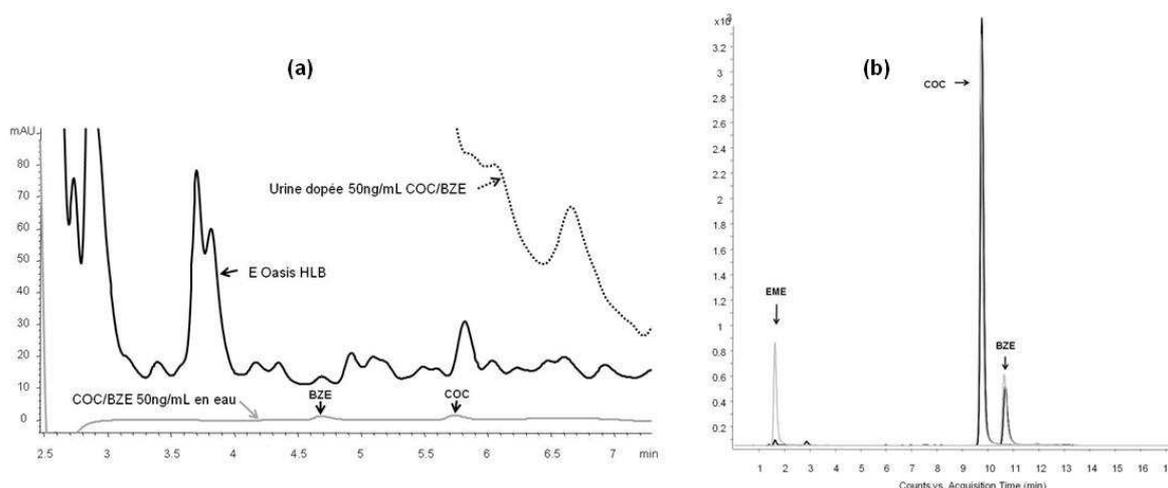


Figure III- 37 : Chromatogrammes en LC-UV (a) et en LC-MS (b) correspondants à l'urine avant (ligne pointillée noire) et après extraction avec la cartouche Oasis HLB (ligne continue noire) et à une solution aqueuse contenant $50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cocaïne et de BZE (ligne continue grise).

Le chromatogramme obtenu en LC-UV montre un grand nombre d'interférents qui sont présents même après la procédure d'extraction. Il est donc difficile de quantifier la cocaïne et la BZE en LC-UV car les pics correspondants ne sont pas visibles à cause du grand nombre d'interférents observés. La quantification a donc été réalisée en LC-MS à partir de droites d'étalonnage réalisées en eau pure dopée. Les transitions de la cocaïne et la BZE sont bien présentes et la quantification est correcte. Les interférences observées en LC-UV ne semblent donc pas affecter les signaux de la cocaïne et la BZE, mais elles pourraient expliquer le manque de signal de l'EME en LC-MS car la fraction d'élution n'est finalement pas très propre après la percolation et le lavage de la cartouche. La comparaison des chromatogrammes obtenus en LC-UV pour les fractions d'élution du MIP et du support Oasis HLB est présentée en Figure III- 38.

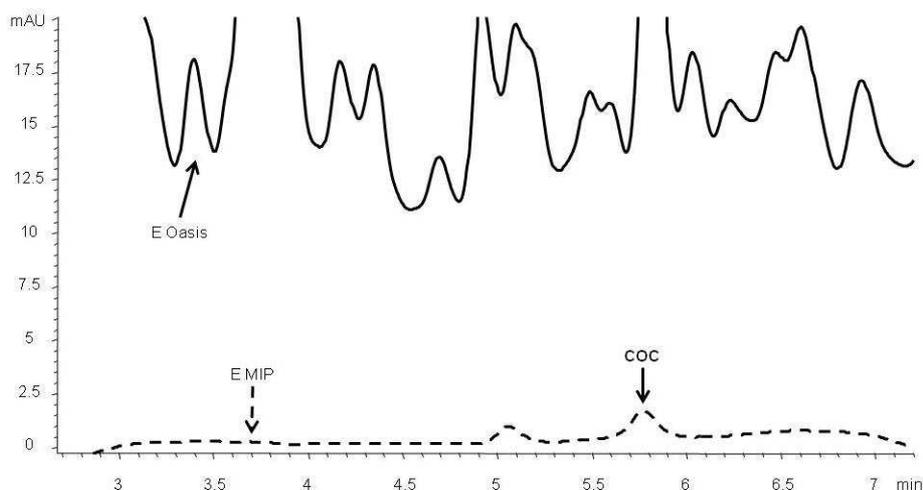


Figure III- 38 : Chromatogrammes en LC-UV correspondants à l'urine dopée avec de la cocaïne et de la BZE et purifiée par une cartouche Oasis HLB (ligne continue noire) ou par le MIP (tirets noirs).

L'avantage que présente le support Oasis HLB face au MIP UV est qu'il arrive à retenir la BZE en même temps que la cocaïne, avec un bon rendement d'extraction. Cependant, le manque de sélectivité de cette extraction est confirmé en LC-UV car le chromatogramme obtenu est très sale par rapport à celui de l'élution du MIP UV. Avec ce type de support il n'est donc pas possible de faire des analyses par LC-UV, et même en LC-MS, d'importants effets de suppression d'ions sont présents pour l'EME et pourraient interférer pour les autres composés, notamment si on réduisait les temps d'analyse.

III.5.3.4 Ajustement du traitement de l'échantillon pour l'utilisation du MIP en milieu urine

La sélectivité du MIP UV a été confirmée pour la cocaïne dans tous les milieux testés : donc en milieu organique pur (Figure III- 11), en milieu, aqueux pur (Figure III- 15), et en milieu hydro-organique pur (Figure III- 12). Une bonne sélectivité pour la cocaïne a aussi été obtenue pour son extraction de milieux biologiques tels que des extraits de cheveux (Figure III- 24), du sérum (Figure III- 29) ou de l'urine (Figure III- 33). Cependant, lors de l'analyse de drogues dans des matrices biologiques, il est nécessaire de quantifier au moins un des métabolites pour pouvoir confirmer avec certitude les résultats obtenus. En plus, ce sont parfois les métabolites qui sont les seules molécules que l'on est encore capable de détecter si la cocaïne est totalement métabolisée. Les seuls milieux où les deux métabolites, donc la BZE et l'EME, ont été extraits sélectivement par le MIP UV sont le milieu organique pur (Figure III- 11) et l'extrait de cheveux (Figure III- 24). Cette sélectivité en milieu organique pourrait être exploitée pour l'analyse d'échantillons biologiques aqueux si une première étape de traitement de l'échantillon permettait d'extraire préalablement les molécules d'intérêt et de les transférer en milieu MeCN avant leur extraction sélective sur le MIP. Une étape de LLE a donc été développée avant l'extraction sélective sur MIP pour extraire la cocaïne, la BZE et l'EME et les transférer en milieu MeCN. Plusieurs méthodes ont été reportées dans la littérature pour la LLE de la cocaïne et de ses métabolites (Tableau I- 3). Parmi ces méthodes, quatre procédures d'extraction ont été adaptées et évaluées pour choisir celle qui conduisait aux meilleurs rendements en milieu aqueux et en milieu urine. Les protocoles d'extraction utilisés sont détaillés dans le Tableau III- 8 et les rendements d'extraction ainsi obtenus sont présentés dans le Tableau III- 9.

Méthode	Ajustement du pH	Solvant d'extraction	Ratio phase aqueuse/phase organique	Source
1	Tampon borate pH = 9	Chloroforme/isopropanol 90/10 v/v	1/8 v/v	[207]
2	Tampon borate pH = 9	Chloroforme / isopropanol 40/60 v/v	3/20 v/v (environ 1/6,7)	[62]
3	Tampon borate pH = 9	Chloroforme / éthanol 87,5/12,5 v/v	3/20 v/v (environ 1/6,7)	[92]
4	Tampon borate pH = 9	Acétate d'éthyle	1/5 v/v	[14]

Tableau III- 8 : Paramètres des méthodes LLE testées pour extraire la cocaïne et ses deux métabolites principaux, la BZE et l'EME, d'échantillons aqueux ou d'échantillons urinaires dopés.

		Extrait 1	Extrait 2	Extrait 3	Extrait 4
COC	Eau	91+/-9	92+/-4	96+/-1	78+/-5
	Urine	93+/-11	101+/-4	90+/-6	97+/-3
BZE	Eau	59+/-3	79+/-10	71+/-5	3+/-2
	Urine	70+/-3	84+/-8	89+/-2	6+/-1
EME	Eau	71+/-15	69+/-9	84+/-5	53+/-10
	Urine	45+/-11	34+/-3	29+/-7	40+/-12

Tableau III- 9 : Rendements (en % de la quantité initiale dans l'échantillon) associés aux protocoles LLE décrits en Tableau III- 8 pour des échantillons d'eau pure et d'urine dopés à 50 ng.mL⁻¹ avec de la cocaïne, de la BZE et de l'EME (n = 3).

La méthode 4 ne convient pas à l'extraction de la BZE car les rendements sont trop faibles. En effet, la méthode utilisée était à l'origine une LLE supportée par un support solide polaire ce qui expliquerait la baisse des rendements de la BZE. Pour les autres méthodes testées, les rendements pour la cocaïne sont dans tous les cas élevés que ce soit en milieu aqueux ou en milieu urinaire. Dans le milieu aqueux, les méthodes 1, 2 et 3 conviennent bien à l'extraction de la BZE et de l'EME car les rendements obtenus sont supérieurs à 59 % pour la BZE et à 71 % pour l'EME. Dans le milieu urinaire, l'extraction de la BZE semble encore plus importante, mais pour l'EME les rendements sont faibles et n'atteignent pas 50 %. Le choix s'est porté sur la méthode 3 car, même si les méthodes 1 et 2 conduisent finalement à des rendements assez proches, l'utilisation d'éthanol a été préférée à celle de l'isopropanol qui est plus toxique et plus cher. La procédure complète d'extraction est détaillée en annexe 6. Les rendements reportés dans le Tableau III- 9 correspondent au rendement final après avoir repris les échantillons dans de l'eau, il est donc nécessaire d'en tenir compte avant de procéder à une extraction sélective sur le MIP.

Les méthodes LLE développées ont été appliquées à de faibles volumes d'échantillons dopés avec d'importantes quantités d'analytes. Considérant que la méthode sur MIP requiert un volume d'échantillon de 1 mL pour le protocole optimisé en milieu organique pur (Tableau III- 3), le volume d'échantillon utilisé pour cette étude est de 0,5 mL d'urine dopée avec 100 ng.mL⁻¹ de cocaïne, BZE et EME. Le rendement de la LLE a été évalué avant de réaliser

par la suite une extraction sur le MIP suivant le protocole décrit sur le Tableau III- 3. Les rendements des différentes étapes du traitement de l'échantillon sont présentés sur le Tableau III- 10.

	Quantité initiale (ng)	Après LLE (ng)	Rendement LLE (%)	Après SPE sur MIP (ng)	Rendement SPE MIP (%)	Rendement final (%)
COC	50	42	85	43	102	86
BZE	50	26	52	25	95	49
EME	50	28	55	23	85	47

Tableau III- 10 : Quantités et rendements pour la cocaïne, la BZE et l'EME obtenus à différentes étapes du protocole de traitement d'un échantillon de 0,5 mL d'urine dopé initialement avec 100 ng.mL⁻¹ des trois composés. Le traitement de cet échantillon a consisté à une étape de LLE (annexe 6), suivie de l'évaporation du solvant organique puis de la reprise avec du MeCN pour finalement faire une étape de SPE sur le MIP UV selon le protocole décrit sur le Tableau III- 3.

Les rendements de la LLE sont meilleurs que ceux obtenus lors du développement de la méthode d'extraction. Ceci peut s'expliquer par le fait que, lors du développement de la procédure de LLE, le volume de reprise de l'échantillon était plus faible par rapport à celui utilisé pour cette analyse. La reprise semble donc plus efficace d'où les meilleurs rendements obtenus dans cette étude. En ce qui concerne la SPE sur le MIP, les rendements sont proches de ceux obtenus en milieu MeCN pur (Tableau III- 9). De plus, les profils présentés en Figure III- 39 indiquent que la sélectivité pour les trois molécules est conservée puisque les rendements sur le NIP à l'élution sont assez faibles.

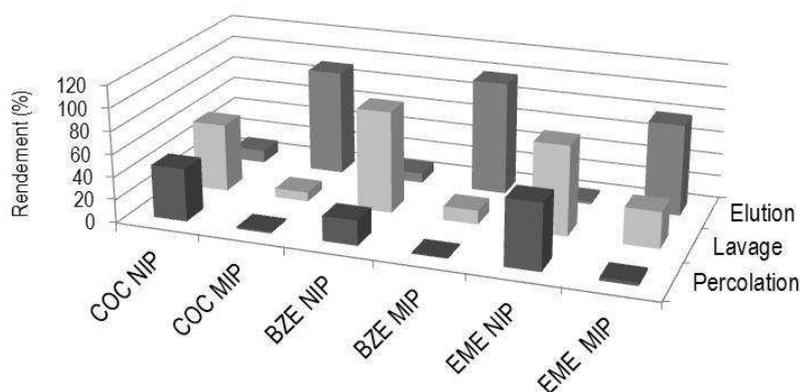


Figure III- 39 : Profils d'extraction de la cocaïne, la BZE et l'EME sur le MIP UV et son NIP correspondant à un échantillon urine dopé avec 100 ng.mL⁻¹ après une LLE. Le protocole d'extraction est celui décrit sur le Tableau III- 3 avec une solution de percolation différente provenant de la LLE de l'urine dopée.

Finalement, le rendement du protocole d'extraction complet est proche de 50 % pour la BZE et l'EME, tandis que pour la cocaïne il est de 86 %. Ce rendement est effectivement limité par l'étape de LLE, cependant, dans ces conditions, si on considère les LDQ de la méthode LC-MS (voir partie III.1.2), il est possible de quantifier des quantités de cocaïne, de BZE et d'EME allant jusqu'à 0,09 ng.mL⁻¹, 0,4 ng.mL⁻¹ et 1,1 ng.mL⁻¹ respectivement dans des

échantillons d'urine. Ces quantités sont très largement inférieures aux seuils décisionnels de confirmation dans l'urine de $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tableau I- 2).

Il est important de noter que suite à l'étape de LLE, l'EME a enfin pu être analysée en milieu urinaire puisque le signal obtenu n'est pas complètement supprimé, comme c'était le cas lors de l'extraction directe sur le MIP. Il y a certes un rendement final moyen (47 %) pour cette molécule, mais c'est surtout la LLE qui en est à l'origine. Les chromatogrammes LC-MS des transitions de la cocaïne, la BZE et l'EME correspondant à l'élution du MIP sont présentés en Figure III- 40.

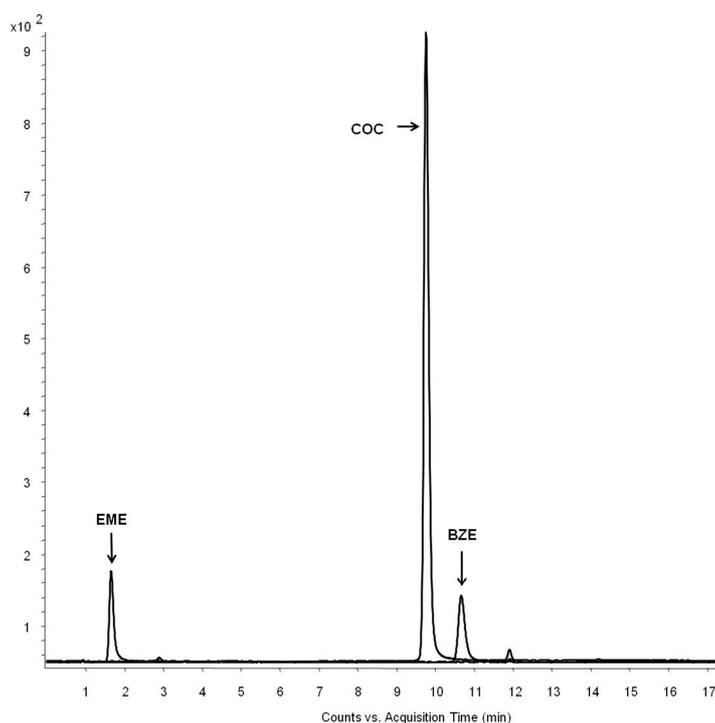


Figure III- 40 : Chromatogrammes en LC-MS d'un échantillon urine dopé avec 100 ng.mL^{-1} de cocaïne, BZE et EME après sa purification par LLE suivie d'une extraction sur MIP.

Bien que l'analyse soit plutôt réalisée en LC-MS pour avoir une meilleure sensibilité, mais aussi car c'est la technique utilisée généralement pour la validation de méthodes lors du contrôle de la cocaïne, des chromatogrammes LC-UV ont été obtenus pour observer avec plus de détail l'apport en sélectivité du MIP pour le traitement de l'échantillon. On observe sur la Figure III- 41 que même après une étape de LLE, la ligne de base du chromatogramme est encore assez perturbée avec des interférents apparaissant au niveau des pics de la cocaïne et de la BZE. Après l'extraction sur le MIP, une grande partie des interférents est éliminée et la ligne de base est propre soulignant encore l'apport en sélectivité du MIP.

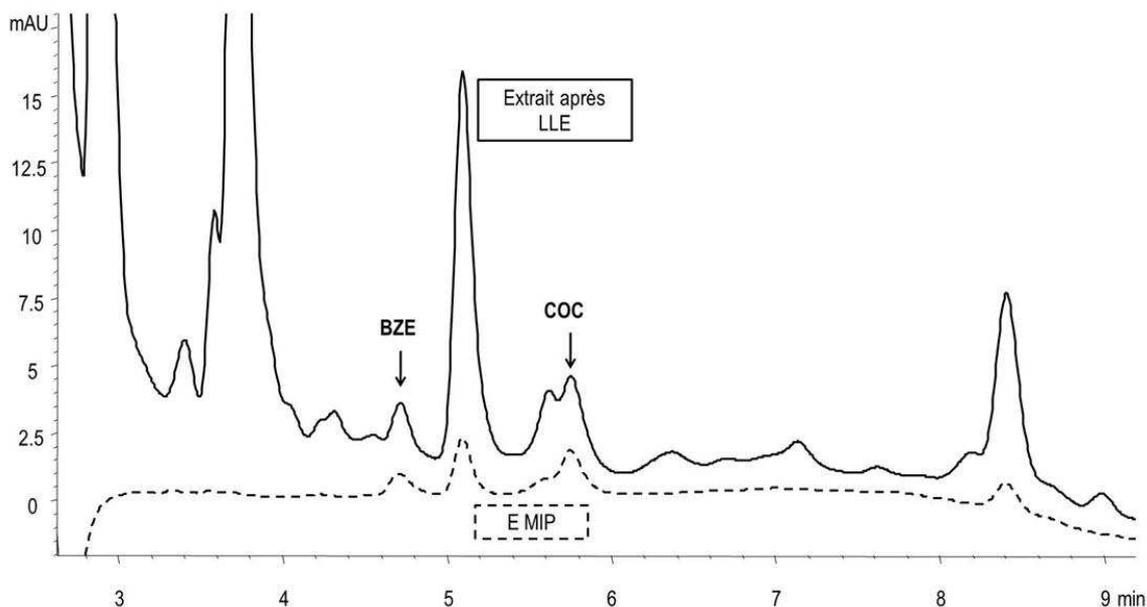


Figure III- 41 : Chromatogramme LC-UV d'un échantillon urine dopé avec de la cocaïne et de la BZE à 100 ng.mL^{-1} après une première étape de LLE (ligne continue) et après une deuxième étape de SPE sélective sur le MIP UV (ligne pointillée).

Conclusions

L'étude réalisée dans ce chapitre a permis d'obtenir un support de MIP sélectif non seulement pour la cocaïne, mais aussi pour ses deux métabolites principaux en milieu organique. Considérant les types de solvants utilisés pour le protocole optimisé, la nature des liaisons sélectives du MIP en milieu organique a été déterminée. Ces interactions semblent être principalement des liaisons hydrogène et des interactions électrostatiques. Ce protocole optimisé en milieu organique a été appliquée à l'analyse d'extraits de cheveux dopés avec de la cocaïne et de la BZE. Les résultats obtenus confirment l'apport du MIP pour le traitement sélectif de l'échantillon avec l'obtention de chromatogrammes propres en LC-MS et en LC-UV, avec la possibilité de quantifier facilement les analytes à de très faibles niveaux de concentration.

Le passage à des milieux hydro-organiques a montré des limitations du MIP pour la rétention de la BZE. En effet, ce composé a une nature zwitterionique et se retrouve doublement chargé dans une large gamme de pH. La répulsion des charges du support imprimé avec la charge négative de la BZE semble être trop grande par rapport aux interactions spécifiques pour permettre la rétention la BZE dans ce milieu. De plus, les interactions hydrophobes sont difficiles à exploiter de par la nature hydro-organique du milieu. Ce milieu présente aussi un inconvénient pour la rétention de l'EME, car cette molécule est très polaire, notamment

lorsqu'il s'agit d'un échantillon de sérum qui contient en plus un grand nombre de sels et autres interférents polaires. Finalement, pour le milieu hydro-organique, seule la cocaïne a pu être extraite sélectivement d'échantillons de sérum dopés, avec des rendements élevés et des chromatogrammes propres.

Dans une troisième étape, la rétention de la cocaïne et de ses métabolites a été étudiée dans un milieu 100 % aqueux. Malgré une meilleure rétention de la BZE à la percolation, certainement due au renforcement des interactions hydrophobes non spécifiques, il n'a pas été possible de développer des protocoles d'extraction sélectifs pour la BZE dans ce milieu. En effet, quel que soit le lavage réalisé après la percolation, la BZE n'est pas retenue sur le MIP. D'autres réactifs ont été utilisés pour la synthèse du MIP, mais aucune de ces approches n'a abouti à un MIP retenant la BZE en milieu aqueux. Une fois de plus, ce manque de rétention semble être lié à la nature zwitterionique de la molécule car dans le cas de la cocaïne et de l'EME, une très forte rétention a été observée en milieu aqueux par le MIP. Le passage à des échantillons d'urine a entraîné une importante perte de rétention de la cocaïne et la suppression totale du signal pour l'EME. Considérant la grande quantité d'ions présents dans cette matrice, des ajustements du protocole d'extraction réduisant leur quantité a permis d'obtenir des profils d'extraction sélectifs pour la cocaïne dans l'urine. En ce qui concerne l'EME, il a été possible de contrer les effets de matrice en combinant une dilution de l'urine à l'extraction sur MIP. Cependant, le protocole obtenu n'est pas sélectif probablement parce que l'EME est retenue dans des sites d'interaction non spécifiques.

Finalement, pour pouvoir appliquer l'extraction sur MIP à des échantillons d'urine tout en bénéficiant de sa sélectivité en milieu organique, une étape de LLE a été utilisée avant l'extraction sur MIP pour pouvoir percoler des échantillons en MeCN lors de l'étape de purification sur MIP. L'extraction sur le MIP a apporté de la sélectivité au traitement de l'échantillon avec l'obtention de chromatogrammes propres même en LC-UV. Avec ces deux étapes de traitement de l'échantillon, il a été possible d'analyser la cocaïne, la BZE et l'EME dans l'urine à des niveaux de concentration couramment retrouvés lors de l'analyse de la cocaïne.

En conclusion, les résultats obtenus dans ce chapitre montrent qu'il est possible de faire des MIP sélectifs pour la cocaïne et ses métabolites qui avaient été choisis initialement comme molécules modèles à analyser dans des matrices biologiques. Cependant, l'objectif de ce travail était aussi d'effectuer l'intégration de ces outils de reconnaissance moléculaire dans des systèmes miniaturisés, ce qui nécessite de la mise en œuvre d'autres voies de synthèse pour pouvoir réaliser cette intégration.

Chapitre IV : Miniaturisation des polymères à empreintes moléculaires

Introduction

Dans le chapitre précédent, des MIP imprimés par la cocaïne ont été appliqués à l'extraction sélective de la cocaïne et ses métabolites dans des matrices biologiques. L'intérêt de cette étape de traitement de l'échantillon a été démontré aussi bien en association avec la chromatographie liquide couplée à une détection UV qu'avec le couplage avec la spectrométrie de masse. Il a également été démontré dans ce travail l'apport d'une méthode de LC miniaturisée en format puce pour l'analyse de petites molécules dans des matrices biologiques, celui-ci ayant conduit à des analyses avec une très haute sensibilité. Cependant, une des limitations du microsystème étudié était le manque de sélectivité de l'étape de SPE qui a conduit à des phénomènes de suppression d'ions nécessitant de diluer fortement l'échantillon. Si pour l'application à l'étude de la cocaïne et de ses métabolites dans l'urine, la perte en sensibilité n'était pas problématique compte tenu des concentrations recherchées, d'autres études pourraient pâtir de cette dilution.

Dans ce chapitre sont donc présentées deux approches de synthèse de MIP en vue de la miniaturisation de l'étape d'extraction mettant en œuvre ces supports sélectifs. Dans un premier temps, la synthèse de microparticules sphériques de MIP sera étudiée. Dans un second temps sera présentée la synthèse de monolithes de MIP sélectifs pour la cocaïne in situ dans des capillaires de silice et leur application à l'extraction en ligne de la cocaïne d'un échantillon d'urine.

IV.1 Synthèse de particules de MIP

Une première approche pour miniaturiser la SPE sur MIP est celle qui consiste à intégrer un MIP en format particulaire au sein des canaux d'un microsystème ou dans un capillaire. Dans les parties précédentes le format de synthèse de MIP le plus classique, qui est la polymérisation en bloc, a été présenté. Dans ce format, un bloc de MIP est synthétisé, puis broyé et tamisé pour obtenir des particules dans un intervalle de tailles défini. Les particules résultantes sont de formes irrégulières et présentent une importante dispersion de tailles

puisque le tamisage ne permet pas d'avoir une séparation fine des particules. De plus, une partie du MIP est perdue lors de cette procédure de broyage et tamisage, perte souvent estimée à 50 %. Enfin, ces particules de formes irrégulières conduisent à un support d'efficacité limitée souvent observée lors de leur utilisation comme support de séparation en HPLC et en CE [208]. Ainsi, cette approche de synthèse en bloc ne convient pas particulièrement pour un remplissage de capillaires ou de canaux d'un microsysteme. Des particules sphériques avec des tailles contrôlées pourraient correspondre à un format plus adapté.

Il existe aujourd'hui diverses méthodes permettant l'obtention de particules sphériques de MIP qui sont résumées dans le Tableau IV- 1. La polymérisation en suspension, la polymérisation par « multi-step swelling » et la polymérisation par précipitation seront discutées plus longuement par la suite. En ce qui concerne le greffage sur des particules, il n'est pas vraiment adapté à des systèmes miniaturisés en raison de la faible capacité des supports résultants, c'est pourquoi ce type de synthèse ne sera pas présenté en détail.

Méthode	Taille des particules obtenues	Avantages	Inconvénients
Polymérisation par précipitation	0,1 μm à 10 μm	Simple Rapide Bon rendement Sans agents stabilisants	Influence de la molécule empreinte sur la morphologie Pas d'approche générique pour la synthèse
Polymérisation en suspension en eau	5 μm à 2 mm	Synthèse contrôlée	Pertes des réactifs dans la phase de dispersion Dispersion des tailles des particules Nécessité d'agents stabilisants Interférences dues à l'eau
Polymérisation en suspension en fluorocarbones	5 μm à 50 μm	Synthèse très contrôlée Phase continue avec peu d'interférents	Dispersion des tailles des particules Nécessité d'agents stabilisants spécialisés Coût élevé
Polymérisation par « multi-step swelling »	2 μm à 50 μm	Faible dispersion de tailles Bon rendement	Synthèse longue et difficile Interférences dues à l'eau
Polymérisation par greffage (core-shell)	Dépend des particules initiales	Faible dispersion de taille	Synthèse compliquée Faible quantité de MIP Greffage difficile à contrôler
Polymérisation par émulsion	< 1 μm	Faible dispersion de taille	Particules très petites (<1 μm) Synthèse compliquée Tensioactifs nécessaires

Tableau IV- 1 : Comparaison des différentes méthodes existantes pour préparer des particules sphériques de MIP (adapté de [209]).

IV.1.1 Différentes approches pour l'obtention de particules de MIP

IV.1.1.1 Polymérisation en suspension

- Principe

La polymérisation par suspension est l'une des méthodes les plus couramment utilisées pour obtenir des particules de polymère sphériques avec des tailles de l'ordre de quelques micromètres. Il s'agit d'une méthode réalisée en mode biphasique où des gouttelettes du mélange de polymérisation, contenant la molécule empreinte, les monomères fonctionnels, le(s) agent(s) réticulant(s), le solvant porogène et l'initiateur radicalaire, sont dispersées dans une phase continue ou « dispersante », puis ces gouttelettes sont par la suite polymérisées pour former des particules de polymère [210]. Un schéma du principe de cette synthèse est présenté en Figure IV- 1.

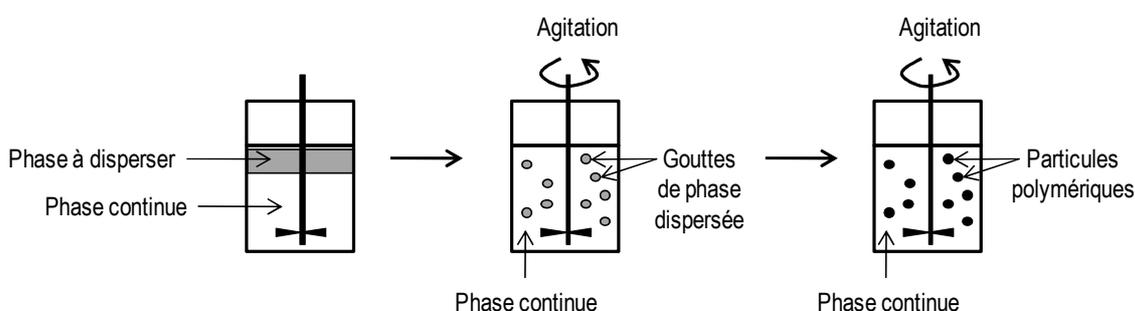


Figure IV- 1 : Principe de la synthèse de particules de MIP avec une polymérisation par suspension.

La phase dispersante est normalement de l'eau [211-213], mais il est aussi possible d'utiliser du fluorocarbène [214] ou de l'huile minérale [215]. Si, généralement les solubilités des réactifs de polymérisation ainsi que du polymère résultant sont faibles dans le milieu de dispersion, des quantités plus importantes de molécule empreinte et de monomères sont introduites dans le mélange réactionnel pour compenser les pertes partielles de réactifs dans la phase de dispersion. La polymérisation a lieu au niveau de la phase dispersée, par conséquent, chaque gouttelette constitue un microréacteur et la cinétique de polymérisation est identique à celle de la polymérisation en bloc ou polymérisation en masse [216]. Pour éviter le crémage ou la décantation des gouttelettes, une agitation est utilisée en continu pendant toute la durée de la réaction. La suspension requiert en plus l'addition d'agents stabilisants pour éviter la coalescence des gouttelettes et pour maintenir la dispersion stable. Ces agents stabilisants sont principalement des polymères hydrosolubles tels que des celluloses modifiées, des sels de polymère d'acide acrylique, des gommes naturelles, et surtout de l'alcool polyvinylique [210]. La polymérisation est initiée à une certaine température ou par radiation UV, et dans ces conditions, les microgouttes de polymère sont converties directement en microparticules sphériques avec une taille proche de celle des gouttelettes. La phase dispersante permet de conserver la chaleur générée lors de la réaction dans ces microréacteurs. Par conséquent, des

taux élevés de polymérisation sont obtenus, ce qui permet d'avoir des réactions assez rapides (≈ 3 heures).

La taille des particules formées par suspension peut en principe aller de quelques micromètres jusqu'à quelques millimètres. Elle dépend de la taille des gouttelettes formées qui elle-même dépend de divers facteurs, notamment la vitesse d'agitation, le ratio entre la phase dispersante et la phase dispersée, la concentration et les propriétés de l'agent stabilisant, et les viscosités relatives des deux phases. L'un des paramètres qui est le plus facilement exploitable pour faire varier la taille des particules est l'agitation, puisque la plupart des autres paramètres sont imposés lors de la synthèse du MIP. Lors de l'utilisation de la polymérisation par suspension, des particules sont toujours formées avec une certaine dispersion de tailles. En effet, durant la réaction, une série d'équilibres dynamiques de coalescence et de rupture des gouttes détermine la taille et la dispersion de tailles des gouttelettes. La vitesse de coalescence et de rupture des gouttes doit donc être contrôlée pour réduire le plus possible la dispersion, mais pour obtenir ce contrôle il est nécessaire d'avoir les mêmes conditions d'agitation pour toutes les gouttes, ce qui est impossible dans un réacteur classique puisque la distribution des vitesses d'agitation dépend du positionnement du liquide dans le réacteur et donc de la proximité des gouttelettes avec l'agitateur [210]. Ainsi, lorsque les conditions opératoires sont choisies avec discernement, la polymérisation par suspension peut conduire à la formation de particules sphériques de taille contrôlée et même avec de faibles dispersions de taille. De plus, ces particules peuvent être aisément récupérées et sont directement utilisables après lavage.

- Synthèse en milieu aqueux

La suspension dans une phase aqueuse est facile à mettre en œuvre et largement documentée dans la littérature, cependant, elle présente un inconvénient majeur pour la synthèse de MIP car l'eau fragilise les interactions hydrophiles entre la molécule empreinte et les monomères fonctionnels. Une solution est celle d'avoir une approche covalente pour la synthèse de MIP par suspension dans l'eau. Cette approche a été utilisée pour synthétiser un MIP ciblé pour la L-histidine [211] utilisé par la suite pour la séparation chromatographique de protéines ayant des groupements histidine de surface. Une autre possibilité consiste à développer des interactions hydrophobes fortes entre la molécule empreinte et les monomères. Ce type d'interactions a été exploité pour la synthèse d'un MIP imprimé au benzopyrène [212] où l'utilisation de 4-vinylpyridine et de DVB respectivement comme monomère fonctionnel et agent réticulant, a permis d'obtenir un MIP avec une affinité semblable à celui préparé par une polymérisation en bloc. Il y a quelques exemples de MIP synthétisés par suspension avec une approche non-covalente et exploitant des interactions électrostatiques. C'est le cas d'un MIP synthétisé en suspension dans l'eau et imprimé par le triméthoprim [213] qui, malgré une capacité et une sélectivité réduites par rapport au polymère en bloc, a conduit à l'enrichissement et la séparation du triméthoprim de tablettes de médicament et d'urine.

- Autres synthèses

Il est possible de suspendre le mélange réactionnel d'un MIP dans une autre phase dispersante telle que l'huile minérale ou les fluorocarbones. Les fluorocarbones ont l'avantage d'être non miscibles avec la plupart des solvants et des monomères utilisés pour la synthèse des MIP, mais, à différence de l'eau, ils ne génèrent pas de liaisons hydrogène et peuvent être utilisés comme un substitut inerte de l'eau [209]. Ces phases fluorocarbonées ont été utilisées pour la synthèse de MIP imprimés N-(tert-butoxycarbonyl)-L-phénylalanine (Boc-L-Phe) avec l'addition d'agents stabilisants particuliers développés pour cette application [214]. Ces travaux ont montré la possibilité de synthétiser des particules de MIP sphériques avec des tailles allant de 5 μm jusqu'à 50 μm et dont la taille et la dispersion peuvent être réduites en augmentant la quantité d'agent stabilisant. Les MIP obtenus ont montré une bonne sélectivité par analyse HPLC frontale. Plusieurs solvants ont été utilisés dans cette application comme solvants porogènes, et la plupart d'entre eux sont compatibles avec une phase dispersante en fluorocarbone, sauf le MeCN. Malgré les avantages apportés par la suspension en fluorocarbone, le nombre d'applications de cette méthode est assez réduit probablement à cause du coût de cette phase dispersante et de la nécessité de développer des agents stabilisants en fonction du mélange de polymérisation utilisé. Une autre phase dispersante alternative aux fluorocarbones est l'huile minérale qui ne nécessite pas d'agents stabilisants. L'huile minérale a donc été utilisée pour la synthèse de MIP imprimés au propranolol [215]. Une série de synthèses a été réalisée sous forme d'un plan d'expériences pour l'obtention d'un polymère présentant la plus grande sélectivité possible. L'avantage de l'utilisation de la suspension pour cette étude est la rapidité de synthèse qui permet de faire un grand nombre de synthèses dans un temps assez court. De plus, lors de ces synthèses, il n'est pas nécessaire d'ajouter d'agents stabilisants et l'huile minérale n'est pas un réactif très cher. L'inconvénient de l'huile minérale c'est qu'une grande partie des porogènes utilisés en synthèse de MIP est soluble dans celle-ci et ne peut donc pas être utilisée pour cette méthode. Un des porogènes utilisés couramment pour la synthèse de MIP qui n'est pas soluble dans l'huile minérale est le MeCN, ce qui fait de l'huile minérale une phase dispersante complémentaire des fluorocarbones lors du développement d'une synthèse de MIP.

- Miniaturisation de la synthèse en suspension

Une dernière approche possible pour la synthèse de MIP par suspension est celle qui consiste à utiliser des microréacteurs pour la formation des gouttes dispersées. En effet, il existe un grand nombre de microréacteurs qui permettent de former des gouttes de tailles uniformes et contrôlées [217-219]. Un microréacteur en forme de spirale a été utilisé pour la synthèse de MIP imprimés au propranolol par suspension dans du fluorocarbone ou de l'huile minérale [220]. Le microréacteur utilisé est représenté sur la Figure IV- 2.

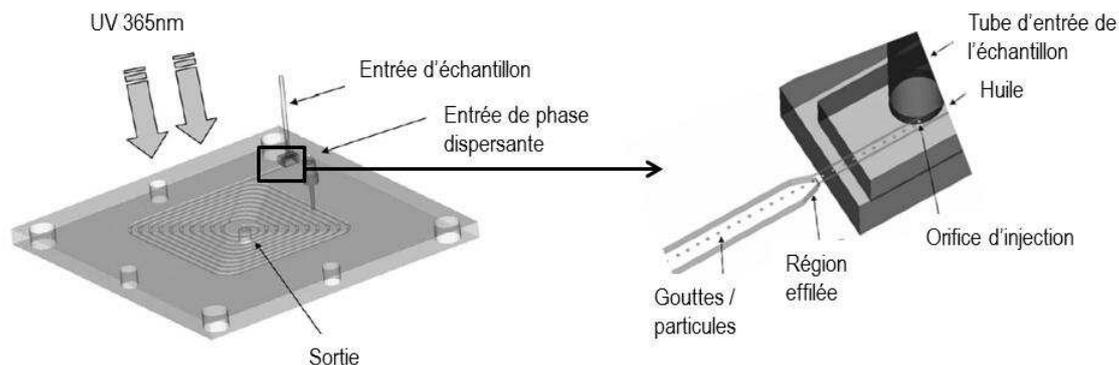


Figure IV- 2 : Schéma représentant un microréacteur en spirale utilisé pour la synthèse de MIP propranolol et détail de la zone d'introduction du mélange de polymérisation dans la phase continue (adapté de [220]).

Le mélange de polymérisation est introduit par un petit orifice dans la phase continue où il est rapidement dissocié par cisaillement pour former des gouttelettes. La forme sphérique des gouttelettes est stabilisée par leur tension superficielle. Le canal est ensuite élargi pour ralentir la vitesse des gouttelettes et ainsi pouvoir prolonger leur exposition au rayonnement UV qui déclenche la polymérisation. Ce type de système requiert une faible quantité de phase dispersante, ce qui est avantageux lors de l'utilisation de fluorocarbones comme phase dispersante. De plus, il a été démontré que la dispersion de tailles des particules obtenues est moins importante que dans le cas d'une suspension conventionnelle en huile minérale ou en fluorocarbone. Une grande diversité de tailles de particules avec une faible dispersion peut être obtenue avec ce microsystème allant de 10 μm jusqu'à 130 μm uniquement en faisant varier les débits des phases dispersante et dispersée. La sélectivité des MIP obtenus a été testée par des tests de « binding » comparant la liaison de molécule empreinte entre le polymère imprimé et le polymère non imprimé. Une plus grande affinité a été obtenue sur les MIP que les NIP et l'affinité était proche de celle obtenue par des particules préparées en suspension conventionnelle. Malheureusement, la sélectivité et le pouvoir de rétention des particules de MIP obtenues avec ce type de microsystème n'ont pas été étudiés plus en détail par SPE ni par chromatographie. Un autre type de microsystème, cette fois-ci avec des canaux en forme de Y a été utilisé pour la synthèse de MIP imprimé à l'atrazine [221]. Pour cette synthèse, la phase continue était constituée d'eau et le mélange de polymérisation formait la phase dispersée avec l'aide d'un agent stabilisant. Cette synthèse a été réalisée avec du mésithylène, insoluble dans l'eau, comme solvant porogène. Les gouttes obtenues dans le microsystème ont ensuite été récupérées et polymérisées en dehors du microsystème par irradiation UV. Des particules d'environ 50 μm de diamètre ont ainsi été obtenues après polymérisation. Le facteur de rétention a été mesuré pour l'atrazine, mais la sélectivité du support n'a pas été confirmée avec un NIP. Finalement, dans une autre publication, deux microsystèmes basés sur la segmentation de débit ont été testés pour la synthèse de particules sphériques monodisperses de NIP et MIP imprimé au trinitrotoluène [222]. Comme dans le

cas précédent, le mélange de polymérisation est dispersé dans de l'eau grâce à un agent stabilisant et le porogène est du chloroforme donc insoluble dans l'eau. Avec ce système, des particules pouvant avoir des tailles de 10 μm à 140 μm avec une faible dispersion ont été obtenues. Pour cet exemple, la sélectivité du MIP a été testée en comparant la capture de trinitrotoluène en milieu vapeur pour le NIP et le MIP. Dans ces conditions, le MIP a présenté une plus grande affinité que le NIP pour le trinitrotoluène confirmant alors une certaine sélectivité.

- Conclusions

La polymérisation par suspension permet des approches très variées pour la synthèse de particules de MIP en format sphérique. Cependant, dans un format conventionnel, la suspension génère des particules sphériques avec une large dispersion de tailles qui n'est pas toujours facile de contrôler. Elle présente en plus quelques inconvénients pour la synthèse de MIP car l'eau n'est pas totalement compatible avec la synthèse de MIP par approche non-covalente. L'utilisation d'autres phases dispersantes est possible, mais dans le cas de l'huile minérale, une grande partie des porogènes fréquemment utilisés pour la synthèse de MIP sont solubles dans la phase dispersante. Quant au fluorocarbène, il s'agit d'un solvant assez cher et qui requiert l'ajout d'agents stabilisants qui sont aussi assez chers. Les microréacteurs peuvent être une bonne solution pour réduire le coût de synthèse des MIP par suspension mais pour l'instant cette technologie n'est pas encore très avancée.

IV.1.1.2 Polymérisation par « multi-step swelling »

Parmi les diverses méthodes de polymérisation utilisées pour la synthèse de particules sphériques de MIP, la polymérisation par « multi-step-swelling » est la mieux adaptée à la synthèse de particules imprimées monodisperses dans une large gamme de tailles allant de 2 μm à 50 μm environ [209]. Cette méthode est basée sur le gonflement de particules par les différents réactifs du mélange de polymérisation, suivie d'une étape de polymérisation. Ce type de synthèse a été introduit par Ugelstadt et Mork [223] et la première application pour la synthèse de MIP date de 1994 où Hosoya et al. [224] ont synthétisé un MIP imprimé aux diamidonaphtalènes et ont obtenu une rétention comparable à celle d'un MIP préparé en bloc. Le principe de la synthèse par « multi-step swelling » est présenté en Figure IV- 3.

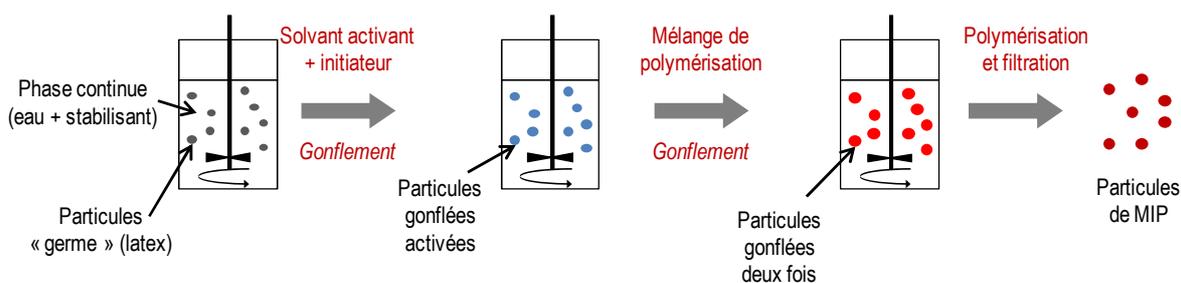


Figure IV- 3 : Principe de la synthèse de particules de MIP avec une polymérisation par « two-step swelling » (adapté de [225]).

Des particules de latex de polystyrène avec un diamètre uniforme (1 μm) sont initialement préparées par polymérisation en émulsion. Ces particules servent ensuite de « germe » pour les différentes étapes de gonflement qui suivent. La première étape de gonflement est effectuée en mettant en contact les particules de latex avec une microémulsion contenant l'initiateur de polymérisation dans un solvant insoluble dans l'eau tel que le dibutylphtalate ou le chlorodécane [226]. Cette étape, dite d'activation, arrive à sa fin lorsque la totalité des gouttelettes de cette émulsion sont adsorbées par les particules de latex. La dispersion de particules « activées » est ensuite ajoutée à une ou plusieurs nouvelles phases dispersées contenant une partie ou la totalité du mélange de pré-polymérisation, contenant donc les monomères, l'agent réticulant, la molécule empreinte et le porogène. Dans tous les cas il est nécessaire d'inclure des agents stabilisants pour maintenir la dispersion. Celle-ci est ensuite agitée pendant plusieurs heures pour que les gouttelettes de réactif soient complètement adsorbées par les particules. La réaction de polymérisation peut alors être initiée sous agitation constante. Les particules ainsi formées ont la forme des particules « germe » initiales, mais leur taille augmente par la croissance du polymère en surface. Il est possible de contrôler la taille finale des particules en choisissant avec discernement les conditions expérimentales telles que les volumes des différentes phases dispersantes utilisées et leurs ratios volumiques.

Comme dans le cas de la suspension conventionnelle, la présence d'eau pour les méthodes de « multi-step swelling » peut fragiliser les interactions entre la molécule empreinte et le monomère fonctionnel. Cependant, des interactions hydrophobes ou électrostatiques peuvent être exploitées pour la formation du complexe monomère fonctionnel/molécule empreinte. À ce titre, pour la toute première synthèse de MIP avec cette approche, d'importantes interactions électrostatiques et hydrophobes entre les diaminophtalènes et le monomère fonctionnel (MAA) ont été exploitées [224]. Le même type d'interactions a été exploité pour la synthèse de MIP imprimés au β -estradiol [227], au bisphénol A [228], au naproxène [229], et au propranolol [230] entre autres molécules.

À différence de la polymérisation en bloc, il est envisageable par cette approche de réaliser des modifications des MIP déjà préparés. Ces modifications se font par addition du

modificateur au milieu réactionnel une fois la polymérisation initiée, ou par dispersion d'une solution contenant le modificateur après synthèse du MIP. La méthode d'addition a été appliquée à la synthèse d'un MIP imprimé au (s)-naproxène dont la surface est modifiée grâce à l'addition de monomères de monométhacrylate de glycérol et de diméthacrylate de glycérol [231]. Les MIP ainsi obtenus, avec leur couche externe hydrophile ont donc les caractéristiques d'une RAM. Il s'agit donc de particules de RAM-MIP, où les macromolécules sont susceptibles d'être exclues par le RAM et les molécules d'intérêt sont retenues par le MIP. Le RAM-MIP naproxène a été utilisé pour l'extraction d'ibuprofène dans des échantillons de sérum couplée à la séparation et analyse par HPLC [231]. Des RAM-MIP imprimés au propranolol ont été aussi synthétisés et utilisés comme supports SPE en ligne pour l'extraction d'aprenolol d'échantillons de plasma de rat [232].

En conclusion, la polymérisation par « multi-step swelling » présente de nombreux avantages comme l'obtention de particules de taille uniforme avec d'importants rendements de synthèse. Cependant, la mise en œuvre de cette technique est longue et complexe. De plus, malgré de bons résultats de séparation en HPLC ou d'extraction par SPE, aucun des travaux cités ne présente une comparaison avec la rétention sur les NIP correspondants probablement à cause de la difficulté de synthèse de la polymérisation par « multi-step swelling ». Il n'est donc pas possible de confirmer une réelle sélectivité des MIP ainsi synthétisés.

IV.1.1.3 Polymérisation par précipitation

- Principe

Les réactions de polymérisation qui conduisent à la formation d'un précipité macroscopique et apparent de polymère sont appelées des polymérisations par précipitation. Souvent le terme de dispersion est utilisé, en effet ce terme se réfère à des dispersions d'une phase solide dans une phase liquide dans le cas général [216]. Une différence principale de cette technique au « multi-step swelling » est que le mélange de polymérisation est initialement homogène comme dans le cas d'une polymérisation en bloc ou dans les gouttelettes lors d'une polymérisation en suspension. Cependant, la quantité de solvant porogène est beaucoup plus élevée pour la polymérisation par précipitation (environ 95 % en volume par rapport à 40-60 % pour une polymérisation en bloc). En effet, pour la polymérisation en bloc (ou dans des gouttelettes en suspension), la structure macroporeuse résulte d'une séparation des phases entre le polymère en formation et le porogène [233]. Les pores sont alors formés lorsque les chaînes de polymère en croissance se relient entre elles laissant des espaces occupés par le porogène. La condition pour avoir cette séparation de phases est que les quantités d'agent réticulant et de monomères fonctionnels soient suffisantes pour pouvoir absorber la totalité du

solvant porogène. Si toutefois la quantité de solvant porogène est augmentée, il arrive un moment où la chaîne de polymère en croissance n'arrive plus à occuper la totalité du volume du réacteur, formant ainsi une dispersion de particules de macro gel. Si la dilution augmente davantage, les particules de gel deviennent de plus en plus petites jusqu'à atteindre une structure de micro gel [233]. Le principe de la synthèse de polymères par précipitation est schématisé en Figure IV- 4.

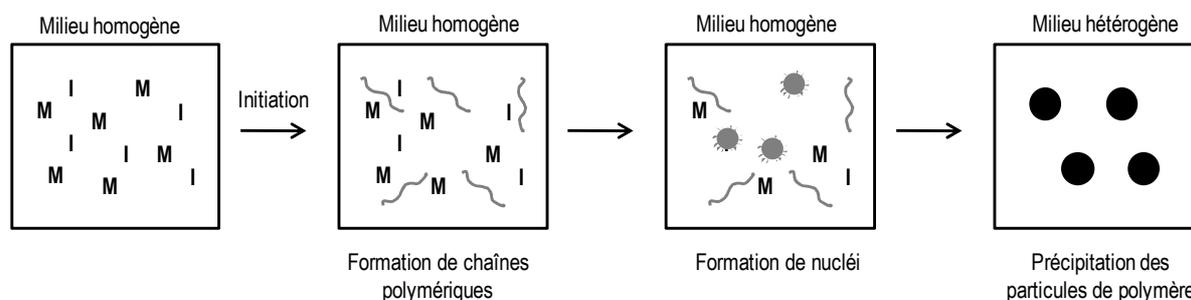


Figure IV- 4 : Principe de la synthèse de particules avec une polymérisation par précipitation (adapté de [216], M = monomère, I = agent réticulant).

La synthèse de MIP par précipitation est amorcée de la même façon qu'une polymérisation en bloc, donc avec un initiateur conventionnel activé thermiquement ou photochimiquement. La propagation se fait initialement en phase homogène et en fonction du pouvoir solvant du milieu, une séparation de phases peut avoir lieu assez rapidement, conduisant à une nucléation. Par la suite, des nucléi peuvent coaguler entre eux ou intégrer des oligomères du milieu jusqu'à atteindre une certaine taille telle que les chaînes polymériques ainsi formées ne soient plus solubles dans le solvant de synthèse entraînant ainsi leur précipitation. Lorsque les polymères produits ne sont pas réticulés ou que leur taux de réticulation est faible, les particules formées tendent à gonfler. Dans ces conditions, les particules sont instables et coagulent, il est donc nécessaire d'ajouter des agents stabilisants pour les stabiliser stériquement [216]. Dans le cas des MIP, la réticulation des polymères est tellement grande que le gonflement des particules est quasi inexistant, donc la polymérisation se fait uniquement par un mécanisme de précipitation sans avoir besoin d'ajouter des agents stabilisants puisque les particules formées sont stabilisées par la réticulation [209]. Plusieurs paramètres gouvernant la synthèse, tels que la nature du solvant, l'agitation, la nature et la quantité d'agent réticulant, entre autres, sont critiques pour l'obtention de particules sphériques avec une taille et une dispersion de taille contrôlées, ces tailles pouvant être comprises entre 0,1 μm et 10 μm de diamètre [208]. Le solvant, en particulier, a un rôle très important dans le mode de synthèse puisqu'il doit stabiliser le complexe molécule empreinte/monomère fonctionnel, il doit aussi solubiliser tous les réactifs, et en même temps être un mauvais solvant pour le polymère résultant afin qu'il puisse précipiter [216]. Les solvants utilisés pour la synthèse de MIP par une approche non-covalente (MeCN,

chloroforme, dichlorométhane, toluène) peuvent être utilisés pour la précipitation de particules réticulées basées sur des polyacrylates [233].

- Applications

La première synthèse de MIP par précipitation a été réalisée par Ye et al. [234] pour former des particules de MIP imprimé à la théophylline et aussi des MIP imprimés au 17b-estradiol. Dans les deux cas, du MAA et du TRIM ont été utilisés respectivement comme monomère fonctionnel et agent réticulant, dans du MeCN. Des nanoparticules de taille homogène (0,3 μm de diamètre pour le MIP 17b-estradiol et 0,2 μm pour la théophylline) ont été obtenues et la sélectivité des deux MIP a été évaluée par des tests d'adsorption comparatifs entre le NIP et le MIP. Dans ces conditions, les deux MIP ont présenté une bonne sélectivité par rapport aux NIP. Depuis, un grand nombre de MIP ont été synthétisés par précipitation, quelques exemples sont présentés dans le Tableau IV- 2.

La polymérisation par précipitation a donc été utilisée pour la synthèse de MIP pour un grand nombre de molécules. Les porogènes utilisés pour ces synthèses sont principalement du MeCN, du toluène ou des mélanges de ces deux solvants. Le solvant utilisé doit non seulement permettre la formation de pores dans le MIP, mais il doit aussi être un mauvais solvant pour le polymère formé pour que la précipitation de particules sphériques puisse avoir lieu. Pour savoir si un solvant est précipitant ou non-précipitant, il est possible de se reporter aux paramètres de solubilité δ du solvant et du polymère formé, un bon solvant ayant un paramètre de solubilité proche de celui du polymère formé, et donc permettant de solvater fortement le polymère résultant [235]. L'estimation du paramètre de solubilité δ pour les MIP est difficile, mais considérant l'important degré de réticulation des MIP, il est assez proche du δ du polymère formé par le monomère prédominant du mélange, donc par l'agent réticulant. Vu le nombre de publications utilisant du MeCN ou du toluène pour la synthèse de MIP par précipitation, on en peut en déduire que ces deux solvants sont de mauvais solvants pour les polyméthacrylates ou les polymères à base de DVB. En ce qui concerne les volumes utilisés, ils semblent être liés aux quantités de monomère fonctionnel et d'agent réticulant, mais il n'y a pas vraiment d'approche générale. Il semblerait tout de même que de plus gros volumes soient nécessaires lors de l'utilisation de TRIM, probablement parce que la réticulation est plus importante avec cet agent réticulant et donc la solubilité du polymère résultant est probablement réduite. D'ailleurs, les agents réticulants utilisés sont la plupart du temps l'EGDMA, le DVB et le TRIM.

Chapitre IV : Miniaturisation des polymères à empreintes moléculaires

Molécule cible (MC)	Monomère fonctionnel (MF)	Agent Réticulant (AR)	Ratio molaire MC/MF/AR	Porogène (P)	Volume P/MC (mL / mmol)	Polymérisation	Taille (µm)	Sélectivité / Application	Agitation	Source
Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique	4-VP	TRIM	1/0,2/0,2	MeOH:H ₂ O 4:1	4	60°C (16h)	?	Equilibres d'adsorption en tampon phosphate (MIP > NIP) / ELISA en milieu aqueux tamponé	non	[236]
Acide L-chloromandélique	Acrylamide	BDDA	1/5/10	MeCN	100	70°C (24h)	< 1	Equilibres d'adsorption en MeCN (MIP > NIP)	non	[237]
Acide trans-aconitique	MAA	TRIM	1/3/4	MeCN	100	60°C (24h)	0,6-0,8	Equilibres d'adsorption en MeCN (MIP > NIP) / Etude morphologique	non	[238]
S-atenolol	MAA	DVB	1/8/40	MeCN ou toluène	?	60°C (12h)	1,5	Equilibres d'adsorption en MeCN 0,5% CH ₃ COOH (MIP > NIP) / quantification par spectroscopie Raman	non	[239]
		EGDMA					0,2			
Benzyl butyl phtalate	MAA	EGDMA	1/4/20	MeCN	75	60°C (24h)	2	IF = 2 (HPLC MeOH/eau 80/20 v/v)	non	[240]
Bisphenol A	4-VP	EGDMA	1/12/24	huile minérale toluène 2:3	10	UV, 4°C (24h)	1-3	IF = 1,2 (HPLC MeCN)	agitation	[241]
	4-VP	TRIM	1/1/2	MeCN	42	65°C (24h)	< 1	IF = 6,53 (HPLC, MeOH)	rotation avec rotor (50rpm)	[242]
Bupivacaine	MAA	EGDMA	1/20/23,7	n-heptane butan-2-one	50	T _{amb} à 60°C (1h) 60°C (48h)	1,3	IF = 1,4 (HPLC MeCN/tampon phosphate 70/30 v/v)	?	[243]
Caféine	MAA	TRIM	1/7/3	MeCN	78	60°C (16h)	?	Equilibres d'adsorption en MeCN (MIP > NIP)	non	[244]
Carbamazepine	MAA	DVB	1/6/20	MeCN:toluène 3:1 v/v	78	T _{amb} à 60°C (2h) 60°C (24h)	9,5	IF = 3,3 (HPLC MeCN) / SPE échantillons urinaires	Agitation longitudinale	[245]
		EGDMA DVB-80	1/9/26	MeCN:toluène 90/10 v/v	158		6,4			
Cetirizine	MAA	EGDMA	1/4,6/19,3	H ₂ O:MeCN 1:19	202	60°C (20h)	?	Réponse potentiométrique MIP>NIP de capteurs utilisés dans l'urine et le sérum	agitation magnétique	[246]
Chlorure de tributyltine	NaMA	EGDMA	1/4/22	MeCN	54	65°C (24h)	0,2-0,4	SPE (95% MIP 40%NIP) en eau pure	non	[247]
Ciprofloxacine	MAA	EGDMA	1/8/20	MeOH	13	T _{amb} à 60°C (2h) 60°C (24h)	?	SPE (80% MIP et 30% NIP) sur extraits de sols	Agitation longitudinale (24rpm)	[248]
Daminozide	MAA	EGDMA	1/4/20	MeOH	60	60°C (12h)	0,2	Fréquence d'oscillation du MIP>NIP de capteurs utilisés pour des extraits de pomme	non	[249]
Dansyl-L-phenylalanine	MAA 4VP	EGDMA	1/16/40	MeCN	160	50°C (1 nuit)	0,7	Equilibres d'adsorption en MeCN (MIP > NIP)	non	[250]
Di(2-ethylhexyl)phtalate	MAA	EGDMA	1/4/20	MeCN	75	60°C (24h)	3-3,5	IF = 8,02 (HPLC MeCN/eau 60/40 v/v)	non	[240]
		TRIM	1/4/16				2-2,5			
							cyclohexane			
Dibutyl phtalate	MAA	EGDMA	1/4/20	MeCN	75	60°C (24h)	2	IF = 2,5 (HPLC MeCN/eau 60/40 v/v)	non	[240]
Dipyridamole	MAA	TRIM	1/3,2/1,6	MeCN	40	50°C (24h)	0,7	Equilibres d'adsorption en MeCN (MIP > NIP) / Bioessais dans l'urine	non	[251]

Chapitre IV : Miniaturisation des polymères à empreintes moléculaires

(+)-Ephedrine	MAA	TRIM	1/4/12	MeCN	17	60°C (24h)	0,1-0,2	Phase pseudo-stationnaire en CE en milieu aqueux tamponé (temps de rétention MIP>NIP)	rotation horizontale (40rpm)	[252]
Erythromycine	MAA	EGDMA	1/4/20	chloroforme	50	60°C (1 nuit)	0,1-1	Réponse du MIP > NIP de capteurs en eau pure	non	[253]
Estradiol	4-VP	EGDMA	1/12/24	huile minérale toluène 2:3	10	UV, 4°C (24h)	1-4	IF = 4,22 (HPLC MeCN)	agitation	[241]
17b-estradiol	MAA	TRIM	1/4/2	MeCN	55	UV, 20°C (24h)	0,3	Equilibres d'adsorption en MeCN (MIP > NIP)	non	[234]
	MAA	TRIM	1/5/2	MeCN	57	UV, 20°C (1 nuit)	0,3	Equilibres d'adsorption en MeCN (MIP > NIP) / capteur en milieu MeCN	non agitation magnétique	[254]
	MAA	EGDMA	1/8/6,7	acétone:MeCN 1:3 v:v	40	60°C (24h)	0,4	IF = 1,31 (HPLC MeCN)	agitation magnétique	[255]
	MAA	EGDMA TRIM	1/1/5	MeCN	54	UV, 20°C (16h)	0,2	Equilibres d'adsorption en MeCN (MIP > NIP)	non	[244]
	TFMAA	TRIM	1/8/8	MeCN	120	60°C (24h)	?	IF = 1,21 (HPLC MeCN 1% CH ₃ COOH) / SPE lait en poudre	non	[256]
						UV, 0-8°C (24h)		IF = 1,93 (HPLC MeCN 1% CH ₃ COOH) / SPE lait en poudre		
	1/4/4	60	IF = 3,19 (HPLC MeCN 1% CH ₃ COOH) / SPE lait en poudre							
MAA	TRIM	1/4/2	MeCN	55	UV (16h)	0,3	Equilibres d'adsorption en MeCN (MIP > NIP)	non	[233]	
Fenuron	MAA	EGDMA	1/4/20	toluène	12	60°C (24h)	1	SPE 99 % MIP 0 % NIP / SPE légumes	non	[257]
Hydroquinone	MAA	TRIM	1/8/10	toluène:MeCN 1:1	?	T _{amb} à 70°C (2h) 70°C (24h)	0,7	Equilibres d'adsorption en MeCN (MIP > NIP) / Capteurs en tampon phosphate salin	non	[258]
Hydroxyzine	MAA	EGDMA	1/5/19	MeCN	202	60°C (20h)	n.m.	Réponse potentiométrique MIP>NIP de capteurs utilisés dans l'urine et sérum	non	[259]
Isoproturon	MAA	EGDMA	1/4/20	toluène	20	67°C (24h)	nano	Equilibres d'adsorption en toluène (MIP>NIP) / SPE de maïs (rendements non mentionnés)	non	[260]
	TFMAA									
	MAA	EGDMA	1/4/20	toluène	63	60°C (10h)	?	SPE (99 % MIP et 23 % NIP) en toluène, application en parallèle avec Oasis HLB pour l'analyse d'eau de rivière	agitation (350rpm)	[261]
Linuron	MAA	EGDMA	1/4/20	toluène	20	67°C (24h)	nano	Equilibres d'adsorption en toluène (MIP>NIP) / SPE de maïs (rendements non mentionnés)	non	[260]
	TFMAA									
Malachite verte	MAA	EGDMA	1/4/20	MeCN	60	60°C (12h)	0,3	Equilibres d'adsorption en MeCN (MIP > NIP)	non	[262]
Méthylebensulfuron	MAA	TRIM	1/4/4	dichlorométhane	50	60°C (24h)	2-4	IF = 3,68 (HPLC MeCN: MeOH 8:2) / SPE sur extraits de soja en MeCN (rendements non mentionnés)	non	[263]
Morphine	MAA	TRIM	1/70/70	MeCN	696	60°C (9h)	0,5	Equilibres d'adsorption en MeOH/eau 50/50 v/v	non	[264]

Chapitre IV : Miniaturisation des polymères à empreintes moléculaires

								(MIP > NIP) / Capteurs en eau		
NiCl ₂	DEM	DVB 80	?	MeCN:toluène 3:1 v/v	?	T _{amb} à 60°C (2h) 60°C (24h)	?	SPE eau de mer (rendements non mentionnés)	Agitation longitudinale (33rpm)	[265]
S-nicotine	MAA	DVB 97,5	1/4/19,2	MeCN:toluène 3:1 v/v	85	25°C à 60°C (2h) 60°C (48h)	3,5	IF = 15 (HPLC MeCN/tampon phosphate 50/50 v/v) / trappe à S-nicotine de la fumée de cigarette	rotation horizontale (16rpm)	[266]
R,S-propranolol	MAA	EGDMA	1/1/5	toluène	54	UV (22h)	0,7	Equilibres d'adsorption en toluène (MIP > NIP)	non	[267]
		DVB 55 / TRIM	1/2,5/10	MeCN	75	20°C à 60°C (20min) 60°C (24h)	2,4	Equilibres d'adsorption en tampon citrate/MeCN 50/50 v/v(MIP > NIP)	rotation horizontale (20rpm)	[268]
									non	
									rotation horizontale (20rpm)	
									non	
	TRIM	1/2,5/3,8	60°C (24h)	0,1-0,3	non					
MAA	DVB	1/4/19	toluène:MeCN 82,5/17,5% (v/v)	85	60°C (24h)	3,6	Equilibres d'adsorption en chloroforme (MIP>NIP), ajout du MIP au solvant organique pour améliorer l'extraction en LLE	rotation (7,5rpm)	[269]	
S-propranolol	MAA	TRIM	1/8/8	MeCN	12	UV, -26°C (1 nuit)	0,2-0,5	Séparation avec le MIP d'énantiomères par CE, le NIP ne les sépare pas	non	[270]
	HMDPA / MAA	DVB	1/2/8	MeCN	76	60°C (24h)	0,6-2	Equilibres d'adsorption en tampon citrate/MeCN 50/50 v/v(MIP > NIP)	non	[271]
	MAA	EGDMA	1/6/18	MeCN	110	UV, -26°C (18h)	< 1	Séparation avec le MIP d'énantiomères par CE, le NIP ne les sépare	non	[272]
	MAA	EGDMA	1/8/40	MeCN ou toluène	?	60°C (12h)	0,2	Equilibres d'adsorption en MeCN 0,5% CH ₃ COOH (MIP > NIP) / quantification par spectroscopie Raman	non	[239]
DVB		1,5								
Propazine	MAA	EGDMA	1/4/20	toluène	12	60°C (24h)	1	Equilibres d'adsorption en toluène (MIP>NIP)	non	[273]
	MAA	EGDMA	1/4/20	toluène	30	60°C (10h)	?	SPE (51 % MIP et n.m.) NIP eau de rivière	agitation (350rpm)	[274]
	MAA	EGDMA	1/4/20	toluène	30	60°C (10h)	?	SPE (83% MIP et 0% NIP) en toluène, et en eau (MIP>50% et NIP<20%)	agitation (350rpm)	[275]
	MAA	EGDMA	1/4/20	toluène	12	60°C (24h)	?	SPE (92% MIP et 0% NIP) en toluène et pour divers extraits organiques de végétaux	non	[276]
Sulfasalazine	MAA	EGDMA	1/52/70	MeCN/toluène 85/25 v/v	478	T _{amb} à 60°C (2h) 60°C (24h)	4	Libération tardive de médicaments mieux contrôlée pour le MIP que pour le NIP	agitation (40rpm)	[277]
Tebuconazole	4-VP	TRIM	1/6/12	huile minérale toluène 2:3	250	65°C (24h)	?	IF=1,74 (HPLC MeCN)	rotation avec rotor (50rpm)	[241]
		EGDMA	1/12/24						agitation	
	4-VP :MAA 1:1	TRIM	1/3/6	MeCN	34	65°C (24h)	?	IF=3,72 (HPLC MeCN:eau 3:7) / SPE sur	rotation avec	[278]

Chapitre IV : Miniaturisation des polymères à empreintes moléculaires

								diverses matrices environnementales	rotor (50rpm)		
Tetracycline	MAA	TRIM	1/8/15	MeCN/MeOH 54/46%(v/v)	87	55°C (24h)	< 1	IF = 2,075 (HPLC MeOH) / SPE pour l'extraction dans des œufs (rendements non mentionnés)	non	[279]	
Theophylline	MAA	DVB 80	1/4/19,2	MeCN/toluène 75/25 v/v	83	T _{amb} à 60°C (2h) 60°C (24h)	5	Séparation en HPLC en MeCN, pas de comparaison effectuée avec le NIP	rotation avec rotor (5-10rpm)	[280]	
	MAA	TRIM	1/6/3	MeCN	78	60°C (24h)	0,2	Equilibres d'adsorption en MeCN (MIP > NIP)	non	[234]	
	MAA	TRIM	1/7/3	MeCN	78	60°C (1 nuit)	0,3	Equilibres d'adsorption en MeCN (MIP > NIP) / capteur en milieu MeCN	non	[254]	
			1/7/7		160	UV, 20°C (1 nuit)					
	MAA / NPA	1/12/6	200		UV, 20°C (4h)						
	MAA	EGDMA	1/4/14		MeCN	157					60°C (16h)
			1/11/11	157							
		TRIM	1/7/7	157		UV, 20°C (16h)					
			1/10/6	157							
			1/12/6	157							
		1/7/3	78	60°C (16h)							
MAA	TRIM	1/7/3	MeCN	78,3	60°C (16h)	?	Equilibres d'adsorption en MeCN (MIP > NIP) / ELISA en milieu aqueux	non	[233]		
Thiabendazole	MAA	DVB 80	1/4/20	MeCN:toluène 3:1 v/v	74	T _{amb} à 60°C (2h) 60°C (24h)	3,5	IF = 4,1 (HPLC MeOH)	Agitation longitudinale (24rpm)	[281]	
2,4,6-trichlorophenol	MAA	DVB	1/8/40	MeCN:toluène 3:1 v/v	70	60°C (24h)	0,2-0,3	Equilibres d'adsorption en eau (MIP > NIP) / SPME pour eau environnementale	non	[282]	
	4-VP	DVB	1/4/20	MeCN:toluène 3:1 v/v	60	60°C (24h)	3	Equilibres d'adsorption (MIP>NIP) milieu d'étude non mentionné	non	[283]	
				MeCN			5				
	MAA				MeCN:toluène 3:1 v/v		60				3
					1/8/40						5
			1/4/20	toluène	< 1						
		EGDMA	1/4/20	MeCN:toluène 3:1 v/v	60		< 1				
				toluène			50°C (24h)				< 1
							60°C (24h)				< 1
		TRIM		MeCN:toluène 3:1 v/v			70°C (24h)				< 1
					60°C (24h)		< 1				
Triptophane (BOC-L)	MAA	EGDMA	1/4/20	MeCN	?	60°C (16h)	0,8-2	Equilibres d'adsorption en MeCN (MIP>NIP)	non	[284]	

Tableau IV- 2 : Exemples de MIP synthétisés avec une polymérisation par précipitation (4-VP : 4-vinylpyridine, DEM : 2-(diéthylamino)éthyl méthacrylate, HMDPA : acrylate de 4-(hydroxyméthyl)-2,5-diphényloxazole, NPA : acrylate de 4-nitrophényle, BDDA : 1,4-butanedioldiacrylate).

Dans le Tableau IV- 2, on observe que la polymérisation par précipitation permet de produire des particules sphériques de MIP ayant des tailles de particule allant de 0,1 μm jusqu'à environ 10 μm de diamètre, mais dans la plupart des cas ce sont des nanoparticules qui sont obtenues. Considérant que dans le cadre de ce travail, il serait souhaitable de synthétiser des particules avec des tailles proches de 5 μm , les synthèses conduisant à des particules de ces dimensions ont été observées plus en détail. Dans 50 % des cas, c'est le DVB qui a été utilisé comme agent réticulant, il semblerait donc que cet agent réticulant soit particulièrement adapté pour obtenir des particules de tailles supérieures à 1 μm de diamètre. Les solvants utilisés sont alors toujours du MeCN et/ou du toluène. En ce qui concerne les synthèses avec du TRIM ou de l'EGDMA conduisant à la formation de microparticules, la tendance n'est pas très claire puisque divers solvants ont été testés et les ratios molaires des réactifs sont très variables. Il est donc difficile de dire quelles sont les conditions les plus favorables pour la synthèse de microparticules de MIP. Il est important de noter que dans un certain nombre de cas, les travaux de recherche se sont focalisés sur les conditions de synthèse pour mieux contrôler la morphologie des particules et pour obtenir une meilleure sélectivité. Cependant, malgré ces efforts pour l'obtention d'un protocole plus général de synthèse par précipitation, il n'existe pas aujourd'hui de méthode adaptable à diverses molécules empreintes car la morphologie et la sélectivité des MIP obtenus dépendent fortement de la quantité et de la nature de la molécule empreinte.

La mise en œuvre de cette méthode est assez simple et ne requiert pas d'ajout d'agents stabilisants qui pourraient contaminer la surface du polymère résultant [285]. De plus, des rendements de polymérisation élevés (> 85 %) sont obtenus par rapport à la polymérisation en bloc ($\approx 50\%$), bien que le rendement dépende aussi du type d'agent réticulant utilisé [260, 268]. De plus, dans la plupart des exemples présentés, une évaluation de la sélectivité du MIP par rapport au NIP a été effectuée. Le test le plus couramment utilisé avec les particules de MIP a été le test d'adsorption dans le solvant de synthèse car il est simple et rapide à effectuer. Il s'agit en effet de comparer la fixation de la molécule empreinte entre le NIP et le MIP. Diverses applications sont possibles pour les MIP synthétisés par précipitation. Dans les exemples cités dans le tableau, les MIP sphériques ont été utilisés en SPE, en séparation soit par HPLC soit par CE, pour la mise en place de bioessais, ou encore pour la préparation de capteurs.

Malgré la diversité d'applications des MIP synthétisés par précipitation, et la simplicité de sa mise en œuvre, dans plusieurs études il a été observé que la taille des particules de MIP synthétisés par précipitation dépend de la quantité et de la nature de la molécule empreinte [238, 240, 268, 269, 277, 280].

IV.1.1.4 Conclusions

L'objectif de cette étude étant d'intégrer des particules de MIP dans un système miniaturisé tel que la puce présentée dans le chapitre II, des contraintes particulières à ce format doivent être prises en compte. D'une part, les canaux de la puce ont des dimensions de 75 μm , donc les particules doivent avoir une taille qui ne soit pas trop grande pour pouvoir avoir une bonne compatibilité avec ces dimensions. Les particules ne doivent pas non plus être trop petites pour pouvoir être retenues par les restrictions de la puce et ne pas générer trop de contre-pression. Des tailles comprises entre 5 μm et 10 μm devraient pouvoir servir à ce remplissage. Pour cette application, la synthèse par suspension est donc limitée car elle présente une grande dispersion de tailles en particulier lors de la synthèse de particules avec des tailles inférieures à 10 μm . D'autre part, dans un système miniaturisé, il faut considérer que la surface spécifique est déjà assez réduite et donc les particules ayant une couche de MIP à leur surface ne conviennent pas par leur faible capacité. Il semble donc que la méthode la mieux adaptée pour la synthèse de particules sphériques de MIP compatible avec le microsystème présenté dans le chapitre II soit la polymérisation par précipitation. Nous avons donc par la suite testé ce mode de synthèse pour la précipitation d'un MIP cocaïne.

IV.1.2 Mise au point de la synthèse de NIP par précipitation

Pour aborder la synthèse de MIP par précipitation, une première étude a consisté à réaliser la synthèse de NIP avec la morphologie souhaitée car même si la molécule empreinte peut changer la morphologie des MIP, une synthèse préliminaire de NIP permet d'économiser la molécule empreinte et de prendre en main la technique. La difficulté rencontrée pour la polymérisation par précipitation est que la morphologie des particules préparées dépend d'un grand nombre de facteurs qui concernent non seulement le type de réactifs utilisés mais aussi leurs quantités, les conditions d'agitation, de température, de temps de polymérisation et de dilution. Dans l'objectif d'étudier ces différents paramètres, un plan d'expérience a été réalisé, mais il a fallu préalablement définir les paramètres les plus importants pouvant affecter la morphologie des particules. Le protocole utilisé pour la synthèse par précipitation est décrit en annexe 7.

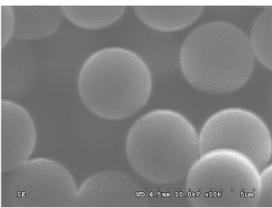
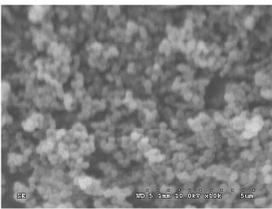
IV.1.2.1 Etude préliminaire sur l'effet de la nature de l'agent réticulant

Diverses études ont montré que la nature de l'agent réticulant utilisé pour la synthèse a une grande importance pour la taille finale des particules lors d'une polymérisation par précipitation [245, 263, 268, 283]. Un exemple de ce phénomène est observé sur le Tableau IV- 2 pour un MIP imprimé avec du R,S-propranolol [268]. En effet, des synthèses réalisées avec du TRIM et du DVB ainsi qu'avec un mélange de TRIM et DVB ont montré que les particules de plus grande taille étaient plutôt obtenues avec le DVB (2,4 μm) qu'avec le TRIM (0,3 μm), et que le mélange des deux agents réticulants aboutissait à la formation de particules de taille intermédiaire (1,8 μm). En revanche, si l'étude réalisée pour le MIP 2,4,6-trichlorophénol [283] a montré que le DVB conduit aussi à des particules plus grandes que le TRIM ou l'EGDMA, une autre étude portant sur le MIP di(2-ethylhexyl)phtalate [240] a montré que les particules obtenues avec le TRIM et l'EGDMA étaient assez proches de taille. En ce qui concerne les quantités d'agent réticulant, le Tableau IV- 2 témoigne de l'utilisation de quantités allant de 0,2 mol jusqu'à 70 mol par mol de molécule empreinte, mais la plupart des synthèses reportées dans la littérature sont effectuées avec des quantités proches de 10 mol ou 20 mol par mol de molécule empreinte. Un excès d'agent réticulant pourrait se traduire par un important degré de réticulation et donc par une précipitation plus rapide des particules. Au contraire, si la quantité d'agent réticulant est trop faible, la solubilité du polymère doit être plus grande et la précipitation pourrait ne pas avoir lieu laissant place à la formation de macro gels.

Lors de l'analyse des travaux antérieurs présentés dans le Tableau IV- 2, il avait été observé que les deux porogènes principalement utilisés pour des synthèses par précipitation sont le MeCN et le toluène. Par conséquent, le choix des porogènes s'est évidemment porté vers l'un de ces deux solvants. Considérant que dans la synthèse précédente de MIP c'est le MeCN qui avait été utilisé comme porogène, c'est ce solvant qui sera utilisé dans l'étude préliminaire.

Ainsi, une première série de synthèses de NIP a été réalisée pour étudier l'effet de l'agent réticulant sur la taille des particules obtenues. Comme pour le MIP en bloc synthétisé précédemment, pour toutes ces synthèses préliminaires de NIP par précipitation, le monomère fonctionnel utilisé est le MAA, le solvant solvant choisi est le MeCN et l'initiation a été réalisée par voie thermique à 60°C avec l'AIBN comme initiateur, et avec une durée de 24 heures sauf pour une des synthèses où la durée était de 16h. Les différents agents réticulant utilisés sont le DVB (NIP pp DVB), l'EGDMA (NIP pp EGDMA), le TRIM (NIP pp TRIM) et un mélange de DVB :EGDMA 1:1 (NIP pp (16h) DVB :EGDMA 1:1 et NIP pp DVB :EGDMA 1:1)). Le ratio monomère fonctionnel/agent réticulant a été fixé à 1/5 pour toutes les synthèses. Pour ce qui en est des quantités de solvant utilisées en précipitation, il ne semble pas y avoir une homogénéité dans les synthèses existantes ni une tendance particulière. Pour la quantité de solvant, en polymérisation en bloc, la quantité utilisée pour les synthèses des MIP étudiés dans le chapitre III était égale à 5,6 mL.mmol⁻¹ de molécule empreinte. Un essai préliminaire a donc été réalisé avec une quantité de solvant de

12 mL.mmol⁻¹ mais le polymère obtenu se trouvait sous forme de bloc très friable. La quantité a donc été fortement augmentée pour atteindre un niveau de 75 mL.mmol⁻¹. Des particules ayant été obtenues dans ces conditions, la quantité de solvant a donc été fixée à cette valeur. Il faut prendre en compte que pour cette étude, seuls des NIP ont été synthétisés, donc les niveaux des réactifs sont calculés dans l'hypothèse de l'utilisation d'une millimole de molécule cible, mais lors de la synthèse, la molécule cible n'est pas ajoutée au mélange de polymérisation. Une agitation par barreau magnétique à 400 tours.min⁻¹ a été utilisée pendant toute la durée de la réaction de polymérisation. Les résultats ainsi obtenus sont présentés sur le Tableau IV- 3. Les informations contenues dans le Tableau IV- 3 proviennent des images obtenues par microscopie électronique à balayage (MEB) après l'application d'une fine couche conductrice d'or sur les particules. L'utilisation du MEB est décrite en annexe 8.

Synthèse	Image MEB	Morphologie	Taille des particules
NIP pp DVB		Particules sphériques	3,5µm
NIP pp EGDMA		Particules sphériques	0,3 à 0,4µm
NIP pp TRIM		Particules sphériques	0,4 à 0,6µm

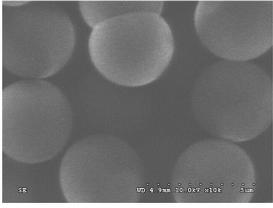
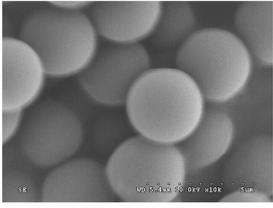
Synthèse	Image MEB	Morphologie	Taille des particules
NIP pp DVB:EGDMA 1:1		Particules sphériques et agglomérées	3,8µm
NIP pp (16h) DVB:EGDMA 1:1		Particules sphériques	3,6µm

Tableau IV- 3 : Morphologie des particules de NIP obtenues après 16 ou 24 heures par précipitation en fonction de l'agent réticulant utilisé et du temps de polymérisation.

Il apparaît que dans toutes les conditions testées, des particules sphériques ont été obtenues, ce qui confirme que le niveau de dilution est suffisant pour obtenir une polymérisation par précipitation au lieu d'une polymérisation en bloc. Cette première série de synthèses confirme la tendance observée antérieurement dans la littérature où le DVB permet de former des particules de plus grande taille que le TRIM ou l'EGDMA. Considérant une possible intégration des particules dans les canaux de la puce étudiée dans le chapitre II, leur taille doit se trouver entre 3 µm et 10 µm. Ces tailles n'ont pas pu être atteintes ni avec du TRIM, ni avec de l'EGDMA. Il semblerait donc que l'utilisation du DVB soit nécessaire pour cette

synthèse. Il reste cependant un grand nombre de paramètres qui peuvent avoir une influence sur la solubilité des polymères formés, et donc qui peuvent conduire à un changement de la taille des particules de NIP obtenues. Un plan d'expérience a donc été utilisé pour poursuivre cette étude.

IV.1.2.2 Etude de l'effet de différents paramètres de synthèse pour l'obtention de particules de NIP

- Choix de la nature et de la quantité d'agent réticulant

L'étude précédente a montré que la nature de l'agent réticulant avait une grande influence sur la taille des particules formées en polymérisation par précipitation, et qu'il était nécessaire d'ajouter du DVB à la synthèse pour que les tailles soient supérieures au micromètre. Cependant, dans le chapitre précédent, il a été observé que la rétention est aussi influencée par le type d'agent réticulant utilisé. En effet, l'EGDMA s'est avéré être l'agent réticulant permettant d'obtenir la plus grande sélectivité lors des études de rétention sur le MIP en bloc, tandis que la rétention et la sélectivité du MIP DVB étaient très faibles. Tenant compte de ces deux observations, il est apparu judicieux d'inclure les deux agents réticulants, le DVB et l'EGDMA, dans la synthèse des particules de NIP. Un mélange de DVB et d'EGDMA en deux proportions différentes, 50/50 et 25/75 % v/v, va donc être testé pour évaluer l'effet de ce paramètre sur la taille des particules. En ce qui concerne la quantité d'agent réticulant, et de monomère fonctionnel, il semblerait que si cette quantité est trop grande, les particules peuvent coaguler [238, 255], mais si elle est trop faible, la solubilité du polymère résultant peut être affectée. Pour confirmer ces hypothèses, deux niveaux de concentration d'agent réticulant et de monomère fonctionnel ont été testés, à savoir l'équivalent de 8 mol.mol⁻¹ et 20 mmol.mmol⁻¹ de molécule cible pour l'agent réticulant, et 4 mmol.mmol⁻¹ et 8 mmol.mmol⁻¹ de molécule cible pour le monomère fonctionnel. Comme dans la partie précédente, la molécule cible n'est pas ajoutée au mélange de réaction, elle sert juste de référence pour le calcul des concentrations et donc des quantités à utiliser des différents réactifs.

- Choix de la nature et du volume de solvant

Le volume de solvant a aussi une grande importance sur la morphologie du polymère final. D'ailleurs, dans la partie précédente, il a été observé qu'un volume trop faible de solvant empêchait la précipitation d'avoir lieu en conduisant à la formation d'un bloc de polymère. Considérant les travaux présentés sur le Tableau IV- 2, la moyenne du volume utilisé pour les synthèses de MIP est de 87 mL.mmol⁻¹ de molécule cible, et la médiane se trouve environ à

60 mL.mmol⁻¹. Nous avons donc choisi de tester des niveaux de volume de solvant de 60 mL.mmol⁻¹ et 85 mL.mmol⁻¹. Il faut toutefois considérer que ce paramètre est aussi très lié à la quantité d'agent réticulant et de monomère fonctionnel utilisée, ainsi qu'à la nature du solvant utilisé. Pour les synthèses antérieures, seul le MeCN avait été testé comme solvant. Pourtant, il a été observé dans l'étude de MIP 2,4,6-trichlorophénol [283] que, dans des conditions similaires, le MeCN pur avait conduit à des particules de 5 µm, tandis que l'utilisation d'un mélange MeCN:toluène 3:1 v:v avait conduit à des particules de 3 µm. Il semble donc judicieux de tester non seulement le volume de solvant mais aussi la nature de celui-ci. Les deux solvants les plus couramment utilisés en synthèse par précipitation étant le toluène et le MeCN, ces deux solvants ont été testés, il s'agit du MeCN pur et d'un mélange MeCN/toluène 75/25 v/v.

- Autres paramètres de synthèse

Enfin, d'autres paramètres de polymérisation semblent avoir un certain effet sur la morphologie des particules obtenues. Tout d'abord, lors d'une polymérisation initiée thermiquement, il semblerait que la taille des particules augmente lorsque la température augmente [237, 255, 283]. Cette hypothèse est basée sur le principe de la polymérisation par précipitation qui dit que la morphologie des particules résultantes dépend principalement des solubilités du mélange initial et du polymère résultant dans le solvant de synthèse. Or, les constantes de solubilité dépendent de la température, donc ce paramètre devrait avoir une influence sur la taille et la forme des particules. Deux températures seront donc testées, 60°C et 70°C. Des températures plus basses pourraient ralentir la réaction sachant que l'initiateur utilisé est l'AIBN, mais des températures plus élevées pourraient affecter la reconnaissance lors de la synthèse du MIP par l'affaiblissement du complexe molécule empreinte/monomère fonctionnel (voir chapitre précédent partie III.1.3). La durée de la polymérisation a été fixée à 24 heures. La quantité d'initiateur dans la réaction doit aussi avoir une influence sur la taille des particules. En effet, l'augmentation de la quantité d'initiateur augmente la vitesse de formation de radicaux ainsi que la vitesse de terminaison des chaînes conduisant donc à des chaînes de polymère plus courtes et plus solubles dans le milieu de polymérisation. Ces chaînes s'additionnent pour atteindre, au bout d'un certain temps, la limite de solubilité et précipiter. Cependant, si les chaînes de polymère sont plus solubles dans le milieu de polymérisation, alors les particules formées mettront plus de temps à précipiter et seront donc de plus grandes tailles. Ainsi, deux niveaux de concentration d'initiateur vont être étudiés, 0,25 mmol.mmol⁻¹ et 1,3 mmol.mmol⁻¹ de molécule cible. Finalement, un dernier paramètre qui pourrait avoir une influence sur la morphologie des particules formées par polymérisation par précipitation, mais qui est plus rarement mentionné avec précision dans la littérature, est l'agitation. En effet, une bonne agitation permet d'avoir une meilleure répartition des réactifs dans la solution de synthèse et diminue le risque d'avoir des gradients de température dans le réacteur, elle doit donc faciliter l'obtention de particules de tailles monodisperses [268].

L'agitation se fait avec un barreau aimanté et un agitateur magnétique dont la vitesse de rotation peut être fixée. Deux vitesses seront testées, 400 tours min⁻¹ et 800 tours.min⁻¹. Dans le Tableau IV- 4 se trouve un résumé des différentes conditions de synthèse à tester pour la synthèse de NIP par précipitation.

Paramètre	Niveau -1	Niveau 1
A - Ratio agents réticulants (EGDMA / DVB)	50/50	75/25
B - Type de solvant (MeCN / toluène)	100/0	75/25
C - Volume de solvant	60 mL	85 mL
D - Température de polymérisation	60°C	70°C
E - Vitesse d'agitation	400 min ⁻¹	800 min ⁻¹
F - Quantité de MAA par rapport à 1mmol de molécule empreinte	4 mmol	8 mmol
G - Quantité d'agent réticulant par rapport à 1mmol de molécule empreinte	8 mmol	20 mmol
H - Quantité d'initiateur par rapport à 1mmol de molécule empreinte	0,24 mmol	1,3 mmol

Tableau IV- 4 : Conditions de synthèse à tester pour la synthèse de NIP par polymérisation par précipitation.

- Mise en œuvre d'un plan d'expériences

Pour évaluer l'effet de tous ces paramètres sur la taille et la dispersion des particules, il est possible de développer un plan d'expériences. Considérant le grand nombre de paramètres à tester, il est impossible de réaliser un plan factoriel saturé puisque le nombre d'essais serait trop grand ($2^8 = 256$). Le choix s'est donc porté sur un plan factoriel fractionné de Plackett-Burman à 12 essais, 8 facteurs et 3 degrés de liberté. Le Tableau IV- 5 présente le plan utilisé ainsi que les résultats obtenus en termes de taille des particules (moyenne observée sur image MEB) et de rendement de la polymérisation. Le rendement de polymérisation (RP) en pourcentage a été obtenu avec la formule suivante :

$$RP = m_{NIP} \times 100 / (m_{AR} + m_{MF})$$

où m_{NIP} est la masse obtenue de NIP, m_{AR} est la masse utilisée d'agents réticulants et m_{MF} est la masse utilisée de monomère fonctionnel.

Les significativités de chaque paramètre sur la taille des particules, ainsi que sur le rendement, ont été déterminées par l'application d'un test t (de Student). La valeur observée pour la fonction discriminante du test t (t_{obs}) d'un facteur X s'obtient avec l'équation suivante :

$$t_{obs(X)} = E_{obs(X)} / \hat{\sigma}$$

où $E_{obs(X)}$ est l'effet observé pour le paramètre X et $\hat{\sigma}$ est l'estimateur de la variance.

Essai	Facteurs											Réponse	
	A	B	C	D	E	F	G	H	d1	d2	d3	Diamètre (µm)	Rendement (% m/m)
1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	0,6	100
2	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	0,15	80
3	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	2	101
4	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	0,3	109
5	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	0,8 à 2,5	95
6	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	3,4	104
7	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	0,6 à 10	108
8	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	0,6 à 0,9	98
9	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	0,58	168
10	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	0,4	96
11	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	0,8 à 1,3	94
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	2,8	66

Tableau IV- 5 : Plan d'expériences de Plackett-Burnman pour 12 essais avec 8 facteurs à 2 niveaux et avec 3 degrés de liberté et résultats obtenus pour la taille des particules et le rendement. Facteurs décrits en Tableau IV- 4.

L'effet observé $E_{obs(X)}$ et l'estimateur de la variance $\hat{\sigma}$ sont définis par les équations suivantes :

$$E_{obs(X)} = (1/n) \sum [y_{(i)}]$$

$$\hat{\sigma} = \sqrt{(\sum [E^2_{obs(d_j)}] / n_d)}$$

où n est le nombre d'essais, $y_{(i)}$ est la réponse obtenue pour chaque essai i pondérée par le niveau + 1 ou - 1, $E_{obs(d_j)}$ est l'effet observé pour chaque facteur fictif d_j , et n_d est le nombre de facteurs fictifs (ici il y en a trois, d_1 , d_2 et d_3). Le développement du $E_{obs(A)}$, donc de l'effet observé pour le facteur A, est présenté dans l'équation suivante :

$$E_{obs(A)} = 1/12 [y_1 - y_2 + y_3 - y_4 - y_5 - y_6 + y_7 + y_8 + y_9 - y_{10} + y_{11} - y_{12}]$$

Ainsi, un facteur X est non significatif (pour une réponse y donnée) si la valeur du $t_{obs(X)}$ se trouve à l'intérieur de l'intervalle $[-t_\alpha ; t_\alpha]$ où t_α est le t de Student avec une erreur α et n degrés de liberté. Dans le cas présent le nombre de degrés de liberté est égal à 3 et nous avons pris une erreur α de 0,05, donc, d'après les valeurs tabulées de la fonction de Student, $t_\alpha = 3,182$, donc $t_{obs(X)}$ est significatif s'il n'appartient pas à l'intervalle $[-3,182 ; 3,182]$.

- Résultats du plan d'expériences

Dans le Tableau IV- 6 sont présentés les résultats du test t de Student appliqué à chaque facteur et pour chaque paramètre de réponse étudié, ainsi que les significativités correspondantes.

		Facteurs							
		A	B	C	D	E	F	G	H
Diamètre (μm)	t_{obs}	0,401	-3,378	-1,882	-0,882	-0,249	-0,477	1,161	0,462
	Significativité	NS	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Rendement (% m/m)	t_{obs}	1,128	0,803	0,463	-0,116	-0,440	-0,607	1,168	-0,047
	Significativité	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Tableau IV- 6 : Effets observés et significativités obtenus pour le plan d'expérience de Plackett-Burman décrit dans les Tableau IV- 4 et Tableau IV- 5.

Parmi les facteurs testés, seule la nature du solvant (facteur B) a un impact significatif sur la taille des particules. Effectivement, toutes les synthèses ayant été effectuées dans un solvant composé de 25 % de toluène et 75 % de MeCN ont conduit à des particules présentant des diamètres inférieurs à 1 μm . Ce résultat est en accord avec des données reportées dans la littérature où l'ajout de toluène au MeCN, lors d'une synthèse par précipitation, a pour effet de réduire la taille des particules [283]. Ce qui est assez surprenant dans les résultats obtenus pour le plan d'expériences, c'est que la nature de l'agent réticulant n'a pas un effet significatif sur la taille des particules. Cependant, dans la partie précédente, ce facteur avait une influence capitale pour la taille des particules résultantes. Il se pourrait alors que les niveaux 1 et -1 n'aient pas été définis correctement et donc que l'impact de ce facteur ne soit pas visible dans ces conditions. Une deuxième hypothèse serait que lors de l'ajout de ces deux agents réticulants, la polymérisation avec le DVB soit favorisée par une cinétique plus rapide que celle avec l'EGDMA, et donc le polymère formé pourrait être principalement constitué de DVB. Pour le reste des facteurs qui peuvent avoir une influence sur la taille des particules, il est possible que leur effet soit caché puisque ce type de plan d'expériences ne tient pas compte des interactions de certains paramètres. En effet, plusieurs facteurs semblent liés en ce qui concerne la taille des particules, en particulier la nature et les quantités d'agents réticulants, de solvant et de monomère fonctionnel. Par exemple, pour le volume de solvant, si on considère uniquement les synthèses où le solvant est le MeCN (facteur B = -1), il semblerait que lors de l'utilisation d'une plus grande quantité de solvant (facteur C = +1), les particules soient plus petites. Dans la partie suivante, l'effet de la quantité de solvant sera donc étudiée. En ce qui concerne le rendement de la synthèse, exprimé en milligrammes de polymère par milligramme de monomères (monomère fonctionnel et agents réticulants), aucun des paramètres présentés ci-dessus ne semble avoir une influence significative. Une étude [268] avait montré que le rendement avec le DVB était plus faible qu'avec le TRIM. Ici la comparaison se fait entre deux mélanges contenant des quantités différentes de DVB et d'EGDMA, on aurait pu s'attendre à une différence de rendements si l'EGDMA avait un comportement semblable au TRIM. Le fait de ne pas avoir d'effets significatifs pourrait encore une fois s'expliquer par la formation de particules à base de DVB principalement.

- Observation des particules obtenues

En plus de l'étude de la taille des particules et du rendement de polymérisation, la forme des particules et leur dispersion ont été observées. Ces deux réponses correspondent à des variables non continues, donc il n'est pas possible de faire un test de Student pour confirmer la significativité des facteurs sur celles-ci. Cependant, quelques tendances ont été observées, notamment dans le cas de la dispersion de tailles. Cette dispersion semble être plus importante avec une faible quantité de solvant, elle augmente avec la température, et elle semble être plus importante aussi lors de l'utilisation d'une plus grande quantité d'initiateur. Les particules obtenues sont, dans tous les cas, des particules sphériques, mais des phénomènes de coalescence ont été observés pour certaines conditions étudiées, notamment lors de la combinaison des facteurs F et G au niveau + 1, c'est-à-dire lorsque le nombre de moles de monomère fonctionnel et d'agents réticulants est le plus élevé.

Finalement, en ce qui concerne les tailles des particules, les synthèses qui conviennent à l'intégration de particules dans les canaux de 75 μm de la puce étudiée au chapitre II sont celles correspondant aux essais 3, 5, 6, 7 et 12. Des photographies MEB des particules résultant de ces essais sont présentées sur la Figure IV- 5.

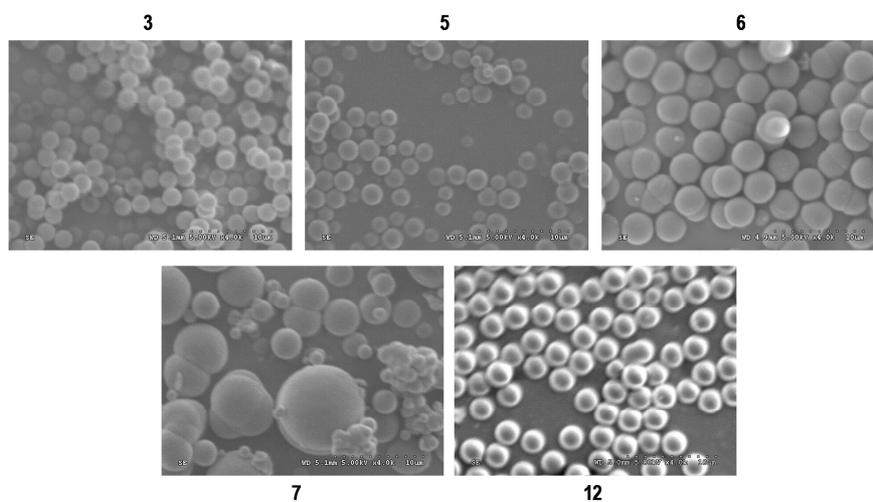


Figure IV- 5 : Images MEB des particules de NIP obtenues par les synthèses des NIP 3, 5, 6, 7 et 12 du plan d'expériences (Tableau IV- 4 et Tableau IV- 5). Agrandissement : x4000 . Tension : 5kV.

Parmi ces synthèses, on voit que les particules obtenues pour les synthèses 6 et 7 présentent un important degré de coalescence. De plus, dans le cas de la synthèse 7, la dispersion de tailles est très grande pour les particules obtenues. Ainsi, ces conditions de synthèse ne seront pas prises en compte pour la suite de l'étude. En ce qui concerne la synthèse 5, les particules présentent aussi une certaine dispersion de tailles. Finalement, pour les synthèses 3 et 12, les résultats en termes de forme, de taille et de dispersion de taille sont assez proches et satisfaisants dans le contexte de notre étude. Cependant, considérant que le meilleur MIP en bloc du chapitre III était plutôt constitué d'EGDMA et que celui qui avait été synthétisé avec

du DVB avait une faible rétention et très peu de sélectivité pour la cocaïne et la BZE, nous allons conserver les conditions de synthèse de l'essai 3 comme base de travail pour la suite de l'étude car pour cette synthèse la proportion d'EGDMA par rapport au DVB est la plus élevée.

IV.1.2.3 Ajustements du volume de solvant, de la température et de la durée de polymérisation

Les conditions de la synthèse 3 (NIP 3) du plan d'expériences sont rappelées dans le Tableau IV- 7.

Paramètres	Valeur
Ratio EGDMA / DVB	75/25
MeCN / toluène	100/0
Volume de solvant par mol de molécule empreinte	85 mL
Température de polymérisation	70°C
Vitesse d'agitation	400 min ⁻¹
Quantité de MAA par mmol de molécule empreinte	8 mmol
Quantité d'agent réticulant par mmol de molécule empreinte	20 mmol
Quantité d'initiateur par mmol de molécule empreinte	1,3 mmol
Durée de polymérisation	24 heures

Tableau IV- 7 : Résumé des conditions de synthèse du NIP 3.

Les conditions de synthèse du NIP 3 ont donc été choisies comme base pour poursuivre l'évaluation de l'influence des paramètres de synthèse sur la morphologie des particules, sachant qu'un certain nombre de ces paramètres peuvent être liés entre eux. Dans les essais précédents, la température ne semble pas avoir une grande influence dans la morphologie des particules lorsque cette température varie de 60 à 70°C. Donc, pour mieux évaluer l'effet de la température, tout en considérant que pour une meilleure stabilisation du complexe monomère fonctionnel/molécule empreinte, une température plus basse est recommandée, la synthèse du NIP 3, qui avait été effectuée à 70°C, a été réalisée par la suite à 60°C (synthèse a). Le temps de polymérisation avait été fixé à 24 heures pour le plan d'expériences. Cependant, lors de l'étude initiale de l'influence de l'agent réticulant, il semblait que ce paramètre avait une influence sur la coalescence des particules entre elles puisque la synthèse à 24 heures présentait plus de particules agglomérées que la synthèse de 16 heures (Figure IV- 5). Ce temps de polymérisation a donc aussi été étudié en effectuant une synthèse comme celle du NIP 3 mais avec une température de 60°C et une durée de polymérisation de 16 heures (synthèse b) au lieu de 24 heures. Finalement, considérant que le volume de solvant semble avoir une influence sur la taille des particules, et que cette taille augmente avec de plus faibles volumes, ce paramètre a aussi été étudié. La quantité de solvant initialement égale à 85 mL.mmol⁻¹ pour le NIP 3, a été réduite à 60 mL.mmol⁻¹ (synthèse c) et à 50 mL.mmol⁻¹

(synthèse d) de molécule empreinte, la température étant fixée à 60°C pour ces deux synthèses. Les résultats obtenus pour l'ensemble de ces synthèses sont présentés dans le Tableau IV- 8.

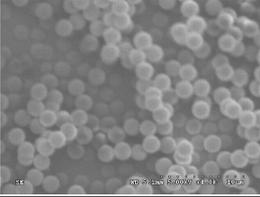
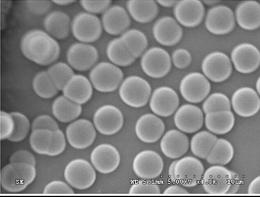
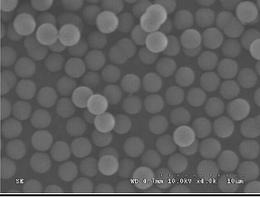
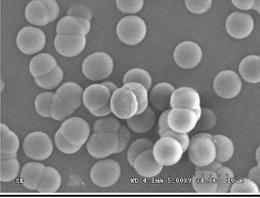
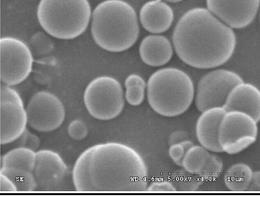
Synthèse	Température (°C)	Temps (heures)	Volume (mL.mmol ⁻¹)	MEB (x4000 , 5kV)	Diamètre (µm)
NIP 3	70	24	85		1,9 à 2,1
a	60	24	85		2,5 à 4,3
b	60	16	85		2,3 à 2,7
c	60	24	60		3 à 4
d	60	24	50		1 à 10

Tableau IV- 8 : Influence de différents paramètres sur la forme et la taille des particules de NIP.

La diminution de la température (Tableau IV- 8, synthèse a), semble augmenter la taille des particules obtenues (passage de 2 µm pour 70°C à 3 µm de diamètre pour 60°C). Considérant uniquement l'effet de la température sur la solubilité, l'effet contraire était attendu car le polymère aurait dû être plus soluble à une température plus élevée et donc les particules devraient être plus grandes. De même, d'un point de vue cinétique, à plus haute température, les chaînes de polymère devraient être terminées plus vite et donc être plus courtes et plus solubles. Cependant, lors de l'augmentation de la température, un nombre de nucléi de polymérisation plus important est formé puisqu'il y a aussi un nombre plus important de radicaux libres. Avec un plus grand nombre de nucléi, il y a moins de chaînes de polymère disponibles favorisant la croissance des particules, et donc celles-ci devraient être plus petites. Ces deux effets sont contraires, mais considérant les résultats obtenus, il semblerait que ce

soit le deuxième phénomène qui joue un rôle plus important pour définir la taille des particules. Considérant qu'une température de 60°C permet d'obtenir des particules un peu plus grandes et qu'elle serait plus favorable par la suite pour augmenter la sélectivité du MIP que 70°C, l'étude s'est poursuivie à 60°C. Afin de réduire le nombre de particules coalescentes, une synthèse de 16 heures au lieu de 24 heures a été réalisée (Tableau IV- 8, synthèse b). Si on observe alors une diminution du phénomène de coalescence, les particules sont en revanche aussi plus petites. Avec un temps plus court de polymérisation, les particules doivent effectivement se trouver dans un état où elles continuent d'intégrer des chaînes de polymère en croissance, et cette réaction doit certainement être plus rapide que la réaction entre deux particules ayant chacune des radicaux à leur surface. Si le temps de synthèse est plus long, les chaînes polymériques en solution réduisent en nombre et il y a donc plus de probabilités de réaction entre deux particules qui alors s'agglomèrent. Enfin, la diminution de la quantité de solvant (Tableau IV- 8, synthèses c et d) a clairement un effet sur la dispersion des tailles des particules, mais aussi sur leur coalescence. En effet, lors de la diminution de la quantité de solvant, la concentration des monomères est augmentée provoquant une coalescence. Finalement, les meilleures conditions de synthèse de NIP sont celles du NIP 3 reportées dans le Tableau IV- 7, mais avec une température de synthèse de 60°C au lieu de 70°C, à savoir correspondant à la synthèse a.

IV.1.3 Synthèse par précipitation et caractérisation d'un MIP

IV.1.3.1 Optimisation des conditions de synthèse

Les conditions de la synthèse a (Tableau IV- 8) ont alors été reprises pour la synthèse d'un MIP, donc en présence de la molécule empreinte lors de la polymérisation. Les images MEB correspondantes se trouvent sur la Figure IV- 6.

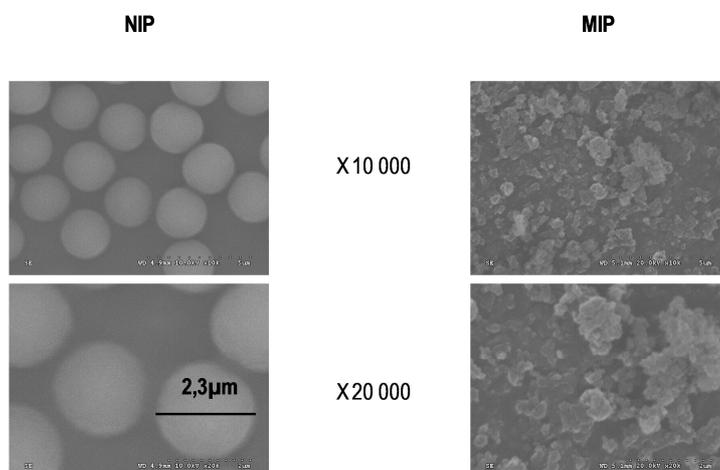


Figure IV- 6 : Images MEB des NIP et MIP synthétisés dans les conditions de la synthèse a du Tableau IV- 8. Tension = 5kV.

La synthèse du NIP semble répétable puisque des particules sont obtenues avec la même taille que celles obtenues précédemment. En ce qui concerne le MIP, la morphologie est complètement différente de celle du NIP puisque des petites particules amorphes sont obtenues. En général, on observe dans la littérature que la présence de molécule empreinte dans le milieu de réaction a une influence importante pour la taille des particules [238, 240, 268, 269, 277, 280]. Ici, non seulement les particules sont beaucoup plus petites lors de l'intégration de la molécule empreinte dans le milieu de polymérisation, mais en plus leur forme n'est plus sphérique. Il a déjà été mentionné qu'il était nécessaire d'avoir un contrôle très strict du rapport de molécule empreinte avec les monomères fonctionnels pour obtenir des particules de MIP [238], une quantité trop importante de monomère fonctionnel ou de molécule empreinte ayant pour conséquence la coagulation des particules, tandis qu'une quantité trop faible donne lieu à l'obtention de particules amorphes. En effet, lors de l'ajout de molécule empreinte, des complexes molécule empreinte/monomère fonctionnel se forment et les propriétés du monomère fonctionnel dans ce complexe ne sont plus les mêmes que lorsqu'il se trouve seul en solution.

Parallèlement, dans la partie précédente, il a été observé que le volume de solvant avait une grande importance pour le résultat final de la synthèse en termes de taille et de morphologie. Par conséquent, des MIP ont été synthétisés avec une plus grande quantité de solvant. Des quantités de solvant de 120 mL.mmol⁻¹ et de 170 mL.mmol⁻¹ ont été évaluées. Les résultats de ces deux synthèses, ainsi que de la synthèse précédente à 85 mL.mmol⁻¹ sont présentés dans le Tableau IV- 9.

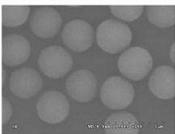
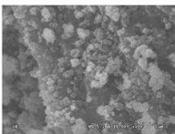
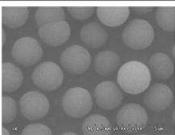
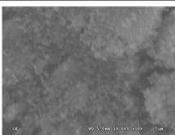
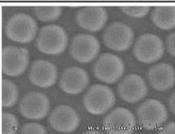
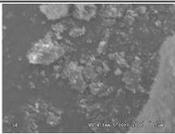
Volume (mL.mmol ⁻¹)	NIP	Taille NIP (µm)	MIP
85		2,8	
120		2,1	
170		2	

Tableau IV- 9 : Images MEB des particules de NIP et de MIP synthétisées dans les conditions citées dans le Tableau IV- 7, mais avec une température de 60°C et en faisant varier le volume de solvant.

Pour le NIP, dans les trois volumes testés, des microparticules sphériques sont obtenues, mais leur taille diminue légèrement lors de l'augmentation du volume de solvant. En effet, lors de la dilution du milieu, les chaînes de polymère en croissance ont moins de probabilité de se

rapprocher et donc il doit y avoir plus de nucléi et donc plus de particules mais de plus petite taille. Dans le cas du MIP, pour les trois volumes testés, les particules obtenues sont amorphes. Ainsi, un contrôle de la morphologie des particules de MIP par le volume de solvant porogène ne semble pas possible.

Considérant que le seul paramètre qui a changé par rapport aux synthèses de NIP est l'ajout de la molécule empreinte, une possibilité, pour essayer d'obtenir des particules de MIP, doit consister à réduire fortement la quantité de molécule empreinte pour que la quantité de complexe monomère fonctionnel/molécule empreinte soit en même temps réduite. Dans l'hypothèse de pouvoir obtenir des particules de MIP en réduisant la quantité de complexe monomère fonctionnel/molécule empreinte, différentes synthèses ont été réalisées avec de faibles quantités de molécule empreinte par rapport aux quantités de monomère fonctionnel et d'agent réticulant malgré le risque d'obtenir un support ne possédant pas assez de cavités. La quantité de solvant a été augmentée dix fois pour que la synthèse par précipitation se déroule correctement. Dans le Tableau IV- 10 sont présentés les résultats de cette étude.

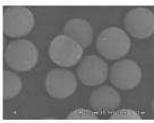
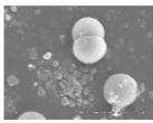
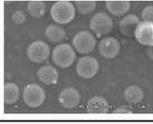
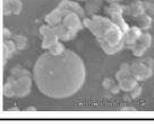
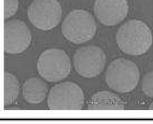
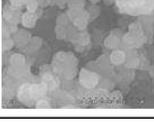
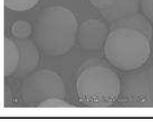
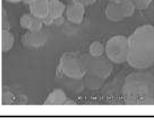
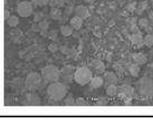
Ratio MC/MF/AR	Volume de solvant (mL.mmol ⁻¹ de MC)	NIP		MIP	
		Morphologie	Image MEB	Morphologie	Image MEB
1/80/200	850	Sphères 2,8 µm de diamètre		Quelques sphères 3,8 µm de diamètre et particules amorphes	
1/20/200	850	Agrégats et quelques sphères 3 µm de diamètre		Sphères 1,9 µm de diamètre	
1/8/200	850	Agrégats, blocs et quelques sphères 5 µm de diamètre		Sphères 2,7 µm de diamètre	
1/4/200	850	Blocs et agrégats		Sphères de tailles disperses (1 µm à 5 µm)	
1/8/100	850	Agrégats et sphères de tailles disperses		Nanosphères et microsphères, tailles disperses	

Tableau IV- 10 : Images MEB des particules de NIP et de MIP synthétisées avec du MAA comme monomère fonctionnel (MF), de la cocaïne comme molécule cible (MC) et un mélange de EGDMA/DVB (75/25, mol/mol) (AR), avec différents ratios MC/MF/AR dans du MeCN.

La première synthèse réalisée est assez semblable à celle décrite dans le Tableau IV- 7 avec une polymérisation à 60°C, mais la quantité de molécule cible a été réduite dix fois. Pour cette première synthèse, il semblerait qu'effectivement la réduction de la quantité de molécule

empreinte ait eu pour conséquence la production de sphères pour le MIP mais leur quantité reste très faible, donc le complexe MAA/cocaïne se trouve toujours en quantité suffisamment importante pour perturber la réaction de polymérisation par précipitation. Lorsque l'on modifie les ratios de molécule empreinte/monomère fonctionnel de 1/20, 1/8 et même 1/4 sans modifier la quantité d'agent réticulant (donc molécule empreinte/agent réticulant = 1/200), les NIP obtenus ont une morphologie qui s'approche de plus en plus à celle d'un bloc notamment lorsque l'on réduit la quantité de monomère fonctionnel. La dilution étant la même dans tous les cas, il semblerait alors que le phénomène de séparation de phases du polymère dépende fortement de la présence du monomère fonctionnel. Lors de la copolymérisation, le MAA doit probablement créer des répulsions entre les particules en croissance, et donc lorsque ce MAA n'est plus présent, les particules doivent avoir plus de facilité à se rapprocher et créer un réseau globulaire proche d'une synthèse en bloc. Dans le cas du MIP, les particules sphériques deviennent de plus en plus grosses lorsque la quantité de monomère fonctionnel diminue tout en conservant de faibles quantités de molécule empreinte. Le monomère fonctionnel est toujours en excès par rapport à la molécule empreinte, donc il existe sous deux formes, en tant que MAA libre et en tant que complexe avec la cocaïne. La différence de réactivité du MAA sous ces deux formes doit être à l'origine de la perte du phénomène de précipitation lors de la synthèse d'un MIP. Il est donc nécessaire dans ces conditions de bien moduler la quantité de MAA, de cocaïne et d'agent réticulant pour avoir une synthèse donnant lieu à la formation de particules sphériques. Parmi les différentes synthèses de cette étude, le MIP résultant de l'utilisation du rapport molécule empreinte/monomère fonctionnel/agent réticulant de 1/8/200 présente une morphologie acceptable pour son utilisation dans un microsystème avec des canaux de 75 μm de côté. La rétention des analytes cibles sur ce polymère doit cependant être étudiée pour évaluer s'il permet leur extraction sélective.

IV.1.3.2 Evaluation de la sélectivité du MIP

Ayant obtenu des particules sphériques de MIP d'une taille adéquate par précipitation, la rétention des molécules cibles a donc été étudiée. Précédemment, la sélectivité d'un MIP avait toujours été évaluée en étudiant en parallèle le MIP et son NIP correspondant. Or, aucune particule n'a été obtenue pour le NIP synthétisé dans les mêmes conditions, donc il ne permet pas vraiment d'évaluer la sélectivité du MIP correspondant. Par conséquent, la rétention du MIP sera comparée avec celle du NIP qui lui ressemble le plus en morphologie, c'est-à-dire celui qui correspond à la synthèse de NIP optimisée dont les paramètres sont résumés dans le Tableau IV- 7 mais avec une température de réaction de 60°C.

Pour évaluer la rétention de la cocaïne sur le MIP 1/8/200 et le NIP, des pré-colonnes de 20 mm de longueur et 1 mm de diamètre interne, ont été remplies avec environ 17 mg de MIP ou de NIP en utilisant des frittés de 0,5 μm de porosité pour maintenir les particules de 2,7 μm . Une série de lavages a été effectuée pour éliminer les réactifs restants après la synthèse par précipitation ainsi que la molécule empreinte. Pour étudier la sélectivité du MIP, un protocole hors ligne a été choisi car il est plus simple de mettre en œuvre qu'un couplage en ligne. Il consiste à collecter les fractions percolées en sortie de pré-colonne pour analyser le contenu. La pré-colonne a donc été connectée directement à une pompe et les volumes percolés ont été déterminés grâce au débit ($0,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) de la pompe et à la durée de percolation. La sélectivité étant normalement la plus importante dans le milieu de synthèse, le protocole d'extraction de la cocaïne a été développé en milieu MeCN. Le protocole ainsi que les résultats obtenus sont présentés dans la Figure IV- 7.

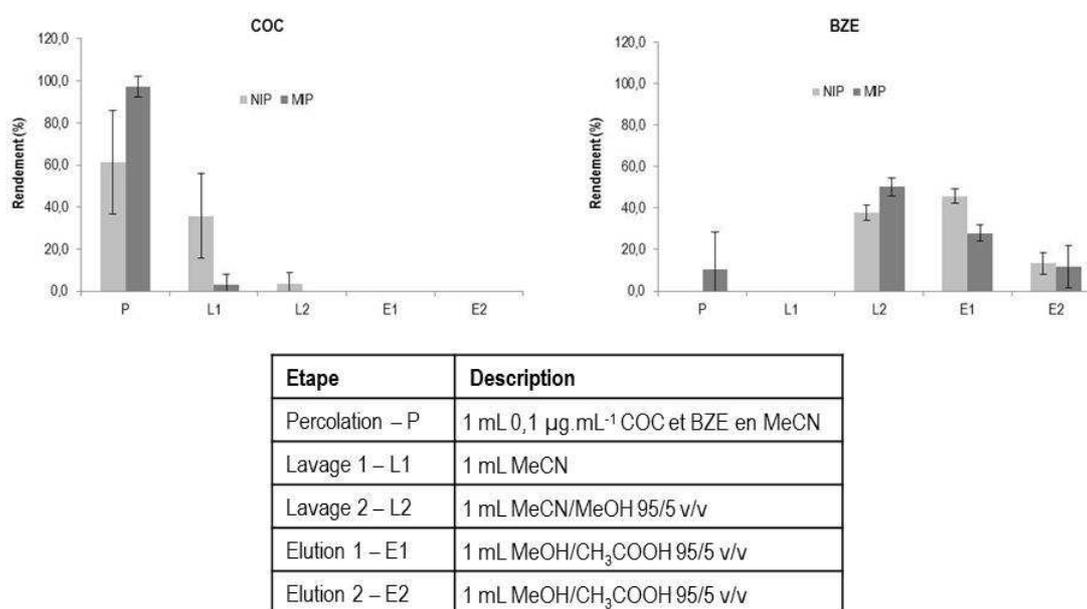


Figure IV- 7 : Profils d'extraction de la cocaïne et la BZE sur des pré-colonnes de 20 mm de longueur et 1 mm de diamètre interne remplies avec le MIP 1/8/200 et avec le NIP décrit dans le Tableau IV- 7 mais avec une polymérisation à 60°C (n=3).

Pour la cocaïne, aucun des deux supports ne la retient lors de la percolation. Or le solvant de percolation, donc le MeCN, est le même que celui utilisé lors de la synthèse du MIP. Il s'agit donc du milieu pour lequel les interactions entre la cocaïne et le MIP doivent être les plus fortes. Comme il n'y a aucune rétention, il est possible qu'il n'y ait pas de sites d'interaction spécifique dans ce MIP à cause de la réduction de la quantité de complexe cocaïne/MAA. Pour la BZE, il y a une meilleure rétention, puisqu'elle est quasiment retenue complètement à la percolation par le MIP et le NIP testés. Cependant, il semblerait qu'il n'y ait aucune sélectivité donc les interactions polaires observées doivent être plutôt de nature non-spécifique. Considérant que le NIP et le MIP testés ne sont pas issus de la même synthèse, leurs structures pourraient donc être très différentes induisant aussi un mécanisme de rétention

différent. D'ailleurs le NIP testé conduit à une meilleure rétention de la cocaïne que le MIP. Ces résultats expriment les limites que représente l'utilisation d'un NIP pour évaluer un MIP obtenu dans des conditions différentes. Il est donc nécessaire d'obtenir des particules de NIP et de MIP dans les mêmes conditions de synthèse pour pouvoir vraiment comparer leurs rétentions.

Une dernière série de synthèses de MIP a été réalisée en faisant varier les proportions des agents réticulants EGDMA et DVB pour tenter d'obtenir des particules de NIP et de MIP pour une même synthèse. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau IV- 11.

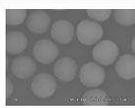
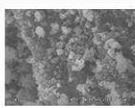
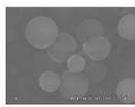
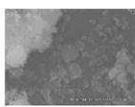
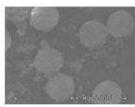
Ratio MC/MF/AR	Volume de solvant (mL.mmol ⁻¹ de MC)	Ratio EGDMA/DVB mol/mol	NIP			MIP		
			Image MEB	Taille (µm)	Morphologie		Taille (µm)	Morphologie
1/8/20	85	75/25		2,3	Microsphères		non	Bloc, agrégats
1/8/20	85	50/50		1,6 à 11	Microsphères		0,1 et 1,5	Sphères et agrégats
1/8/20	85	25/75		0,8 à 10,1	Microsphères		2 à 3 et 0,1 à 0,4	Microsphères et nanosphères

Tableau IV- 11 : Images MEB des particules de NIP et de MIP synthétisées avec du MAA comme monomère fonctionnel (MF), de la cocaïne comme molécule cible (MC) et un mélange de EGDMA/DVB variable (AR), dans du MeCN.

Pour les NIP obtenus, il semblerait que l'augmentation de la proportion de DVB dans le milieu de polymérisation conduit à des particules caractérisées par deux tailles différentes. On observe également que plus il y a de DVB, plus la proportion de particules de grande dimension est grande. Les particules pourraient intégrer plus ou moins d'EGDMA expliquant ainsi la différence des tailles obtenues. Il est probable que les particules les plus grosses soient principalement formées de DVB puisque lors de l'augmentation de la proportion de DVB il y a de plus en plus de particules de grandes dimensions. Dans le cas du MIP résultant de l'utilisation de 50 % d'EGDMA, il y a toujours formation de particules amorphes de petite taille, mais avec 25 % d'EGDMA, des particules sphériques sont obtenues avec deux tailles très différentes puisqu'il y a formation de nanosphères et de microsphères. Il semblerait donc que l'ajout de cocaïne dans le milieu de polymérisation ait pour effet de réduire la copolymérisation de l'EGDMA avec le DVB. Avec une faible proportion d'EGDMA, l'obtention de deux types de particules sphériques pourrait être liée à ce manque de copolymérisation, c'est-à-dire que les microsphères sont certainement constituées de DVB tandis que les nanosphères doivent probablement être constituées d'EGDMA. Finalement, pour la synthèse effectuée avec 25 % d'EGDMA et 75 % de DVB des microsphères ont été

obtenues pour le NIP et pour le MIP. Il est donc possible de comparer la rétention de la cocaïne sur ces deux supports et d'évaluer ainsi la sélectivité du MIP obtenu.

Pour évaluer la sélectivité du MIP obtenu avec 25 % d'EGDMA et 75 % de DVB, comme pour les supports précédents, des pré-colonnes de 20 mm de longueur et de 1 mm de diamètre interne ont été remplies de NIP ou de MIP. Pour le MIP, les nanosphères ont d'abord été éliminées par centrifugation et filtration pour éviter de boucher les frittés de la pré-colonne. Les polymères ont été lavés avant de réaliser les protocoles d'extraction. Le protocole d'extraction ainsi que les résultats obtenus sont présentés sur la Figure IV- 8.

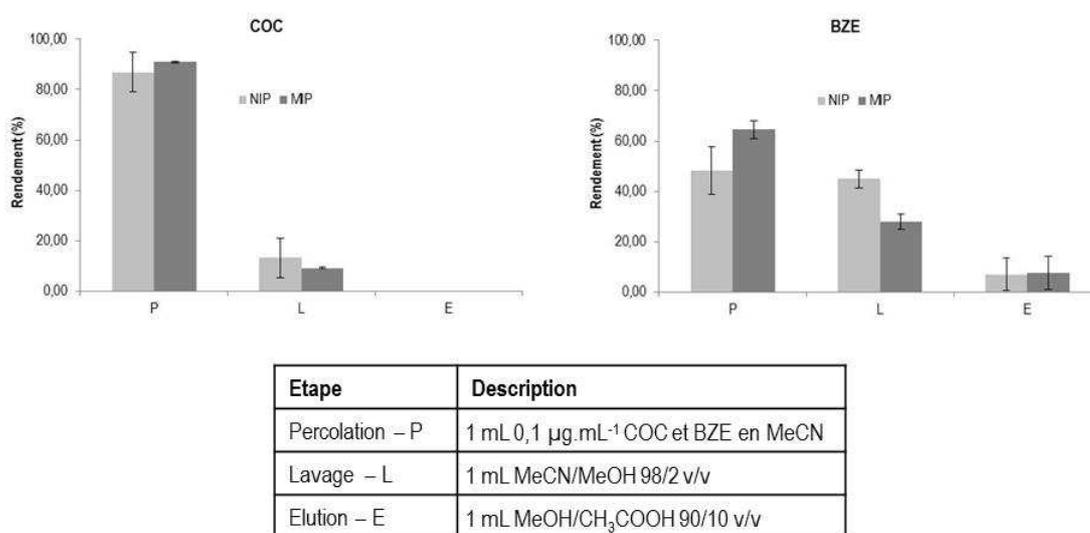


Figure IV- 8 : Profils d'extraction hors ligne de la cocaïne et la BZE appliqués sur des pré-colonnes de 20 mm de longueur et 1 mm de diamètre interne remplies avec le MIP 1/8/20 avec 25 % d'EGDMA et 75 % de DVB et avec le NIP correspondant (n=3).

Comme précédemment, la cocaïne n'est pas retenue ni par le MIP ni par le NIP à la percolation. Ce manque de rétention n'est certainement pas uniquement lié à la présence du DVB puisque dans le chapitre III, un MIP en bloc à base de DVB et d'EGDMA avait été synthétisé et celui-ci présentait une légère sélectivité pour la cocaïne. Cependant il est important de noter que des nanoparticules ont été observées lors de la synthèse du MIP qui sont vraisemblablement constituées d'EGDMA. Or, le complexe cocaïne/MAA qui a probablement une plus grande affinité pour l'EGDMA que pour le DVB a dû se retrouver plutôt dans les nanoparticules éliminées que dans les microparticules introduites en pré-colonne. Lors de la synthèse en bloc, ce complexe cocaïne/MAA doit se retrouver forcément intégré dans la chaîne polymérique puisqu'il y a une quantité minimale de solvant et la copolymérisation a forcément lieu, tandis que dans la réaction par précipitation, la dilution doit réduire les probabilités de réaction entre les chaînes en croissance de DVB et le MAA qui se trouve sous forme de complexe avec la cocaïne. En ce qui concerne la BZE, elle est faiblement retenue sur le MIP et par des interactions principalement non-spécifiques puisque

le NIP la retient aussi bien. Donc le MIP obtenu n'est à priori pas sélectif pour la cocaïne ni pour la BZE.

IV.1.4 Conclusions

La polymérisation par précipitation est un mode de synthèse facile à mettre en œuvre et qui permet d'obtenir des particules sphériques avec des tailles allant de 0,1 μm jusqu'à environ 10 μm . Différents paramètres ont été étudiés pour l'obtention de particules sphériques de NIP et leurs effets sur la morphologie et la taille des particules ont été discutés. Finalement, les paramètres ayant un effet important sur la morphologie des particules de NIP sont principalement le type d'agent réticulant, la nature et la quantité de solvant utilisé. Des particules sphériques de NIP d'une taille appropriée ont alors été obtenues grâce à l'optimisation d'un grand nombre de paramètres de synthèse.

La synthèse optimisée pour le NIP a par la suite été appliquée pour la synthèse du MIP mais la présence de la molécule empreinte a empêché la formation de microsphères de polymère. En effet, il semblerait que la réaction de précipitation soit très influencée par la présence du complexe molécule cible/monomère fonctionnel qui semble inhiber la copolymérisation entre le DVB et l'EGDMA. Finalement, pour l'obtention de microsphères de MIP, il a été décidé de réduire fortement la quantité de complexe cocaïne/MAA par rapport à la quantité d'agent réticulant, mais cela n'a par permis d'obtenir un MIP capable de retenir la cocaïne sélectivement car le nombre de sites d'interaction doit être très réduit. Une autre approche a consisté à augmenter la quantité de DVB par rapport à l'EGDMA. Cette deuxième stratégie n'a pas été efficace probablement car le complexe cocaïne/MAA s'est trouvé principalement dans les nanoparticules d'EGDMA qui ont été éliminées. La synthèse de particules avec 100 % de DVB ne donnerait certainement pas de meilleurs résultats puisqu'il avait été observé pour la polymérisation en bloc que la sélectivité dans ces conditions est trop faible.

D'autres méthodes de synthèse de particules pourraient être testées pour synthétiser un MIP cocaïne sélectif, mais elles sont plus compliquées et requièrent une prise en main assez importante. Un autre choix pouvant permettre la miniaturisation des supports serait donc de faire la synthèse in situ du MIP dans des capillaires avant l'intégration dans des microsystèmes, et dans ces conditions, il semblerait que l'approche la plus simple soit la synthèse de monolithes.

IV.2 Synthèse de MIP en format monolithe dans des capillaires

Dans la partie précédente, la synthèse de particules sphériques de MIP sélectifs pour la cocaïne n'a pas été possible par une méthode de polymérisation par précipitation à cause du grand nombre de facteurs qui doivent être contrôlés pour l'obtention de sphères. En effet, il n'a pas été possible de trouver un compromis pour l'obtention de particules sphériques de MIP de 1 à 5 μm de diamètre qui permettent de retenir sélectivement la cocaïne. Une deuxième option pour la miniaturisation du traitement de l'échantillon avec des MIP consiste à synthétiser des phases monolithiques in situ dans des capillaires ou dans des canaux de microsystemes. Les mélanges de polymérisation pour ce type de synthèses sont finalement assez proches de ceux utilisés pour une synthèse en bloc, bien que le volume de solvant utilisé soit intermédiaire entre une polymérisation en bloc et une polymérisation par précipitation. Dans cette dernière partie, la synthèse de supports monolithiques de MIP est présentée.

IV.2.1 Choix des conditions de synthèse

La synthèse de monolithes de MIP dans des capillaires est assez semblable à la synthèse en bloc. Cependant, il est nécessaire de prendre en compte les spécificités du format capillaire pour pouvoir développer la synthèse. Tout d'abord, le monolithe doit pouvoir s'ancrer aux parois du capillaire, ce qui entraîne des étapes initiales supplémentaires d'activation et de silanisation des parois du capillaire avant de réaliser la polymérisation. Une deuxième particularité des monolithes est que la taille des pores conditionne les caractéristiques de la colonne résultante. À ce titre, les phases monolithiques possèdent deux types de pores : des macropores ($> 50 \text{ nm}$) qui permettent l'écoulement des fluides à travers la colonne monolithique et des mésopores (2-50 nm) qui augmentent la surface spécifique de la phase stationnaire. Donc, une des difficultés de la synthèse de MIP en format monolithique réside dans l'obtention d'un support perméable qui possède en plus un nombre de sites de reconnaissance spécifique élevé. Des travaux antérieurs réalisés dans le laboratoire ont été effectués pour la synthèse d'un MIP en format monolithe sélectif pour l'alfuzozine [158]. Ces travaux seront donc considérés comme une première référence pour le développement de la synthèse de MIP sélectifs pour la cocaïne. Les différentes étapes de synthèse des monolithes dans des capillaires seront discutées brièvement par la suite.

IV.2.1.1 Traitement de surface des capillaires

Pour permettre l'ancrage du monolithe formé *in situ* dans le capillaire, la surface du capillaire doit intégrer des groupements vinyliques pouvant réagir avec les chaînes de polymère formées à l'intérieur du capillaire. Une première étape, pour conditionner le capillaire, est celle de l'activation de sa surface interne. Cette étape est nommée étape de gravure (« etching »). Cette procédure consiste à accroître le nombre de groupements silanols à la surface interne du capillaire, puisque ce sont ces silanols qui réagiront par la suite pour former des liaisons vinyliques. Le principe est d'utiliser tout d'abord un traitement à la soude pour dé-protoner les groupements silanols de surface en les rendant ainsi disponibles, suivi d'un traitement à l'acide pour re-protoner les groupements silanols libérés. La deuxième étape de traitement de la surface des capillaires est une silanisation qui consiste à lier chimiquement des composés organosiliciés ou organométalliques à la paroi interne du capillaire. Dans l'étude bibliographique réalisée précédemment au laboratoire [158], trois protocoles principaux ont été identifiés pour l'ancrage de monolithes organiques de MIP dans des capillaires. Ces trois protocoles sont présentés sur le Tableau IV- 12, le plus couramment utilisé pour la synthèse *in situ* de MIP étant celui de Hjerten.

Protocole	Activation	Silanisation	Source
Hjerten	Tamb, > 30 min, NaOH 1 mol.L ⁻¹ Tamb, > 30 min, H ₂ O	Tamb, 1 h, γ -MAPS 1,7 mmol.L ⁻¹ dans CH ₃ COOH 6 mmol.L ⁻¹ (pH=3,5)	[286]
Horvath	120°C, 2 h, NaOH 1 mol.L ⁻¹ Tamb, 15 min, H ₂ O Tamb, 15 min, acétone Séchage 60°C, 1 h	120°C, 6 h, γ -MAPS / DMF (1/1 , v/v) avec 0,1 % DPPH	[287]
Lin	Tamb, > 30 min, KOH 1 mol.L ⁻¹ Tamb, > 30 min, H ₂ O	60°C, 12 h, CH ₂ =CHMgBr / THF (1/5 , v/v)	[288]

Tableau IV- 12 : Protocoles de prétraitement de capillaires en silice pour la synthèse de monolithes *in situ* de MIP (Tamb : température ambiante, min : minutes, h : heures, γ -MAPS : γ -méthacryloxypropyl triméthoxysilane, DPPH : hydrate de 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl, THF : tétrahydrofurane, adapté de [158]).

Considérant les résultats obtenus dans les travaux antérieurs du laboratoire [158], un protocole très proche de celui de Hjerten, mais avec une étape supplémentaire d'activation avec de l'acide chlorhydrique a été utilisé pour la suite des synthèses. En effet, ce protocole avait été utilisé finalement pour la synthèse de MIP alfuzozine car il permettait de réaliser une couche fine de γ -MAPS à la surface interne du capillaire. De plus, un bon ancrage du MIP a été obtenu. Finalement, le protocole de prétraitement des capillaires de silice est celui décrit sur le Tableau IV- 13. Après silanisation, les capillaires sont rincés avec de l'eau puis du MeCN puis ils sont séchés en y faisant circuler de l'azote pendant vingt minutes avant le remplissage avec le mélange de polymérisation.

Activation des silanols	Silanisation
1) T _{amb} , 1 h, NaOH 1 M 2) T _{amb} , 5 min, H ₂ O 3) T _{amb} , 1 h HCl, 0,1 M 4) T _{amb} , 5 min, H ₂ O	T _{amb} , 1 h, γ -MAPS 1,7 M + CH ₃ COOH 6 mM (pH = 3,5)

Tableau IV- 13 : Conditions finales de traitement des capillaires en silice de 100 μ m de diamètre interne, avant leur remplissage avec la solution de polymérisation (adapté de [158]).

IV.2.1.2 Choix des réactifs pour la polymérisation

Si pour la polymérisation par précipitation il avait fallu s'éloigner des conditions de synthèse en bloc, pour la synthèse in situ de MIP sélectifs pour la cocaïne, les réactifs utilisés peuvent rester assez proches de ceux de la synthèse en bloc (chapitre III). Ceci est d'autant plus intéressant que le MIP en bloc avait montré une excellente sélectivité pour la cocaïne dans toutes les conditions testées ainsi qu'une bonne sélectivité pour ses deux métabolites principaux dans un milieu organique tel que le MeCN. Pour mémoire, ces conditions consistaient à utiliser la cocaïne comme molécule empreinte et le MAA comme monomère fonctionnel.

En ce qui concerne l'agent réticulant, c'est l'EGDMA qui avait permis d'obtenir les meilleurs résultats en termes de sélectivité, il pourra donc être testé pour la suite des synthèses. Cependant, une autre possibilité peut consister à utiliser du TRIM puisque dans le chapitre III, cet agent réticulant a montré une bonne sélectivité pour la BZE et une sélectivité moyenne pour la cocaïne. De plus, le TRIM ayant trois fonctions méthacrylate, il devrait pouvoir conduire à la formation d'un réseau tridimensionnel plus stable avec une structure plus poreuse que celle obtenue avec l'EGDMA. Enfin, le TRIM devrait permettre une meilleure définition des cavités spécifiques ainsi qu'un meilleur ancrage du monolithe aux parois du capillaire. Ainsi, les deux agents réticulants, EGDMA et TRIM, seront testés pour la synthèse in situ de monolithes de MIP dans des capillaires.

Finalement, en ce qui concerne le porogène, la plupart des travaux concernant la synthèse de monolithes de MIP dans des capillaires utilisent le toluène comme solvant porogène [158], mais le MeCN a tout de même été utilisé dans un cas pour la synthèse d'un monolithe de MIP sélectif pour la 4-aminopyridine utilisé par la suite pour la séparation électrochromatographique des isomères de l'aminopyridine [289]. Jusqu'ici c'est le MeCN qui a été utilisé dans tous les cas pour la synthèse de MIP de ce travail, aussi bien en bloc que pour la polymérisation par précipitation. De plus, lorsque le toluène a été utilisé pour la synthèse de sphères par précipitation, il a été observé que la taille des particules obtenues était significativement plus faible que lors de l'utilisation de MeCN pur. Considérant que le

mécanisme de synthèse des monolithes soit proche de la précipitation, l'agrégation de ces petites particules pour la formation du monolithe pourrait donner lieu à un réseau polymérique avec des pores trop petits et donc avec une faible perméabilité. Il a donc été décidé d'utiliser du MeCN pur comme solvant porogène. Lors de la synthèse de monolithes imprimés, l'utilisation d'un co-porogène est souvent nécessaire pour rendre les colonnes perméables [290]. L'un des co-porogènes les plus utilisés est l'isooctane [158], il sera donc utilisé dans les synthèses suivantes à une teneur de 10 % car pour la synthèse des monolithes in situ de MIP alfuzosine, cette composition de MeCN/isooctane 90/10 v/v avait donné lieu à un monolithe de perméabilité suffisante.

En ce qui concerne la polymérisation, elle a été réalisée thermiquement dans un bain thermostaté à 63°C en suivant le protocole utilisé précédemment dans le laboratoire [158]. En effet, l'étude préliminaire de la synthèse de monolithes in situ dans des capillaires de 100 µm de diamètre interne de MIP alfuzosine avait montré que l'initiation thermique est suffisante pour la synthèse d'un MIP dans des capillaires. En plus, avec une température de 63°C, et un temps de 80 minutes, le monolithe est formé uniformément sur toute la longueur du capillaire (L = 15 cm).

IV.2.1.3 Mise en œuvre des synthèses

Dans le travail réalisé précédemment au laboratoire [158], le montage utilisé pour le remplissage des capillaires consistait en l'introduction des solutions dans le capillaire par gravité tout en appliquant une légère pression pour pousser la solution dans le capillaire. Dans le cas du présent travail, le remplissage a été réalisé avec un pousse seringue à 500 nL.min⁻¹, d'une part car ce mode de remplissage est plus facile à mettre en œuvre, et d'autre part parce que le pousse-seringue permet d'avoir un meilleur contrôle du remplissage. Ceci est bénéfique pour améliorer la répétabilité de la synthèse qui est souvent un problème pour la synthèse de monolithes in situ dans des capillaires. En plus de réaliser les remplissages avec un pousse seringue, chacune des solutions de remplissage a été soniquée pendant deux minutes avant de remplir la seringue pour réduire les risques de formation de bulles. En effet, lors d'une des synthèses où les ultrasons n'ont pas été utilisés avant le remplissage, il a été observé que, suite au rinçage de la colonne monolithique, des parties du capillaire qui semblaient contenir le polymère, n'étaient plus remplies (Figure IV- 9). Le protocole de synthèse de monolithes est présenté en annexe 9.



Figure IV- 9 : Observation par microscope optique d'un capillaire rempli de MIP cocaïne issu d'une synthèse sans étape préalable de sonication avant (en haut) et après (en bas) son rinçage avec du MeCN à 200 nL.min⁻¹.

Des bulles d'air se sont probablement formées soit pendant la silanisation, soit lors du remplissage du capillaire avec la solution de polymérisation, et donc l'ancrage de celui-ci a été incomplet, ce qui a entraîné le décrochement de morceaux de polymère à divers endroits du capillaire (Figure IV- 9). Après l'introduction de l'étape de sonication, ce type de problème n'a plus été observé par la suite.

IV.2.1.4 Méthode de caractérisation des capillaires de MIP

Les monolithes peuvent être caractérisés par leur morphologie, mais aussi par leurs propriétés de rétention. Pour estimer les propriétés structurales des monolithes, deux méthodes ont été utilisées qui sont l'imagerie par MEB et la mesure indirecte de la porosité des monolithes.

Pour observer la structure des monolithes obtenus, une partie du capillaire contenant le monolithe est sectionnée, puis une fine couche d'or est déposée dessus pour rendre la surface conductrice. Ensuite, une image de ces monolithes est prise au MEB. Les images obtenues permettent ainsi de déterminer si l'ancrage du monolithe est correct et s'il occupe la totalité de l'espace intérieur du capillaire. Ces images donnent aussi une estimation de la taille de macropores ainsi qu'une idée de la forme du monolithe. Bien que l'imagerie MEB soit une méthode destructrice, elle requiert seulement d'une petite section de capillaire pour être réalisée et apporte en même temps une grande quantité d'information.

Concernant la porosité, une estimation de celle-ci peut être réalisée en mesurant la perméabilité de la colonne monolithique. En effet, la perméabilité dépend du nombre et de la distribution des tailles des pores ainsi que du rapport macropores/mésopores. Cette perméabilité au flux de phase mobile peut être déduite de la loi de Darcy :

$$\Delta P = \frac{\eta L u}{K^{\circ}}$$

où ΔP est la perte de charge (en Pascals), η est la viscosité de la phase mobile (en centipoises), L est la longueur de la colonne (en millimètres), u est la vitesse linéaire de la phase mobile (en millimètres par seconde), et K° est la constante de perméabilité de la colonne (en millimètres carrés). Ainsi, pour obtenir la perméabilité de chaque capillaire, la longueur L du capillaire a été fixée et le capillaire a été connecté à une pompe de nanochromatographie (nanoLC) avec une phase mobile composée de 100 % de MeCN ($\eta = 0,34$ cp) à un débit de $200 \text{ nL}\cdot\text{min}^{-1}$. La vitesse linéaire de la colonne a été déterminée grâce au temps de rétention d'un marqueur de rétention nulle (acétone). Ainsi, la perméabilité intrinsèque des colonnes monolithiques a été déterminée à partir de la mesure de la perte de charge des colonnes ainsi que par la mesure du temps de rétention nulle lors de l'injection d'acétone avec une phase mobile de 100 % de MeCN à $200 \text{ nL}\cdot\text{min}^{-1}$.

En ce qui concerne la sélectivité des capillaires de MIP, elle a été estimée à partir de la comparaison des propriétés de rétention des NIP et MIP par l'obtention des IF des MIP. Pour ce faire, les capillaires de NIP ou de MIP ont été découpés pour avoir une longueur de 5 cm, puis ont été connectés à la chaîne nanoLC générant un débit de MeCN de $200 \text{ nL}\cdot\text{min}^{-1}$. Des solutions d'acétone, en tant que marqueur de temps de rétention nulle, ou de cocaïne ou de BZE ont été injectées ($V_{\text{inj}} = 250 \text{ nL}$) pour obtenir les facteurs de rétention de la cocaïne (k_{COC}) et de la BZE (k_{BZE}). L'IF a été obtenu par l'équation suivante :

$$\text{IF}_{(\text{COC ou BZE})} = k_{\text{MIP}(\text{COC ou BZE})} / k_{\text{NIP}(\text{COC ou BZE})}$$

Plus le facteur d'impression est élevé, plus la sélectivité du MIP peut être considérée comme élevée, sachant qu'à partir de $\text{IF} = 1$, on considère que le MIP est sélectif car sa rétention est supérieure à celle du NIP.

IV.2.2 Optimisation de la synthèse

IV.2.2.1 Choix de l'agent réticulant

Ayant défini le mode de synthèse ainsi et les réactifs utilisés, un premier NIP a été synthétisé avec de l'EGDMA comme agent réticulant. En effet, même si les conditions de synthèse optimisées pour le MIP alfuzosine témoignent de l'utilisation du TRIM et pas de l'EGDMA [158], considérant que le MIP en bloc sélectif pour la cocaïne contient de l'EGDMA (chapitre III), cet agent réticulant a tout d'abord été utilisé. Les conditions de cette première synthèse sont présentées sur le Tableau IV- 14.

Paramètre	Valeur
Molécule cible (MC)	cocaïne
Monomère fonctionnel (MF)	MAA
Agent réticulant (AR)	EGDMA
MC / MF / AR	1 / 16 / 48 (mol / mol / mol)
Porogène (P)	MeCN
Co-porogène	Isooctane (10 % v / v)
(MF + AR) / P	30 / 70 (v / v)
Initiateur	AIBN (1,5 % m / m rapporté à MF + AR)
Initiation	Thermique 60°C 80 minutes

Tableau IV- 14 : Conditions de synthèse initiales pour la synthèse de monolithes de NIP ou de MIP par synthèse in situ dans des capillaires de 100 μm de diamètre interne.

Une coupe transversale du monolithe obtenu a été alors observée au MEB et sa perméabilité a été estimée en connectant un capillaire de 5 cm directement à la pompe nanoLC à un débit de $0,2 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ de MeCN. Malheureusement, le monolithe ainsi obtenu n'était pas perméable puisque la pression est très vite montée au-delà de 200 bars. Une nouvelle synthèse de NIP a donc été réalisée avec un volume de solvant plus important ((MF+AR)/P = 20/80 v/v) pour favoriser la formation d'une structure macroporeuse plus importante. Dans ces conditions, le NIP obtenu avait une perméabilité acceptable avec une $\Delta P/l=2,23 \text{ bar}\cdot\text{cm}^{-1}$ pour un débit de $0,2 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ de MeCN, l désignant la longueur du capillaire. Une synthèse de MIP a donc été réalisée dans ces mêmes conditions pour la solution de polymérisation mais avec de la cocaïne dans la solution. La Figure IV- 10 présente les images des deux NIP synthétisés avec différents volumes de solvant ainsi que du MIP avec une quantité de solvant de $22 \text{ mL}\cdot\text{mmol}^{-1}$ de molécule cible.

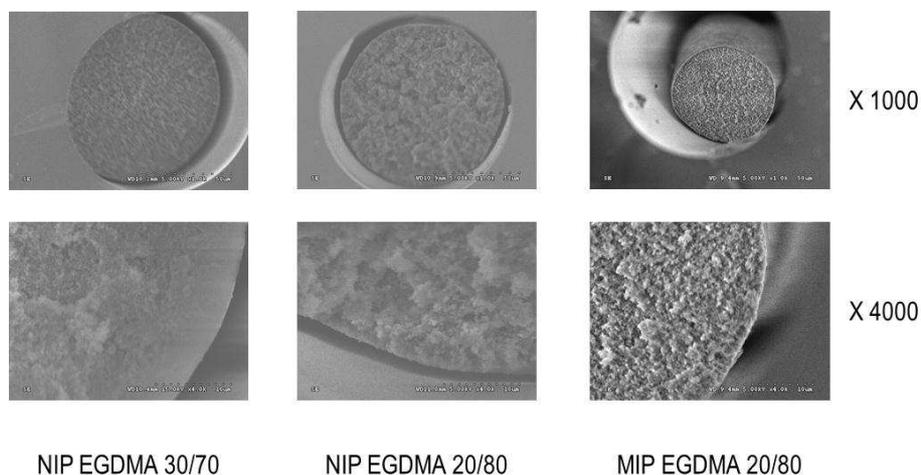


Figure IV- 10 : Images MEB des NIP et MIP synthétisés avec de l'EGDMA avec des rapports volumiques de (MF+AR)/P de 30/70 et 20/80 v/v. Autres conditions : voir Tableau IV- 14.

Ces images MEB montrent effectivement que la porosité est différente entre les deux synthèses de NIP : l'apport en solvant de la deuxième synthèse est suffisant pour changer la porosité du monolithe ainsi obtenu. Cependant, il semblerait que le monolithe de NIP dilué ne soit pas tout à fait ancré aux parois du capillaire, ce qui expliquerait que la perte de charge soit

aussi faible. Lorsque la perméabilité du MIP correspondant a été testée, un filament blanc s'est décroché du capillaire. En observant l'image MEB de ce MIP il est apparu clairement que celui-ci n'était pas ancré aux parois du capillaire. L'EGDMA semble avoir une forte interaction avec le MAA. D'ailleurs, les réactivités du MAA et de l'EGDMA sont assez proches. Par conséquent, l'EGDMA est moins disponible pour réagir avec les groupements vinyles de la paroi du capillaire, ce qui expliquerait le défaut d'ancrage du polymère observé. Dans le cas du MIP, ce problème d'ancrage semble encore plus important que dans le cas du NIP. Probablement lors de la formation du complexe COC/MAA, l'EGDMA a une affinité encore plus importante pour le MAA que quand il se retrouve seul en solution, et donc la disponibilité de l'EGDMA pour l'ancrage aux parois du capillaire est encore plus faible. Il est donc judicieux de changer d'agent réticulant. Ainsi, le TRIM, qui est un agent réticulant trisubstitué et donc qui devrait permettre un meilleur ancrage que l'EGDMA aux parois du capillaire, a été évalué.

Pour la suite de l'étude, les mêmes conditions de synthèse que celle décrites sur le Tableau IV- 14 ont été utilisées mais en remplaçant l'EGDMA par du TRIM. Considérant que le TRIM est trisubstitué, et sachant que le NIP EGDMA préparé précédemment avec un ratio $(MF+AR)/P = 30/70$ n'était pas perméable, il n'est pas surprenant de constater que le NIP TRIM n'est pas non plus perméable dans ces conditions. Comme dans le cas de l'EGDMA, le milieu de synthèse a été dilué $((MF+AR)/P = 20/80)$ pour réussir à obtenir un monolithe de NIP avec du TRIM qui soit perméable. Sur la Figure IV- 11 sont présentées les images MEB de ces deux synthèses de NIP.

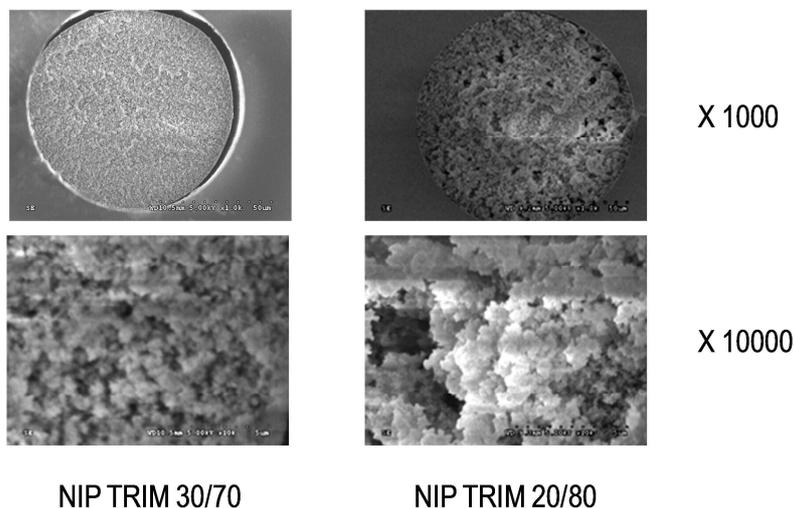


Figure IV- 11 : Images MEB des NIP synthétisés avec du TRIM avec des rapports volumiques de $(MF+AR)/P$ de 30/70 et 20/80. Autres conditions : voir Tableau IV- 14.

Comme dans le cas de l'utilisation de l'EGDMA, l'augmentation du volume de solvant permet de diminuer la perte de charge générée par le monolithe résultant, la perte de charge $(\Delta P/l)$ obtenue étant égale à $1,7 \text{ bar.cm}^{-1}$. D'ailleurs, dans la Figure IV- 11 la morphologie

observée pour les deux monolithes semble différente avec un volume de pores qui semble plus important pour le monolithe obtenu en milieu dilué. L'ancrage du monolithe 30/70 ne semble pas total sur l'image MEB, cependant, considérant l'importante perte de charge obtenue ($> 40 \text{ bar.cm}^{-1}$), l'ancrage doit être correct et il peut juste s'agir d'un effet d'optique lié au positionnement du capillaire lors de la prise de l'image MEB. En ce qui concerne la synthèse 20/80, l'ancrage semble correct sur toute la surface interne du capillaire. Considérant que la quantité de solvant à utiliser par mmol de molécule cible est très élevée pour rendre le monolithe perméable, la quantité de monomères a été par la suite réduite à un rapport plus classique de 1/4/20 comme dans la synthèse en bloc du chapitre III.

IV.2.2.2 choix des rapports molaires des réactifs

Une série de synthèses de NIP et de MIP avec un rapport molaire de MC/MF/AR égal à 1/4/20 a été réalisée avec du TRIM comme agent réticulant, du MAA comme monomère fonctionnel, du MeCN avec 10 % d'isooctane comme porogène, et une initiation thermique avec de l'AIBN à 63°C pendant 80 minutes. Dans cette série de synthèses, le ratio volumique de (MF+AR)/P a été modifié entre 10/90 (0,11) et 24/76 (0,32), pour évaluer les meilleures conditions de synthèse pour l'obtention de monolithes perméables. Après chaque synthèse, les capillaires ainsi préparés ont été découpés, et la perte de charge (en $\Delta P/l$) a été évaluée en nanoLC avec un débit de MeCN de $0,2 \mu\text{L.min}^{-1}$. Sur la Figure IV- 12 sont présentés les résultats de cette étude.

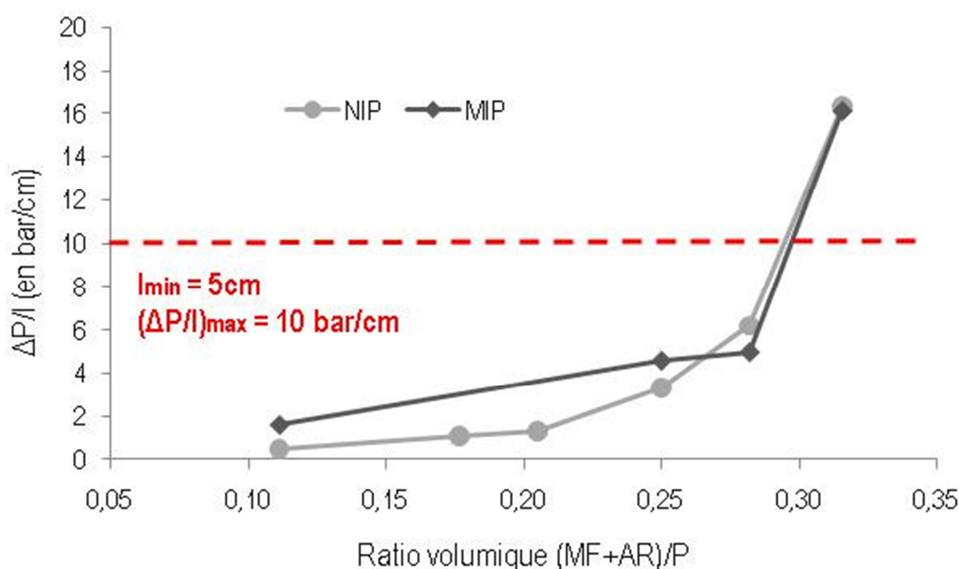


Figure IV- 12 : Etude du rapport $\Delta P/l$ des monolithes de NIP et de MIP avec un ratio molaire COC/MAA/TRIM de 1/4/20 en fonction du ratio volumique (MF+AR)/P. La ligne pointillée rouge représente la limite pour un $\Delta P/l$ de 10 bar.cm^{-1} .

Une tendance assez claire est observée pour les NIP et les MIP puisque la perte de charge augmente lorsque la quantité de porogène diminue (donc quand le rapport (MF+AR)/P augmente). Considérant que les monolithes de MIP seront utilisés par la suite pour développer une procédure miniaturisée de SPE en ligne, il sera nécessaire d'éviter d'avoir une perte de charge trop importante au niveau du monolithe. Comme la longueur de MIP qu'il est prévu d'utiliser est de 5 cm, une perte de charge de 10 bar.cm⁻¹ serait un maximum de pression acceptable pour la méthode en ligne. En effet, dans ces conditions, une pression totale maximale de 50 bars est générée au niveau du monolithe, qui s'ajoute alors à la perte de charge générée par la colonne séparative. Une perte de charge trop importante pourrait effectivement abimer le MIP ou même la colonne de séparation. La limite correspond donc à un rapport (MF+AR)/P = 23/79 (= 0,29). Pour avoir une perméabilité convenable sur le NIP et sur le MIP, il est donc nécessaire d'avoir des rapports (MF+AR)/P inférieurs à 23/79. Un rapport de 20/80 (= 0,25) a donc été utilisé pour la suite de l'étude. Les conditions finales optimisées sont présentées sur le Tableau IV- 15.

Paramètre	Valeur
Molécule cible (MC)	COC
Monomère fonctionnel (MF)	MAA
Agent réticulant (AR)	TRIM
MC / MF / AR	1 / 4 / 20 (mol / mol / mol)
Porogène (P)	MeCN
Co-porogène	Isooctane (10 % v / v)
(MF + AR) / P	20 / 80 (v / v)
Initiateur	AIBN (1,5 % m / m rapporté à MF + AR)
Initiation	Thermique 60°C 80 minutes

Tableau IV- 15 : Conditions de synthèse finales pour la synthèse de monolithes de NIP et de MIP in situ dans des capillaires de 100 µm de diamètre interne

IV.2.2.3 Caractérisation des MIP obtenus

- Caractérisation morphologique et perméabilité

Des couples de monolithes de NIP et de MIP (n=3) ont été synthétisés dans ces conditions de synthèse finales. La morphologie des monolithes issus de ces trois synthèses a été évaluée par MEB et les images correspondantes sont présentées sur la Figure IV- 13.

Il semblerait que, pour toutes les synthèses, les monolithes formés soient bien ancrés aux parois internes du capillaire. De plus, les monolithes occupent la totalité du volume interne du capillaire. En ce qui concerne leur morphologie, à première vue ils semblent tous présenter les mêmes tailles de pores. Par la suite, le rapport $\Delta P/l$ ainsi que la perméabilité intrinsèque (K°) des monolithes ont été déterminés. Pour le calcul de la perméabilité, une valeur de viscosité de 0,34 cp a été choisie, ce qui correspond à la viscosité du MeCN, et l'acétone a été utilisée

comme marqueur de temps de rétention nulle (t_0) pour pouvoir calculer la vitesse linéaire de la phase mobile. Les résultats obtenus sont présentés sur le Tableau IV- 16.

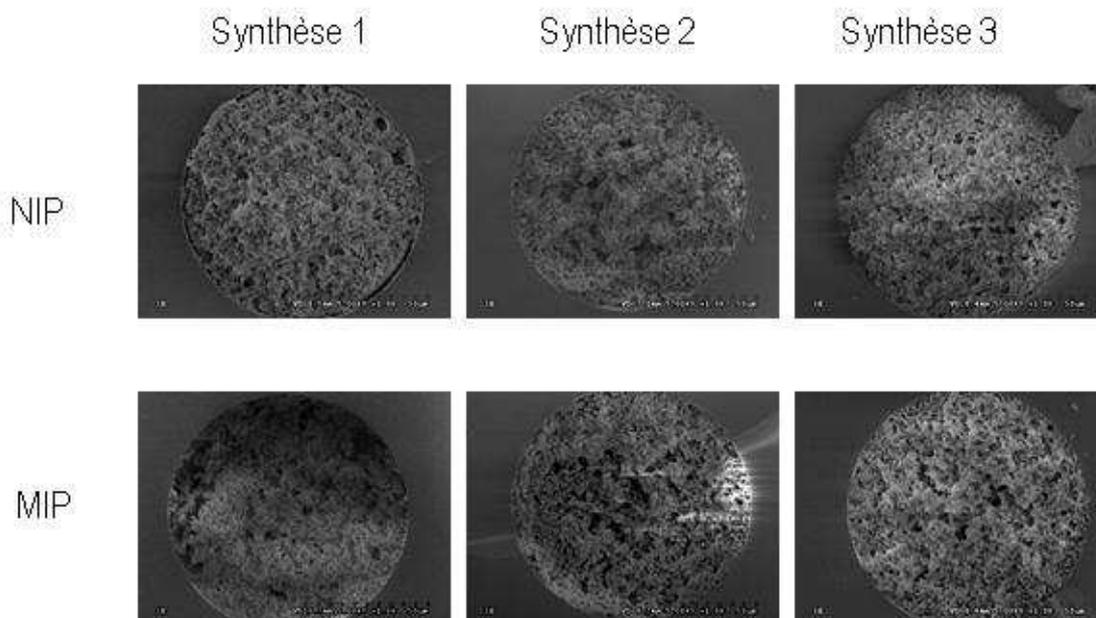


Figure IV- 13 : Images MEB d'une coupe transversale de capillaires de trois synthèses de monolithes de NIP et MIP synthétisés in situ dans des capillaires de silice de 100 μm de diamètre interne dans les conditions du Tableau IV- 15. Tension = 5 kV. Agrandissement = x 1000.

Colonne	ΔP (bars)	t_0 (s)	$\Delta P/L$ (bar/cm)	K° (μm^2)
NIP 1	58	210	3,5	2,29
NIP 2	45	222	3	2,55
NIP 3	45	252	7,5	2,32
MIP 1	109	222	6,9	1,11
MIP 2	100	234	2,9	0,97
MIP 3	68	258	4,8	1,38
Chromolith®	42	222	1,1	6,5

Tableau IV- 16 : Détermination de la perméabilité des colonnes monolithiques capillaires de NIP et de MIP synthétisées dans les conditions du Tableau IV- 15, avec un débit de 200 $\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$ de MeCN. Pour la colonne commerciale Chromolith®, la phase mobile utilisée pour la mesure de perméabilité est un mélange eau/MeCN 85/15 v/v à un débit de 500 $\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Les résultats obtenus pour la perméabilité montrent que dans tous les cas les NIP sont plus perméables que les MIP. Une fois de plus, la présence de la molécule empreinte semble avoir une importante influence sur la morphologie du polymère obtenu. D'ailleurs, il avait été observé pour la polymérisation par précipitation que les particules de NIP avaient une taille plus importante que celle des MIP, ce qui expliquerait que lors de la formation des monolithes, dont le procédé de synthèse s'apparente à celui de la précipitation, les NIP aient une plus grande perméabilité que les MIP puisque les interstices ainsi formés sont plus grands. Cependant, la perméabilité des MIP reste satisfaisante puisque la perte de charge

estimée pour les capillaires de 5 cm ne dépasse pas les 40 bars, ce qui est convenable pour un couplage en ligne avec une colonne de séparation monolithique. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus pour une colonne commerciale Chromolith® CapRod®. Pour ce faire, la perméabilité de la colonne Chromolith® CapRod® a été estimée pour un débit de $500 \text{ nL}\cdot\text{min}^{-1}$ avec un mélange eau/MeCN 85/15 v/v. Pour le calcul de la perméabilité, la viscosité a été estimée comme étant celle de l'eau donc pour 0,89 cp. La perméabilité obtenue pour la colonne commerciale est plus élevée que celle des NIP et des MIP. En effet, la colonne commerciale a une structure qui est beaucoup plus poreuse que celle des NIP et MIP synthétisés, comme on peut le voir sur la Figure IV- 14.

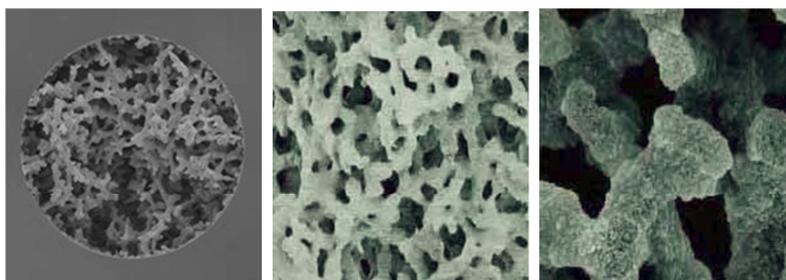


Figure IV- 14 : Images MEB d'une colonne Chromolith® CapRod®, colonne commerciale monolithique de silice greffée C18 (adapté des brochures de Chromolith®, Merck).

- Caractérisation de la rétention et la sélectivité des MIP

La rétention de la cocaïne et de la BZE ont été étudiées sur les NIP et les MIP résultant de ces différentes synthèses et elles ont été comparées à la rétention du marqueur de temps de rétention nulle, donc à l'acétone. Pour ce faire, une phase mobile constituée de MeCN pur a été utilisée à un débit de $0,2 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. En effet, le MeCN étant le solvant de synthèse des MIP, il devrait permettre d'obtenir une importante rétention des analytes sur le MIP. Des injections de 250 nL de cocaïne à $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, de BZE à $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ou d'acétone ont été effectuées à trois reprises sur les NIP et les MIP. Pour chacune des injections, le débit réel a été mesuré en sortie du détecteur UV. En effet, la régulation du débit se fait avec un diviseur de débit et un capteur qui permet de mesurer la contre-pression de la colonne pour mieux ajuster les paramètres contrôlant le diviseur de débit. Or, les colonnes utilisées pourraient ne pas être très homogènes et provoquer des fluctuations de la pression et par conséquent des débits. Donc la mesure du débit réel permet de confirmer d'une part l'homogénéité de la colonne, et d'autre part le bon fonctionnement de la pompe de nanoLC. La mesure du débit s'effectue en connectant une seringue graduée sans piston en sortie du détecteur grâce à un tube en téflon, puis en mesurant le temps nécessaire pour que le liquide passe d'une graduation à la suivante dans cette seringue. Dans tous les cas, le débit réel obtenu était très proche, à 10 % près, du débit théorique, c'est-à-dire de $0,2 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. La Figure IV- 15 présente les chromatogrammes nanoLC-UV obtenus pour la cocaïne, la BZE et l'acétone sur les NIP et MIP de la seconde synthèse.

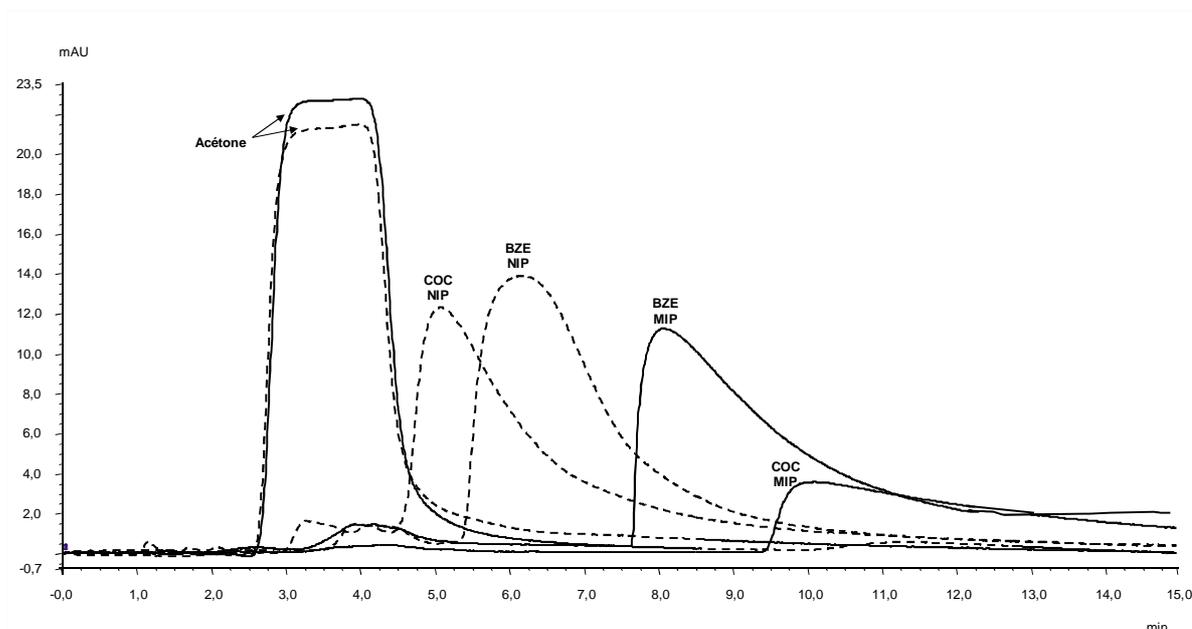


Figure IV- 15 : Chromatogrammes LC-UV obtenus après injection de 250 nL de cocaïne, ou BZE, ou acétone sur une colonne capillaire de 5 cm de longueur et 100 μ m de diamètre interne de NIP (tirets) ou de MIP (ligne continue).

De toute évidence, la rétention de la cocaïne et la BZE sur le MIP est plus importante que sur le NIP. Cette différence de rétention sur les deux supports témoigne de la sélectivité du MIP pour la cocaïne, mais aussi pour la BZE. Une autre caractéristique souvent observée lors de l'évaluation des MIP en chromatographie d'élution sont ces pics asymétriques qui traînent. D'ailleurs, la largeur des pics obtenus pour les MIP est très grande, ce qui indique que ces colonnes ont une assez faible efficacité. Ce manque d'efficacité ne présente pas un problème pour la suite des travaux puisque les MIP seront utilisés comme des supports de SPE et pas pour effectuer des séparations par HPLC. Cependant, pour pouvoir évaluer la sélectivité du MIP en chromatographie d'élution, il est nécessaire de mesurer le temps de rétention et le manque d'efficacité observée génère forcément une certaine imprécision dans la mesure des temps de rétention car les pics sont très larges. Malgré l'importante largeur des pics obtenus, les temps de rétention de l'acétone et des deux analytes ont été déterminés pour chaque colonne monolithique synthétisée en considérant le temps de rétention pour lequel le pic présentait une hauteur maximale. En ce qui concerne l'acétone, le temps de rétention pour les deux supports, le NIP et le MIP, est quasiment le même (voir Figure IV- 15). Ceci indique que les deux supports doivent avoir des morphologies et des propriétés assez proches. De plus, même si l'acétone pourrait ne pas être un bon indicateur du temps de rétention nulle, car elle pourrait subir des interactions avec les polymères, ces interactions semblent être les mêmes pour les deux types de supports, ce qui facilite leur comparaison. Les facteurs de rétention de la cocaïne et de la BZE pour chacune des colonnes capillaires ont pu être déterminés. Ils sont donnés dans le Tableau IV- 17.

Colonne	k_{COC}	$k_{\text{COC}} \pm \text{SD}$ (CV)	k_{BZE}	$k_{\text{BZE}} \pm \text{SD}$ (CV)
NIP 1	0,45	0,45 \pm 0 (0%)	0,73	0,8 \pm 0,1 (13%)
NIP 2	0,45		0,93	
NIP 3	0,45		0,77	
MIP 1	1,53	1,5 \pm 0,1 (7%)	0,99	1,2 \pm 0,2 (21%)
MIP 2	1,65		1,5	
MIP 3	1,43		1,21	

Tableau IV- 17 : Facteurs de rétention correspondant aux trois colonnes capillaires de NIP et de MIP synthétisées dans les conditions décrites sur le Tableau IV- 15. (k_{COC} = facteur de rétention de la cocaïne, k_{BZE} = facteur de rétention de la BZE).

Les facteurs de rétention sont assez faibles pour les deux molécules sur le MIP et surtout sur le NIP. Ces faibles facteurs de rétention sont liés d'une part à l'importante largeur des pics qui fait qu'ils se retrouvent finalement assez proches les uns des autres (Figure IV- 15), et d'autre part à la faible longueur de colonne qui ne permet pas de bien séparer les pics. Ceci indique encore une fois un important manque d'efficacité des colonnes qui est lié à la cinétique de partage sur les colonnes de NIP et surtout de MIP qui est assez lente. Malgré la largeur des pics, la mesure des temps de rétention semble assez correcte puisque des coefficients de variation assez faibles ont été obtenus pour les facteurs de rétention. Une estimation a alors été réalisée pour les facteurs d'impression de la cocaïne et la BZE et les résultats obtenus sont donnés sur le Tableau IV- 18.

Synthèse	IF_{COC}	$IF_{\text{COC}} \pm \text{SD}$ (CV)	IF_{BZE}	$IF_{\text{BZE}} \pm \text{SD}$ (CV)
1	3,4	3,4 \pm 0,2 (7%)	1,4	1,5 \pm 0,1 (7%)
2	3,7		1,6	
3	3,2		1,6	

Tableau IV- 18 : Facteurs d'impression correspondant aux trois couples de NIP/MIP synthétisés dans les conditions décrites sur le Tableau IV- 15 (IF_{COC} = facteur d'impression de la cocaïne, IF_{BZE} = facteur d'impression de la BZE).

Il semblerait que dans tous les cas les MIP présentent une certaine sélectivité pour ces deux molécules dans le milieu MeCN pur puisque les IF sont supérieurs à 1. En plus, les coefficients de variation pour les facteurs d'impression sont assez proches, ce qui montre que les MIP synthétisés doivent avoir des structures assez proches.

Enfin, les synthèses semblent assez répétables, aussi bien pour la structure des monolithes que pour leurs interactions avec les molécules cibles. Ceci montre qu'il est possible d'obtenir des protocoles répétables lors de la synthèse de monolithes de MIP in situ dans des capillaires. Il est toutefois nécessaire d'avoir un contrôle très précis des conditions de synthèse pour réussir à obtenir cette répétabilité car il s'agit d'un protocole long où chaque étape compte pour le

bon déroulement de la synthèse. Ces supports ont donc été testés en ligne pour l'extraction sélective de la cocaïne et la BZE.

IV.2.3 Couplage d'un monolithe imprimé en ligne avec la nanoLC

Pour pouvoir étudier le potentiel des MIP en format monolithe, il est nécessaire de développer un protocole d'extraction directement en ligne car les volumes utilisés dans ce format miniaturisé sont trop faibles pour pouvoir faire des analyses préalables hors ligne. Considérant que les monolithes de MIP synthétisés se trouvent dans des capillaires de 100 μm de diamètre interne, pour faire un couplage avec la LC, il est nécessaire de travailler à des débits correspondant à la nanoLC et avec une colonne analytique en format capillaire. La colonne analytique qui a donc été utilisée pour ce montage est une colonne monolithique Chromolith[®] CapRod[®] (150 mm x 0,1 mm d.i., Merck), qui est en effet une colonne monolithique de silice greffée avec des groupements C18, donc qui permet d'effectuer une chromatographie à polarité de phase inversée. Pour la suite de l'étude, la colonne de MIP 1 a été choisie comme pré-colonne d'extraction sélective de la cocaïne. Sa longueur a été fixée à 5 cm pour le couplage en ligne avec la colonne de séparation. Avant de développer la procédure d'extraction en ligne, le montage du système a été mis en place.

IV.2.3.1 Montage du couplage en ligne MISPE-LC-UV

Ce couplage doit permettre de prélever un certain volume d'échantillon dans une boucle d'injection positionnée sur une vanne 6 voies, puis de transférer cet échantillon dans la pré-colonne monolithique capillaire de MIP, connectée à une vanne 10 voies, pour retenir les molécules cibles. Ensuite, le changement de position des vannes doit permettre de connecter le MIP au système d'analyse pour entraîner les molécules cibles vers la colonne de séparation grâce à la phase mobile d'analyse. Comme dans le cas de la méthode développée sur puce (chapitre II), la solution qui permet de transférer l'échantillon vers la pré-colonne peut être utilisée comme une solution de lavage pour rincer la pré-colonne sans pour autant éluer les molécules cibles. Pour pouvoir faire le montage correspondant il est donc nécessaire d'avoir deux pompes qui délivrent des nano-débits : la première pompe (P1) va permettre de faire le chargement de l'échantillon sur le MIP ainsi que son lavage, et la deuxième pompe (P2) va permettre de transférer les molécules cibles vers la colonne de séparation et réaliser l'analyse proprement dite.

Considérant le format miniaturisé, de nouvelles contraintes doivent être prises en compte en plus de celles apportées par le couplage (voir partie I.2.3.3.2). En effet, en format miniaturisé, les volumes morts ainsi que les fuites deviennent un vrai problème. Pour réduire les volumes morts, le choix des vannes s'est porté vers une vanne à 6 voies de 1/32'', et une vanne 10 voies 1/16'' intégrée au système de pompage de la pompe P2, qui ont des volumes port à port de 25 nL. De plus, les connexions entre les différentes parties du système ont été réalisées avec des capillaires de diamètre interne de 20 μm directement connectés aux ports des vannes à l'aide de connecteurs (manchons), ou connectés entre eux avec des connecteurs à volume mort nul. Le montage utilisé est schématisé sur la Figure IV- 16. Dans les conditions présentées sur le schéma, le volume mort entre la boucle d'injection et la pré-colonne est égal à 344 nL, cette donnée servira par la suite pour fixer le temps de transfert à un débit donné.

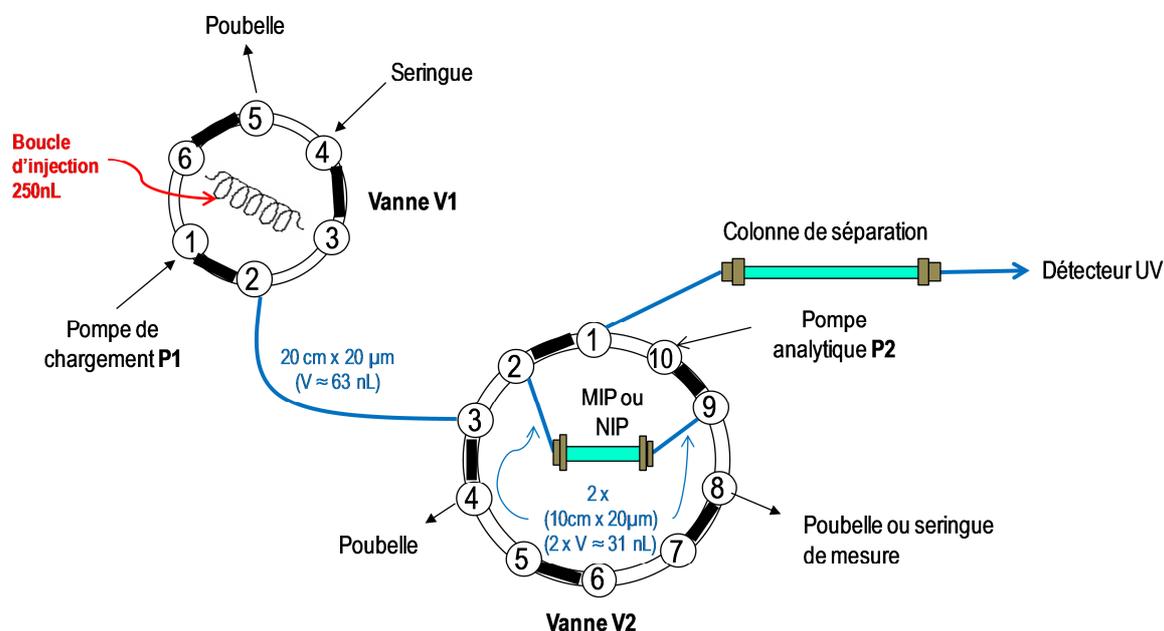


Figure IV- 16 : Schéma du montage utilisé pour le couplage en ligne du NIP ou du MIP à la nanoLC pour l'extraction sélective de la cocaïne.

Avec le montage de la Figure IV- 16, la procédure SPE en ligne se fait de la manière suivante :

- 1) Chargement manuel avec une seringue de la boucle d'injection ($V = 250 \text{ nL}$) sur la vanne V1 en position 1-2. La vanne V2 est en position 10-1 pour conditionner la colonne analytique avec la phase mobile délivrée par la pompe analytique P2.
- 2) La vanne V1 est basculée en position 6-1 pour que la solution amenée par la pompe de chargement P1 puisse transférer l'échantillon vers la pré-colonne de NIP ou de MIP. La vanne V2 est en position 10-1 pour faire le chargement de la pré-colonne et la

durée de cette étape sera déterminée par la suite en fonction de la rétention des analytes et donc du volume de lavage qu'il est possible d'appliquer.

- 3) La vanne V2 est basculée à la position 1-2 pour éluer les analytes de la pré-colonne vers la colonne de séparation. Cette étape dure le temps nécessaire pour transférer la cocaïne et la BZE vers la colonne analytique. Le temps dépend de la nature de la phase mobile et de l'intensité des interactions soluté/support de MIP et de NIP. Ce temps est supposé être court si le transfert est efficace, ce qui est nécessaire à l'obtention de pics chromatographiques de même qualité qu'en injection directe.

Il est important de noter que le montage qui est présenté sur la Figure IV- 16 se trouve en mode de rétro-balayage (*backflush*), c'est-à-dire que l'élution se fait dans le sens inverse de la percolation de l'échantillon, ce qui doit favoriser un transfert rapide et donc limiter l'élargissement des pics.

En ce qui concerne les pompes utilisées, la pompe analytique P2 est une pompe Dionex équipée d'un diviseur de débit nano qui travaille à des débits compris entre 50 nL.min^{-1} et $1,5 \text{ }\mu\text{L.min}^{-1}$. La pompe de chargement est une pompe Shimadzu LC-5A à pression constante qui permet d'obtenir le débit souhaité en fixant la pression à une valeur convenable. Pour déterminer cette valeur de pression, le pompage a été effectué à différentes pressions, ne dépassant pas les 150 kg.cm^{-2} pour éviter d'abîmer les monolithes, et le débit de la pompe a été mesuré en sortie de la pré-colonne de NIP ou de MIP. Cette mesure a été réalisée en connectant une seringue graduée de $10 \text{ }\mu\text{L}$ en sortie du port 8 de la vanne V2 et en comptant le temps (avec un chronomètre) mis par le liquide pour passer d'une graduation à la suivante ($V = 0,2 \mu\text{L}$). À chaque fois, 5 mesures de débit ont été réalisées pour l'obtention d'un débit moyen. Le choix s'est donc porté sur une pression de 110 kg.cm^2 pour obtenir des débits proches de $0,2 \text{ }\mu\text{L.min}^{-1}$. De plus, le débit a été contrôlé constamment avant toute injection afin qu'il ne varie pas de plus de 10 % de sa valeur initiale.

Enfin, pour la détection, un détecteur UV (Ultimate, *Dionex*) ayant une cellule en Z de 3 nL de volume a été utilisé. En effet, bien que ce mode de détection ne soit pas très sensible, et donc peu adapté à des analyses en format miniaturisé où les quantités d'analyte sont assez réduites, il a été nécessaire d'utiliser ce détecteur UV car nous n'avons pas d'interface pour une détection en MS adaptée à la nanoLC.

IV.2.3.2 Développement de la méthode de séparation

La première étape du développement de la méthode d'extraction a consisté à définir la phase mobile utilisée pour la séparation analytique. Pour ce faire, un montage assez simple a été réalisé en connectant sur la vanne V2 une boucle d'injection en connexion directe avec la colonne analytique de façon à pouvoir remplir la boucle avec une seringue et injecter l'échantillon directement en basculant la vanne V2. La colonne Chromolith® a été utilisée avec des injections de 250 nL et une détection UV à 233 nm. Dans un premier temps, les analyses ont été réalisées à 500 nL.min⁻¹ pour pouvoir effectuer une étude plus rapide, la perméabilité de la colonne le permettant ($\Delta P = 58$ bars). Dans ces conditions, plusieurs phases mobiles ont été testées avec 0,1 % d'acide formique et avec des rapports eau/MeCN v/v allant de 90/10 jusqu'à 70/30. Des injections d'une solution de cocaïne et de BZE à 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ dans de l'eau ont été réalisées et les résultats obtenus en termes de facteurs de rétention de la cocaïne et la BZE ainsi que de résolution ont été déterminés. Ces résultats sont reportés dans le Tableau IV- 19.

Phase mobile (eau/MeCN, v/v)	k' _{coc}	k' _{BZE}	Rs
90/10	2,02	0,94	3,76
85/15	0,74	0,35	2,98
70/30	0,18	0,11	1,23

Tableau IV- 19 : Facteurs de rétention (k') et résolution obtenus pour la cocaïne et la BZE pour une colonne Chromolith® CapRod® RP18 de 150mm x 0,1mm à différentes compositions de phase mobile. $V_{\text{injection}} = 250$ nL. Injection d'une solution de cocaïne et BZE à 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ en eau.

Le choix s'est porté vers une phase mobile avec 15 % de MeCN car la résolution y est très largement suffisante sans que les temps d'analyse soient trop longs, surtout considérant que pour le couplage avec le MIP, le débit va devoir être légèrement diminué pour éviter de trop grandes surpressions. Dans ces conditions, les LDD et les LDQ de cette méthode ont été évaluées par extrapolation à partir d'une injection de 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de cocaïne et de BZE comme référence. Les LDD pour la cocaïne et la BZE étaient de 0,12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ et 0,09 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivement. En ce qui concerne les LDQ, elles étaient de 0,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ et de 0,3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ pour la cocaïne et la BZE respectivement. Un chromatogramme correspondant à une injection de 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ est présenté en Figure IV- 17.

On observe que les pics sont assez larges. D'ailleurs, il devait être possible d'obtenir des pics plus fins en injectant une solution contenant 15 % d'acétonitrile comme la phase mobile, mais le but de ce développement de méthode étant de trouver des conditions optimales pour un couplage avec le MIP, une optimisation plus poussée de la méthode d'analyse n'a pas été effectuée.

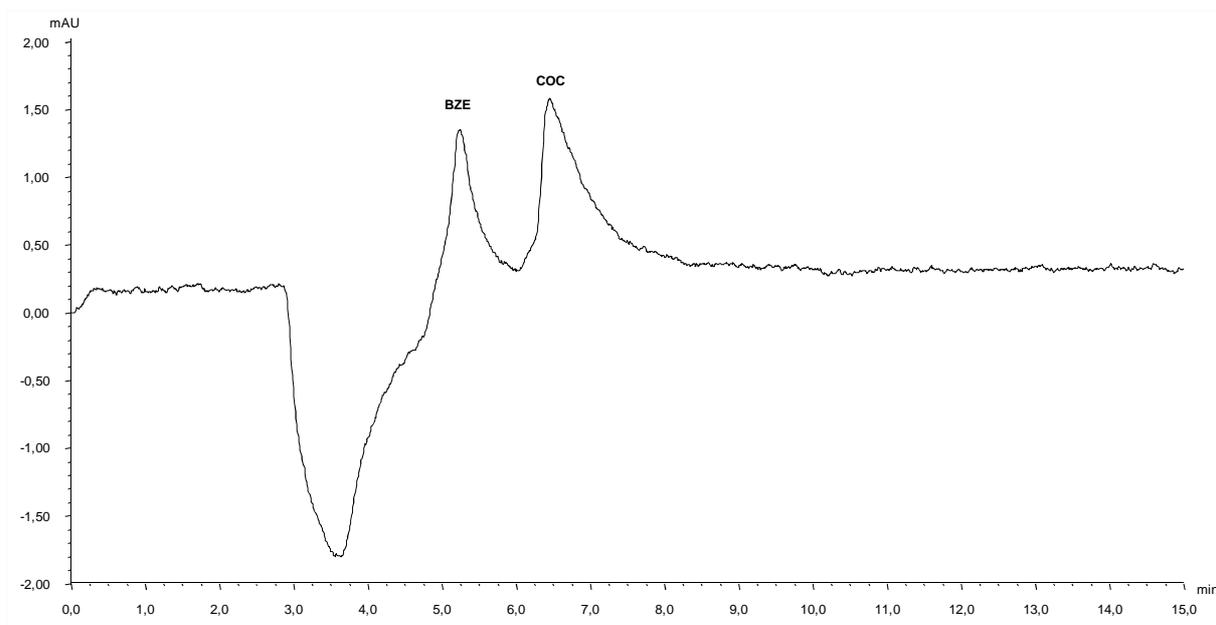


Figure IV- 17 : Chromatogramme LC-UV d'une injection de 250 nL de cocaïne et BZE à $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans de l'eau sur une colonne Chromolith® CapRod® (150 mmx0,1 mm d.i.) avec une phase mobile constituée d'un mélange eau/MeCN 85/15 v/v avec 0,1% d'acide formique à $0,5 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$.

IV.2.3.3 Estimation de la capacité du MIP

Avant de pouvoir appliquer le monolithe imprimé à l'extraction en ligne de la cocaïne, il est nécessaire d'estimer sa capacité, car la méthode d'analyse n'étant pas très sensible, il est nécessaire d'injecter des concentrations importantes d'analytes, ce qui pourrait être un problème si la capacité de la pré-colonne est atteinte. En effet, la pré-colonne utilisée a des dimensions assez faibles (50 mm x 0,1 mm d.i.) et pourrait ne pas avoir une capacité suffisante considérant les concentrations élevées injectées.

Pour déterminer la capacité du monolithe il serait nécessaire de réaliser plusieurs extractions en ligne avec des quantités de cocaïne variées, mais en même temps, le protocole d'extraction ne peut pas être développé si la concentration injectée est trop élevée et que le MIP se retrouve saturé. Il a donc été nécessaire de faire une estimation théorique de sa capacité. Dans le chapitre III, la capacité du MIP synthétisé avec de l'EGDMA était de $68 \mu\text{g}$ de cocaïne pour une cartouche contenant 25 mg de MIP. Dans le cas du monolithe, même s'il a été synthétisé avec du TRIM, les rapports entre la molécule empreinte, le monomère fonctionnel et l'agent réticulant sont les mêmes que ceux utilisés pour le MIP en bloc, donc cette valeur de capacité peut être utilisée pour estimer la capacité du monolithe de MIP. En considérant les dimensions de la cartouche du MIP en bloc (3mm x 5 mm d.i.), et en les comparant aux dimensions du MIP en capillaire (50mm x 0,1 mm d.i.), la capacité attendue pour le MIP en

format monolithe in situ dans un capillaire est de l'ordre de 0,45 μg de cocaïne pour une longueur de 5 cm. Considérant que le volume d'injection est de 250 nL, il est possible donc d'injecter des échantillons de cocaïne avec une concentration pouvant atteindre 1800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Ces quantités sont très largement supérieures aux LDQ préalablement estimées et aux teneurs couramment quantifiées dans des matrices biologiques de consommateurs de cocaïne (Tableau I- 2).

IV.2.3.4 Développement du protocole d'extraction

Il aurait été judicieux de faire une première étude en milieu MeCN, milieu dans lequel la cocaïne et la BZE présentent une forte rétention. En effet, cela aurait permis de mieux évaluer le couplage en terme de sélectivité et notamment pour les deux molécules. Finalement, cette étude n'a pas été effectuée par manque de temps et il a été décidé d'évaluer rapidement le potentiel de la méthode pour l'analyse d'un échantillon biologique et donc d'évaluer le couplage en milieu aqueux. Il restait encore cependant à définir la composition de la solution de transfert ainsi que le temps de chargement nécessaire pour transférer la totalité de l'échantillon dans le MIP (ou le NIP) et pour laver éventuellement le support. Considérant que la cocaïne pourrait se retrouver adsorbée sur les capillaires de connexion, la solution de lavage utilisée a été fixée à 10 % de MeCN avec 90 % d'eau comme pour la méthode en puce (voir chapitre II). Dans ces conditions, si on prend en compte le manque de rétention de la BZE en milieu aqueux et hydro-organique observé précédemment pour le MIP en bloc, il est assez probable que cette molécule ne soit pas retenue par le MIP durant le lavage. Elle a tout de même été injectée pour confirmer son comportement sur le MIP en format capillaire. Le montage de la Figure IV- 16 a été utilisé pour cette étude en plaçant le MIP comme pré-colonne. Le débit en sortie du MIP branché à la pompe de chargement P1 a été mesuré pour une pression limite de 110 $\text{kg}\cdot\text{cm}^2$, sa valeur était très proche de 0,2 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Avec ce débit et en considérant le volume mort (V_0) entre la boucle d'injection et l'entrée du MIP, différents temps de chargement ont été testés allant de $1xV_0$ jusqu'à $4xV_0$. L'échantillon utilisé pour cette étude est un échantillon d'eau dopée avec 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cocaïne et de BZE, l'ajout de solvant dans cet échantillon a été évité pour pouvoir se rapprocher au mieux de la nature de l'urine car, pour la suite, une application dans ce milieu sera considérée. L'analyse a été faite avec une phase mobile composée d'un mélange eau/MeCN 85/15 v/v avec 0,1 % d'acide formique et à un débit de 0,2 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, dans ces conditions, la perte de charge est de 75 bars lorsque la vanne V2 est en position d'analyse (1-2) et donc que la phase mobile circule à travers le MIP. Les résultats devraient être comparés aux aires de pic obtenues pour une injection directe exactement dans les mêmes conditions que celles utilisées avec le MIP. Cependant, les analyses n'ont pas été effectuées dans les mêmes conditions de débit car la

différence de pression entre le système en injection directe et le système intégrant le MIP est alors trop importante (27 bars pour injection directe contre 75 bars pour le couplage avec le MIP). En plus, le système est extrêmement sensible à la température, ce qui fait varier les valeurs de l'aire de pic d'un jour à l'autre, et vu la difficulté de la mise en place d'un montage en nanoLC, toutes les analyses dans chaque configuration ont été réalisées consécutivement. Donc les essais avec le MIP, avec le NIP ou en injection directe n'ont pas été effectués le même jour. Donc pour pouvoir faire cette étude, il a été considéré que l'aire de pic la plus élevée pour la cocaïne et la BZE correspondait à un rendement de 100 %. D'ailleurs, cette considération est possible car des aires assez proches ont été obtenues entre l'injection directe et le couplage avec le MIP, comme en témoigne la Figure IV- 18 où sont présentés les chromatogrammes correspondant aux deux types d'analyses, à savoir une injection directe et le résultat du couplage d'un MIP à la nanoLC, avec un volume de transfert pour la méthode couplée au MIP de $3xV_0$.

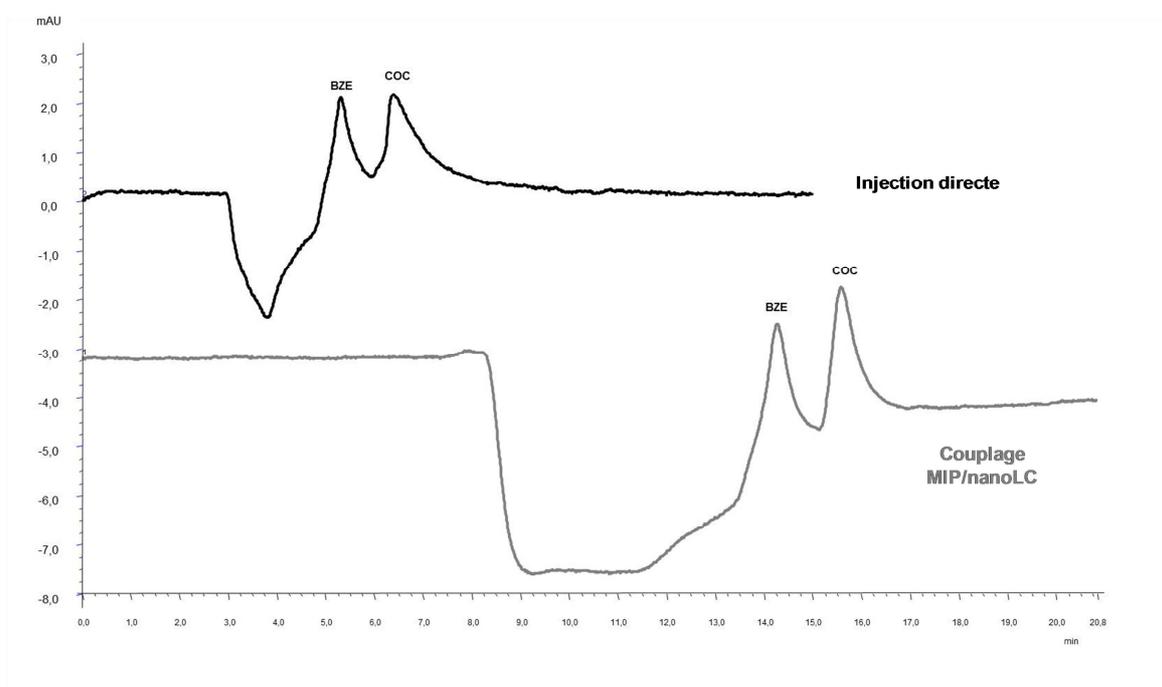


Figure IV- 18 : Chromatogrammes LC-UV de l'injection de 250 nL de cocaïne et BZE à $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ en injection directe à $0,5 \mu\text{L.min}^{-1}$, ou après une étape d'extraction en ligne sur le MIP à $0,2 \mu\text{L.min}^{-1}$ avec un transfert réalisé avec $3xV_0$ avec un mélange eau/MeCN 90/10 v/v. Colonne Chromolith® CapRod® (150 mmx0,1 mm d.i.), phase mobile : eau/MeCN 85/15 v/v avec 0,1 % d'acide formique.

Les temps de rétention sont de toute évidence différents, cependant, si on considère les temps de rétention nulle dans les deux cas, observés par une baisse du signal, finalement les facteurs de rétention ne sont pas si différents. Les aires de pics ne sont pas non plus très différentes puisque pour la cocaïne une aire de 1,11 u.a. est obtenue par injection directe et une aire de 1,69 u.a. est obtenue lors du couplage avec le MIP. L'aire est donc encore plus importante lors de l'utilisation du couplage. Ceci est probablement dû à la différence de débit entre les

deux méthodes, mais aussi grâce à l'utilisation du MIP qui doit certainement permettre de focaliser légèrement le pic de cocaïne. C'est assez surprenant de constater que la BZE apparaisse dans le chromatogramme, considérant que jusqu'ici elle n'avait jamais pu être retenue en milieu aqueux par un MIP. En plus, comme dans le cas de la cocaïne, l'aire de la BZE est supérieure après passage par le MIP ($A = 1,86$ u.a.) qu'en injection directe ($A = 1,08$ u.a.), donc le rendement d'extraction doit être assez proche de 100 %. Cette rétention de la BZE pourrait signifier que la rétention obtenue sur le MIP n'est pas sélective, mais avant d'étudier la situation avec le NIP, il était nécessaire de continuer l'étude avec le MIP pour ne pas avoir à refaire le montage. La Figure IV- 19 présente les aires de pic normalisées par rapport à la valeur de l'aire de pic la plus élevée pour la cocaïne et la BZE, en fonction du volume de transfert qui correspond au nombre de fois que le volume mort a été percolé.

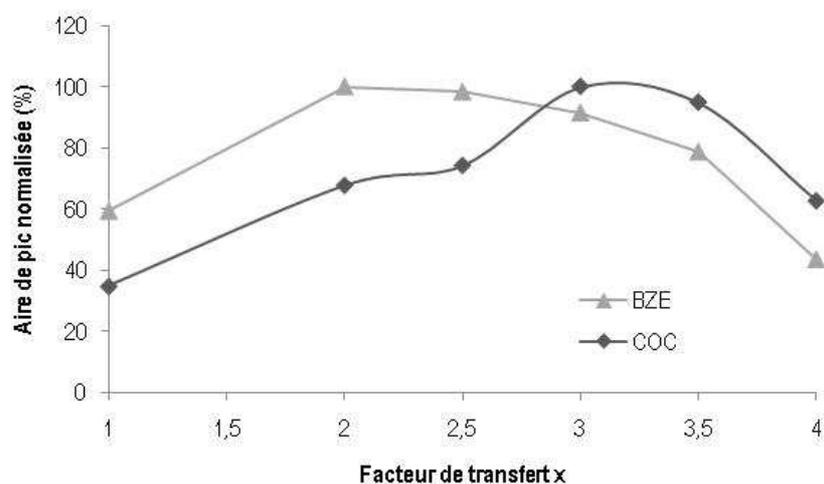


Figure IV- 19 : Aire de pic normalisée pour la cocaïne et la BZE en fonction du volume de chargement xV_0 calculé à partir du débit et du volume mort ($V_0 = 344$ nL).

Tout d'abord en ce qui concerne la cocaïne, il semble qu'il soit nécessaire d'utiliser un volume de transfert de 3 fois le volume mort pour avoir un rendement proche de 100 %. Ceci implique qu'il y a probablement de l'adsorption de cette molécule dans les différents capillaires de connexion et peut-être aussi au niveau de la vanne d'injection et de la boucle d'injection. Une fois que la totalité de la cocaïne atteint le MIP, donc pour $3xV_0$, il semblerait qu'elle soit assez rapidement éluée puisque l'aire de pic diminue dès $3,5xV_0$. Il convient donc d'utiliser par la suite un volume de transfert de $3xV_0$ pour la cocaïne. En ce qui concerne la BZE, il semblerait qu'elle subisse aussi, dans une moindre mesure que la cocaïne, des effets d'adsorption dans le système car pour atteindre le signal maximal de la BZE il a été nécessaire de percoler un volume de transfert de $2xV_0$. Le résultat obtenu est toujours assez surprenant, puisque la BZE est tout de même retenue fortement sur le MIP jusqu'à un volume de transfert d'environ $3x V_0$. Il avait été observé lors de l'étude d'un MIP en bloc avec du

TRIM, que la BZE présentait une certaine rétention en milieu aqueux, mais comme les résultats étaient assez proches de ceux obtenus avec de l'EGDMA et que pour ce support le changement des conditions de lavage n'avait pas permis de retenir la BZE, l'étude de la rétention du MIP à base de TRIM n'avait pas été poursuivie. Il se pourrait que finalement la BZE puisse être retenue par le MIP synthétisé avec du TRIM lors de l'utilisation d'une solution de lavage avec seulement 10 % de MeCN. Néanmoins, il est probable que cette rétention soit principalement due à des interactions non spécifiques, comme il avait été observé pour la cocaïne sur le MIP en bloc à base de TRIM. Ceci devra être donc confirmé par la suite en étudiant la rétention de ces molécules sur le NIP. Un temps de chargement équivalent à un volume de $3xV_0$ convient pour l'analyse de la cocaïne et de la BZE dans ces conditions de travail, donc ce volume de transfert a été utilisé pour la suite de l'étude.

Une estimation de la LDQ de cette méthode dans les conditions décrites précédemment a été réalisée en injectant une solution aqueuse de cocaïne et de BZE à une concentration de $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ des deux molécules. Dans ces conditions, le rapport du signal sur bruit pour la cocaïne était de 13 et celui de la BZE était de 8, donc les LDQ estimées sont de $0,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et de $0,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour la cocaïne et la BZE respectivement. Ce résultat confirme l'efficacité du transfert de la cocaïne et la BZE avec ce couplage puisque les LDQ sont très proches de celles obtenues en injection directe, dont les valeurs étaient de $0,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et de $0,3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour la cocaïne et la BZE respectivement. Ces LDQ ne sont pas très basses en grande partie à cause de l'utilisation d'un détecteur UV et pourraient être améliorées avec l'utilisation d'un détecteur MS. Il doit probablement être possible d'augmenter les limites de quantification en augmentant le volume injecté, surtout parce que la capacité du MIP estimée semble suffisante, mais ceci implique de refaire une étude du temps de chargement. Donc pour la suite, des échantillons dopés fortement avec de la cocaïne et de la BZE seront utilisés.

IV.2.3.5 Application à un échantillon d'urine dopé

Considérant que dans la partie précédente le MIP semblait retenir la BZE probablement par des interactions non-spécifiques, il était intéressant d'inclure la BZE dans cette étude, elle a donc été étudiée en parallèle de la cocaïne. Pour éviter de saturer le détecteur, l'analyse de l'urine s'est faite avec le système schématisé sur la Figure IV- 16 sans faire d'injections directes. Pour cette première étude un échantillon d'urine a été dopé à $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de cocaïne et de BZE puis il a été injecté après avoir été filtré par un filtre seringue de $0,2 \mu\text{m}$ de taille de pores. Le chromatogramme résultant, ainsi qu'un chromatogramme d'une solution aqueuse dopée à $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de cocaïne et de BZE, sont présentés sur la Figure IV- 20.

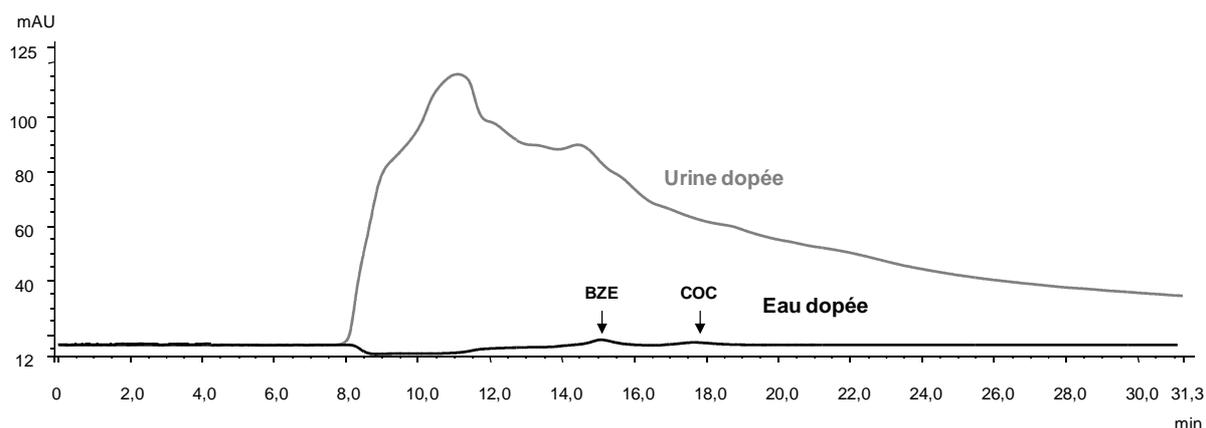


Figure IV- 20 : Chromatogrammes LC-UV correspondant à des injections soit d'eau, soit d'urine filtrée dopées avec de la cocaïne et de la BZE à $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ avec le dispositif présenté dans la Figure IV- 16 avec le MIP pour pré-colonne et un temps de chargement correspondant à $3xV_0$. Conditions analytiques cf Figure IV- 18.

Sur la Figure IV- 20 il est possible de voir que même avec l'introduction d'une étape d'extraction avec le MIP, le chromatogramme correspondant à l'injection d'un échantillon d'urine présente une énorme quantité d'interférents et il n'est donc pas possible d'observer les pics de cocaïne et de BZE dans le cas où ils seraient présents à l'élution. D'ailleurs, après l'injection d'urine, il a été nécessaire de réaliser un lavage très important de la colonne ainsi que de la pré-colonne pour pouvoir retrouver une ligne de base stable. De plus, considérant les faibles dimensions de la pré-colonne, et avec la grande quantité d'interférents de l'urine, il y a un risque important de saturation des sites de rétention spécifique du MIP ainsi que de saturation de la colonne et même du détecteur UV. Pour cette raison, pour la suite de l'étude, des échantillons d'urine dilués cinquante fois avec de l'eau puis dopés avec $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cocaïne et de BZE, ont été utilisés. Pour continuer l'étude de l'extraction sur le MIP, le temps de chargement, et donc le volume de lavage de la pré-colonne a été augmenté pour voir l'effet d'un lavage plus important lors de l'application d'échantillons d'urine diluée. Les résultats sont présentés sur la Figure IV- 21. La totalité de l'étude a été réalisée sur le MIP sans étudier avant le NIP pour éviter de défaire le montage pour le MIP. En effet, de nombreuses connexions sont présentes dans le montage et il n'est pas très simple de les remettre en place une fois le MIP déconnecté du système car la pression pourrait varier en changeant ainsi les résultats de l'analyse. Le NIP n'a donc été évalué qu'après avoir étudié le MIP, et l'étude concernant le NIP n'a malheureusement pas pu être effectuée en détail par manque de temps. Il sera donc nécessaire de refaire l'étude du volume de transfert pour le NIP pour compléter les résultats obtenus dans ce travail.

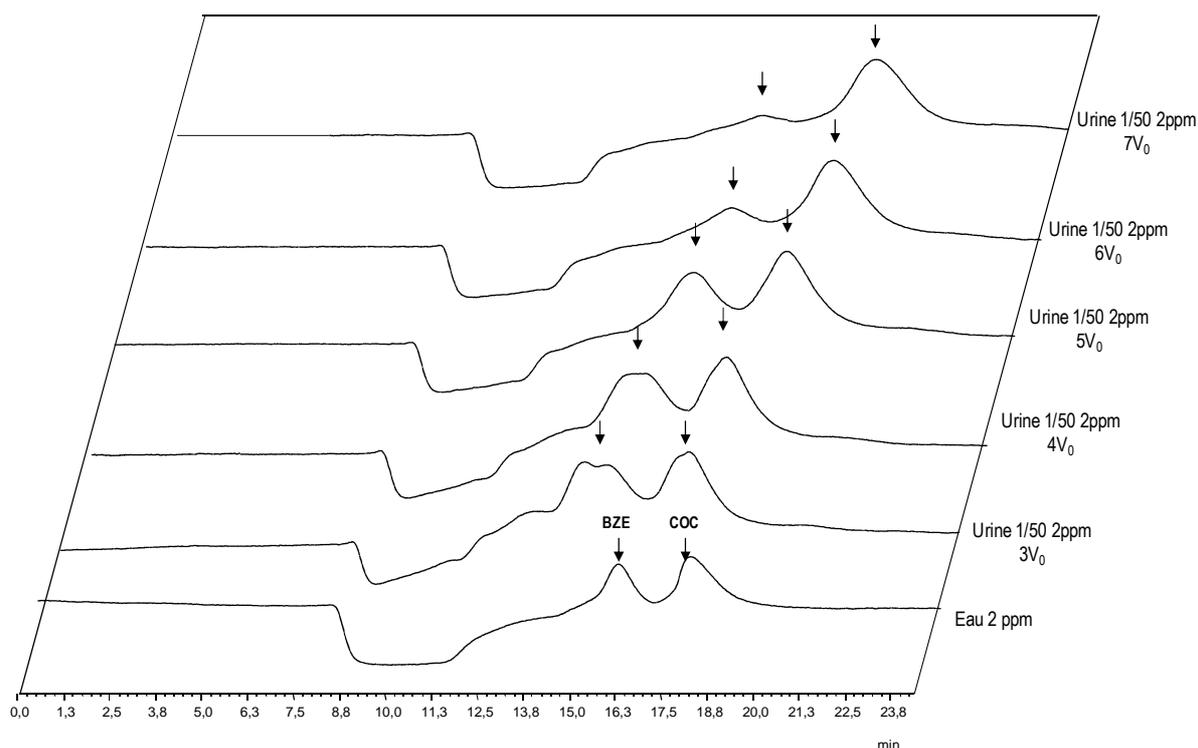


Figure IV- 21 : Chromatogrammes LC-UV correspondant à des injections d'eau ou d'urine diluée 50 fois avec de l'eau dopées avec $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cocaïne et de BZE réalisées avec le montage de la Figure IV- 16 avec le MIP pour pré-colonne et un temps de chargement variable xV_0 . Phase mobile : eau/MeCN 85/15 v/v avec 0,1 % d'acide formique. Débit : $0,2 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Colonne : Chromolith® CapRod® (150 mm x 0,1 mm d.i.).

Pour l'étude en milieu aqueux pur, un volume optimal de transfert avait été obtenu pour $V = 3xV_0$, mais apparemment dans le milieu urine diluée 1/50 avec de l'eau le résultat n'est pas satisfaisant avec ce volume de transfert puisque le chromatogramme correspondant présente un certain nombre d'interférences autour des pics de cocaïne et de BZE. Le volume de chargement a donc été augmenté jusqu'à $V = 7V_0$ en augmentant le temps de chargement. Les chromatogrammes montrent que pour $V = 5V_0$ il n'y a quasiment plus d'interférences empêchant la détection des pics de cocaïne et de la BZE. Il semble donc que lors de l'injection de l'urine diluée 50 fois avec de l'eau, la rétention de la cocaïne et de la BZE soit plus importante que dans un milieu aqueux pur puisque le volume de lavage utilisé est plus important. Ce résultat est assez surprenant compte tenu que lors de l'étude d'un MIP en bloc en milieu urinaire, la cocaïne était moins retenue. Encore une fois, ce MIP en format capillaire a été synthétisé avec du TRIM comme agent réticulant, et donc les interactions induites par cet agent réticulant pourraient être différentes par rapport aux interactions induites par l'EGDMA utilisé dans la synthèse en bloc. À un volume de chargement de $V = 7V_0$, le pic de BZE devient plus petit donc le volume de fin de fixation pour la BZE est atteint. Les pics obtenus en milieu urine diluée 50 fois avec de l'eau avec un volume de transfert de $5V_0$ sont plus grands que les pics obtenus pour un échantillon en eau pure avec un volume de transfert de $3V_0$. Il se pourrait alors qu'il y ait encore des interférences présentes pour les temps de

rétenion de la cocaïne et de la BZE qui affecteraient leur quantification. Dans tous les cas, l'apport du MIP est considérable car les chromatogrammes obtenus à partir d'un volume de chargement de $V = 5 V_0$ montrent bien la présence des pics de cocaïne et BZE. Dans la Figure IV- 22 des chromatogrammes LC-UV montrant l'injection directe de l'urine diluée 50 fois (a) et après l'extraction par le MIP avec un volume de transfert de $V = 7V_0$ (b) sont présentés.

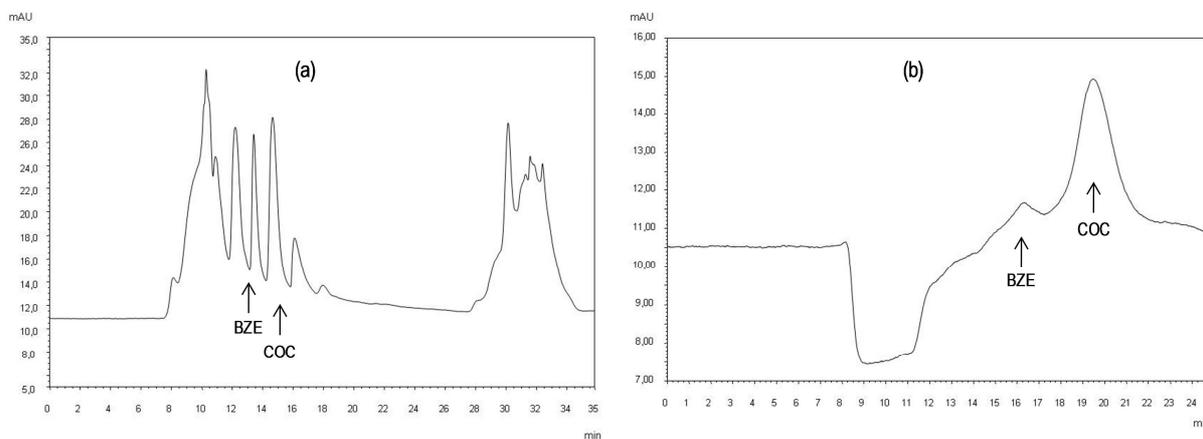


Figure IV- 22 : Chromatogrammes LC-UV de l'injection de 250 nL d'un échantillon d'urine diluée 50 fois avec de l'eau et dopé avec $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cocaïne et BZE, injecté directement sur la colonne de séparation (a) ou après l'extraction sur le MIP couplé à la nanoLC avec l'utilisation d'un volume de transfert de $7V_0$ avec un mélange eau/MeCN 90/10 v/v. Conditions d'analyse sur la Figure IV- 18.

Pour pouvoir confirmer la sélectivité réelle du MIP, il serait nécessaire de comparer le résultat obtenu pour le NIP dans les conditions optimales d'extraction obtenues pour le MIP, donc pour un échantillon d'urine dilué 50 fois et dopé avec de la cocaïne et pour un volume de transfert de $7 V_0$. Le manque de temps n'a pas permis d'effectuer cette étude, cependant, la comparaison des chromatogrammes de la Figure IV- 22 prouve déjà un apport en sélectivité important grâce à l'extraction en ligne avec le MIP. Il sera probablement intéressant d'évaluer la possibilité de développer un protocole d'extraction sélectif pour la cocaïne avec le MIP en bloc à base de TRIM comme cela avait été fait pour le MIP en bloc à base d'EGDMA. Ceci devrait permettre ensuite de déterminer plus facilement les conditions optimales d'extraction sur MIP au format miniaturisé et obtenir ainsi une extraction très sélective du MIP.

Finalement, des premiers résultats assez prometteurs ont été obtenus pour le couplage d'un MIP en format capillaire avec la nanoLC. Cependant le manque de temps, en grande partie dû à la difficulté du montage du système miniaturisé, n'a pas permis d'étudier tout le potentiel de ce couplage car la priorité a été donnée à l'analyse d'une matrice biologique complexe telle que l'urine. En effet, il serait nécessaire d'entreprendre une étude approfondie dans un milieu organique comme le MeCN, dans lequel le couplage peut présenter un certain nombre de contraintes puisque la phase mobile est hydro-organique, mais un milieu qui est tout de même assez intéressant car les interactions du MIP avec la molécule cible y sont les plus fortes. Pour ce faire, il serait souhaitable de travailler avec le MIP en bloc afin de faciliter le

développement du protocole d'extraction pour finalement le transposer au système couplé miniaturisé. Une autre étude importante consisterait à étudier en parallèle la rétention des analytes sur le NIP.

Conclusion

Dans ce dernier chapitre, deux approches ont été étudiées pour la miniaturisation de l'étape d'extraction sur phase solide sélective avec des MIP. La première approche a consisté à la synthèse de particules sphériques pour le remplissage de canaux d'un microsystème tel que la puce présentée dans le chapitre II de ce travail. Pour ceci, une polymérisation par précipitation a été sélectionnée de part, à priori, la simplicité de mise en œuvre et car ce type de synthèse aboutit à des particules avec la taille souhaitée et avec une faible dispersion de tailles. L'inconvénient de la précipitation s'est avéré être le grand nombre de paramètres à contrôler. Ainsi, une première étude de l'effet de plusieurs paramètres sur la synthèse de micro-particules de NIP a été réalisée. Des sphères ont ainsi été obtenues mais, lors de la synthèse de MIP, l'influence de la molécule empreinte sur la morphologie du polymère obtenu a été tellement importante que les conditions de synthèse ont dû être complètement modifiées. Il a tout de même été possible de produire des microsphères de MIP mais celles-ci se sont avérées peu rétentives pour la cocaïne et peu sélectives vis à vis de la BZE. En effet, la nécessité d'utiliser du DVB pour la synthèse semble être à l'origine de ce manque de rétention bien que cet agent réticulant soit forcément nécessaire pour l'obtention de sphères de bonne taille. Malgré l'échec de la synthèse de particules de MIP cocaïne sélectives, un grand nombre de facteurs ont pu être étudiés, ce qui pourrait être de grande utilité par la suite pour des synthèses de MIP en format particulière pour d'autres molécules.

La deuxième approche testée a été la synthèse de monolithes de MIP in situ dans des capillaires, approche permettant l'introduction à terme de MIP dans des microsystèmes. La plupart des paramètres ont été fixés par rapport aux résultats obtenus le long de ce travail mais aussi grâce à des travaux antérieurs réalisés dans le laboratoire. Finalement, un ajustement du volume de solvant ainsi que du type et de la quantité d'agent réticulant, a permis l'obtention de monolithes de MIP homogènes, ancrés aux parois du capillaire, perméables et présentant des facteurs d'impression acceptables pour la cocaïne en milieu MeCN. De plus, une bonne répétabilité de la synthèse en termes de morphologie et de sélectivité a été obtenue, la sélectivité ayant été démontrée en milieu MeCN par l'obtention d'un facteur d'impression moyen pour la cocaïne de 3,4. Ces monolithes ont pu être testés dans un couplage en ligne avec la nanoLC associé à une détection UV. Des résultats très encourageants ont été obtenus puisque ce couplage a permis d'obtenir une importante purification d'échantillons d'urine

permettant ainsi d'observer un pic en UV de cocaïne non visible lors de l'injection directe du même échantillon. Néanmoins, un certain nombre d'études seront nécessaires pour mieux évaluer le couplage des MIP en format capillaire avec la nanoLC. En effet, il n'a pas été possible dans ce travail d'approfondir l'étude de ce montage, notamment en milieu organique où le MIP peut apporter une meilleure sélectivité. Finalement, un des inconvénients majeurs de ce système miniaturisé est sa mise en place puisque le montage d'un tel système nécessite d'une attention particulière pour les connexions de façon à pouvoir obtenir des analyses répétables. Ce type de problème n'avait pas été observé lors de l'utilisation de la puce étudiée en chapitre II, car l'avantage d'utiliser un microsystème dans lequel les étapes d'extraction et de séparation sont intégrées est que le nombre de connexions à réaliser est moins important. L'intégration d'un monolithe dans un tel système pourrait donc être intéressante, notamment si l'on considère que la synthèse effectuée en format capillaire a présenté une bonne répétabilité, aussi bien pour la morphologie des MIP obtenus ainsi que pour les propriétés de rétention des monolithes. Cette répétabilité de synthèse est non négligeable puisque l'un des principaux problèmes associés à la synthèse in situ de monolithes dans des capillaires est le manque de répétabilité, phénomène aggravé dans le cas des MIP car une variable supplémentaire est ajoutée à la synthèse.

Conclusion et perspectives

Ce travail avait pour objectif le développement de méthodes analytiques dans des formats miniaturisés pour l'analyse de traces dans des matrices biologiques diverses et de complexité variées. La cocaïne et ses principaux métabolites, la BZE et le'EME ont été choisies comme molécules modèles. En effet, il s'agit de petites molécules dont l'analyse dans des milieux tels que l'urine, le sang, et les cheveux, entre autres matrices biologiques, présente un intérêt notamment pour l'analyse clinique ou toxicologique. Ces molécules présentent des propriétés physico-chimiques ainsi que des niveaux de concentration variés, d'où l'intérêt de leur utilisation en tant que molécules modèles.

L'essor de la miniaturisation a permis le développement de nouvelles technologies sur puce, en particulier pour l'intégration de la chromatographie liquide avec le traitement de l'échantillon. En effet, une puce commerciale intégrant un canal d'enrichissement, un canal de séparation et une aiguille de nanoélectrospray métallisée, est désormais disponible pour l'analyse LC-MS. Ce système a donc été étudié dans le cadre de ce travail pour la quantification de la cocaïne et la BZE dans les cheveux, milieu dans lequel les concentrations de drogues peuvent être assez faibles, et dans l'urine, qui est une matrice assez complexe induisant souvent des effets de suppression d'ions lors de l'analyse des échantillons en LC-MS. L'optimisation de cette méthode d'analyse sur puce a été effectuée au préalable montrant un certain nombre de limitations du système miniaturisé. En effet, la phase d'enrichissement est constituée de particules de silice greffée avec des chaînes octadécyle, pour laquelle la rétention de molécules polaires est assez faible. Il a donc été nécessaire d'augmenter la capacité du canal d'enrichissement en dépit des ces dimensions qui deviennent comparables à celles du canal de séparation, ce qui entraîne un élargissement des pics chromatographiques. Cette situation, ajoutée à l'élargissement des pics due à la présence de silanols résiduels de la colonne de séparation, réduit fortement l'efficacité et la sensibilité de la méthode. Donc, malgré la simplicité apparente de ce système miniaturisé ainsi que du système modèle étudié (deux molécules), une importante phase de développement s'est avérée nécessaire pour trouver le bon compromis permettant de quantifier la cocaïne et la BZE. Néanmoins, la simplicité de la préparation de l'échantillon, avec l'obtention d'analyses très sensibles pouvant limiter les effets de matrice, ainsi que les bonnes performances obtenues avec ce système, montrent le potentiel de ce type de dispositifs miniaturisés pour l'analyse de traces dans des échantillons biologiques.

Considérant l'importance d'un apport en sélectivité au niveau du traitement de l'échantillon, l'intégration de MIP dans ces systèmes miniaturisés a été envisagée. Cependant, il a été nécessaire de confirmer au préalable le potentiel d'un MIP pour l'extraction de la cocaïne de milieux biologiques. Pour ce faire, une première étape de développement a consisté à étudier

la sélectivité de MIP issus de différentes conditions de synthèse dans un format conventionnel. Ainsi, la synthèse du MIP par une polymérisation en bloc a été optimisée et un support sélectif pour la cocaïne a été obtenu et caractérisé. Ce MIP a permis l'extraction sélective de la cocaïne de milieux biologiques tels que des extraits de cheveux, du plasma ou même de l'urine. Une excellente sélectivité a aussi été obtenue en milieu organique pour les deux métabolites principaux, mais la BZE n'a présenté aucune rétention dans l'eau et l'EME n'a pas été retenue lors de la percolation d'échantillons de plasma ou d'urine. Finalement, l'introduction d'une étape préalable d'extraction liquide-liquide avant l'extraction sur MIP a permis d'analyser quantitativement la teneur de la cocaïne et ses deux métabolites dans l'urine. Il s'agit d'une solution permettant de pallier le problème de l'application des MIP en milieu aqueux.

Compte tenu de la sélectivité des MIP en format conventionnel, leur miniaturisation a été évaluée. Pour la première approche consistant à intégrer des particules sphériques de MIP dans une puce, la polymérisation par précipitation a été utilisée. Malheureusement, le succès de ce type de synthèse dépend principalement de la molécule empreinte utilisée, et dans le cas de la cocaïne, il n'a pas été possible de former des particules d'une taille convenable ($>3 \mu\text{m}$) tout en conservant une bonne sélectivité du MIP. Malgré cet échec pour la synthèse de particules de MIP par précipitation, un grand nombre de paramètres ont été étudiés, permettant de mieux comprendre le mécanisme de polymérisation et ses paramètres clés. Les connaissances acquises, ainsi que des travaux antérieurs du laboratoire, ont par la suite permis d'étudier une deuxième approche consistant à la synthèse d'un monolithe de MIP in situ dans des capillaires de $100 \mu\text{m}$ de diamètre interne. Une optimisation de synthèse a été nécessaire pour l'obtention de monolithes avec des morphologies adéquates. Ayant fixé les conditions de synthèse, il a finalement été possible d'obtenir des capillaires de MIP sélectifs pour la cocaïne et dont la synthèse est répétable en termes de morphologie et de sélectivité. Enfin, il a été possible de réaliser un couplage de l'extraction sur MIP en format capillaire avec la nanoLC. Une étude plus approfondie de ce couplage s'avère nécessaire et n'a pas été effectuée par manque de temps. Cependant, les premiers résultats pour l'analyse d'échantillons urinaires dopés sont très encourageants.

La présente étude a donc montré la faisabilité d'une synthèse de MIP en format miniaturisé. D'autres modes de synthèse de particules, notamment la synthèse en suspension, pourraient être envisagés avec l'avantage par ce travail d'avoir acquis des connaissances sur la synthèse en bloc, par précipitation et in situ dans des capillaires. Cependant, la synthèse de monolithes de MIP in situ dans des capillaires présente l'intérêt d'être transposable à des microsystèmes. Des optimisations seront néanmoins à prévoir, notamment pour le traitement de la surface des canaux du microsysteme et pour le type d'initiation à utiliser.

Abbréviations :

ADN – acide désoxyribonucléique
AEME - anhydroecgonine méthylester
AIBN - 2,2'-azobis(isobutyronitrile)
APCI – ionisation chimique à pression atmosphérique
APPI – photo-ionisation à pression atmosphérique
AR – agent réticulant
ARN – acide ribonucléique
BDDA – 1,4-butane diylodiacrylate
Boc-L-Phe – N-(tert-butoxycarbonyl)-L-phénylalanine
BZE - benzoylecgonine
CE - électrophorèse capillaire
CFME – *continuous flow microextraction*
COC - cocaïne
COC - copolymère d'oléfines cycliques (uniquement en partie I.3)
COCAE - cocaéthylène
COMOSS – *Collocated Monolith Support Structures*
CV – coefficient de variation
C18 – octadécyl
C6 - hexyle
C8 - octyle
DART – *direct analysis in real time*
DEM – 2-(diéthylamino)éthyl méthacrylate
DI-SDME – *direct immersion single drop microextraction*
DLLME – *dispersive liquide liquid microextraction*
DMF - diméthylformamide
DPPH – hydrate de 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle
DVB - divinylbenzène
ECG - ecgonine
EGDMA - éthylène glycol diméthacrylate
EME – ecgonine méthylester
ESI – ionisation par électrospray
FID – détecteur par ionisation de flamme
FTIR – spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
GC – chromatographie en phase gazeuse
HAP – hydrocarbure aromatique polycyclique
mHBZE – méta-hydroxybenzoylecgonine
pHBZE – para-hydroxybenzoylecgonine
HF-LPME – *hollow fiber liquid phase microextraction*
HILIC - chromatographie à interactions hydrophiles
HMDPA – acrylate de 4-(hydroxyméthyl)-2,5-diphénoxazole
HPLC - chromatographie en phase liquide à haute performance
HS-SDME – *headspace single drop microextraction*
IF – facteur d'impression
IS - immunoabsorbant
K_a – constante d'acidité
k_{NIP} ou k_{MIP} – facteur de rétention sur le NIP ou le MIP

LC – chromatographie liquide
 LIF - détecteur à fluorescence induite par laser
 LLE - extraction liquide-liquide
 LDD – limite de détection
 LDQ – limite de quantification
 LPS – support à particules de grande dimension
 LSABM – laboratoire de sciences analytiques, bioanalytiques et miniaturisation
 MAA - acide méthacrylique
 MASE – *membrane assisted solvent extraction*
 MC – molécule cible
 MEB – microscope électronique à balayage
 MeCN - acétonitrile
 MeOH - méthanol
 γ -MAPS - γ -méthacryloxypropyl triméthoxysilane
 MEPS – *microextraction by packed sorbent*
 méthyleCG - méthylecgonine
 MF – monomère fonctionnel
 MIP – polymère à empreintes moléculaires
 MS – spectromètre de masse
 MRM – *multiple reaction monitoring*
 n.m. – non mentionné
 nanoLC – nanochromatographie liquide
 NIP – polymère non imprimé
 NPA – acrylate de 4-nitrophényle
 NORBENZ - norbenzoylecgonine
 NORCOC - norcoïcaine
 NORCOCAE - norcoïcathylène
 NPD – détecteur thermoionique à azote/phosphore
 OS – oligoadsorbant
 PA - polyacrylate
 PEEK – Polyétheréthercétone
 PD-HID – détecteur d'ionisation d'hélium par décharge pulsée
 PDMS - polydiméthylsiloxane
 pI – point isoélectrique
 P_{oct} – coefficient de partage octanol/eau
 PS-DVB – copolymère polystyrène divinylbenzène
 PTFE - polytétrafluoroéthylène
 Q – quadripôle
 QqQ – triple quadripôle
 RAM – phase à accès restreint
 RMN –résonance magnétique nucléaire
 SBSE – *stir bar sorptive extraction*
 SD – écart type
 SDME – *single drop microextraction*
 SELEX – *systematic evolution of ligands by exponential enrichment*
 SIM – *single ion monitoring*
 S/B – signal sur bruit
 SPDE – *solid phase dynamic extraction*
 SPE – extraction sur phase solide
 SPME – microextraction sur phase solide

SRM – *single reaction monitoring*
T_{amb} – température ambiante
TAS – *total analysis system*
μTAS – *micro total analysis system*
TFMAA – acide trifluorométhylacrylique
THF - tétrahydrofurane
TOF – analyseur à temps de vol
TRIM - triméthylolpropanetriméthacrylate
UHPLC - chromatographie en phase liquide à ultra haute performance
USA – Etats-Unis d'Amérique
UV – ultraviolet
2-VP – 2-vinylpyridine
4-VP – 4-vinylpyridine
V₀ – volume mort
V_f – volume de fin de fixation
V_{flush} – volume de transfert ou volume de *flush*
V_{inj} – volume d'injection

Annexes

Annexe 1 : Paramètres optimisés pour la trappe ionique

L'optimisation des paramètres de détection de la trappe ionique (1100 LC/MSD Trap SL, *Agilent*) se fait par une infusion directe de cette solution dans la source d'ionisation. Une puce spécialement dédiée aux calibrations de la masse ainsi qu'à l'infusion de solutions directement dans la chambre d'ionisation est livrée avec l'interface « chip cube ». Cette puce est tout simplement formée d'un canal vide connecté à un des ports de la vanne six voies du « chip cube » qui n'est pas normalement utilisé lors de l'application de méthodes d'analyse. Il est donc possible de faire l'optimisation des paramètres de masse directement avec la puce.

Pour former un spray, une seringue contenant une solution de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de cocaïne et de BZE dans 80 % de tampon formate d'ammonium et 20 % de MeCN, a été placée sur un pouce seringue et connectée à un capillaire de transfert vers le canal de la puce de calibration. Le débit est alors fixé à $0,3 \mu\text{L.min}^{-1}$ pour former un spray dans la chambre d'ionisation avec un gaz séchant à 3L.min^{-1} et à une température de 300°C . Le premier paramètre testé est la tension de capillaire nécessaire pour former un spray. En effet, cette tension a été variée de 1500 V à 1900 V, et la forme du spray a été observée sur l'écran correspondant. Un spray stable est formé à 1750 V, donc cette valeur a été fixée pour la suite de l'étude. Le reste des paramètres ont été optimisés avec le programme de contrôle de la trappe ionique (LC/MS Trap Software version 5.3, *Bruker pour Agilent*). Les différents paramètres étudiés et leurs valeurs optimales sont présentés dans le tableau A1-1

Paramètre	Cocaïne	Benzoylcgonine
Skimmer	40 V	40 V
Cap Exit	213,93 V	226,23 V
Oct 1DV	8,30 V	8,60 V
Oct 2DC	0,41 V	1,00 V
Trap Drive	30,53 V	36,64 V
Oct RF	108,9 V	111,48 V
Lens 1	- 5,00 V	- 3,66 V
Lens 2	- 69,02 V	- 46,89 V

Tableau A1- 1 : Paramètres optimisés pour la détection de la cocaïne et la BZE sur la trappe ionique.

Annexe 2 : Méthodes d'analyse utilisées dans ces travaux

Trois détecteurs ont été utilisés pour ce travail : une trappe ionique (1100 LC/MSD Trap SL, Agilent), un triple quadripôle (6410 TripleQuad LC/MS, Agilent) et un détecteur UV à barrette de diodes ou DAD (DAD SL, Agilent).

Pour les méthodes effectuées sur puce, deux pompes ont été utilisées dont une pompe nano (1200 Nano Pump, Agilent) et une pompe capillaire (1200 Cap Pump, Agilent). Pour les méthodes LC-MS conventionnelles, seule la pompe nano en mode normal a été utilisée. Dans tous les cas un injecteur automatique thermostaté à 4°C pour préserver les échantillons biologiques, a été utilisé lors de la détection par spectrométrie de masses (1200 MicroWPS et 1200 FC/ALS Therm, Agilent).

Pour la méthode LC-UV, une pompe binaire classique a été utilisée (Bin Pump SL, Agilent) et un injecteur automatique non thermostaté (1200 ALS/SL, Agilent).

Méthodes pour la LC-MS sur puce (chapitre II)

Dans cette annexe sont décrits tous les détails concernant les méthodes évaluées dans le chapitre II.

Méthode 1 :

Pompe de chargement : 4 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 100% eau $V_{\text{injection}} = 1 \mu\text{L}$ $V_{\text{flush}} = 5 \mu\text{L}$

Analyseur de masses : trappe ionique

Phase stationnaire : puce 40nL (Tableau II- 1)

Phase mobile : tampon formate d'ammonium 5mM pH = 3,5 (A) et MeCN (B)

Gradient à 0,3 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$:

Temps (minutes)	0	1	7
% B	10	10	30

$t_{\text{R(COC)}} = 1,7 \text{ min}$ $t_{\text{R(BZE)}} = 5,3 \text{ min}$

$\text{LDQ}_{\text{(COC)}} = 17 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ et $\text{LDQ}_{\text{(BZE)}} = 16\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$

Méthode 2 :

Pompe de chargement : 4 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 90% eau 10% MeCN

$V_{\text{injection}} = 1 \mu\text{L}$ $V_{\text{flush}} = 5 \mu\text{L}$

Analyseur de masses : trappe ionique

Phase stationnaire : puce 500nL (Tableau II- 1)

Phase mobile : tampon formate d'ammonium 5mM pH = 3,5 (A) et MeCN (B)

Gradient à 0,4 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$:

Temps (minutes)	0	5	9
% B	30	50	50

$t_{R(\text{COC})} = 2,5 \text{ min}$ $t_{R(\text{BZE})} = 3,1 \text{ min}$

$\text{LDQ}_{(\text{COC})} = 15 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ et $\text{LDQ}_{(\text{BZE})} = 2 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$

Méthode 3 :

Pompe de chargement : 4 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 90% eau 10% MeCN

$V_{\text{injection}} = 1 \mu\text{L}$ $V_{\text{flush}} = 5 \mu\text{L}$

Analyseur de masses : trappe ionique

Phase stationnaire : puce 500nL (Tableau II- 1)

Phase mobile : eau avec 0,1 % de HCOOH (A) et MeCN avec 0,1 % de HCOOH (B)

Gradient à 0,4 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$:

Temps (minutes)	0	5	9
% B	30	50	50

$t_{R(\text{COC})} = 2,8 \text{ min}$ $t_{R(\text{BZE})} = 2,5 \text{ min}$

$\text{LDQ}_{(\text{COC})} = 6,1 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ et $\text{LDQ}_{(\text{BZE})} = 2,7 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$

Méthode 4 :

Pompe de chargement : 4 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 90% eau 10% MeCN

$V_{\text{injection}} = 1 \mu\text{L}$ $V_{\text{flush}} = 5 \mu\text{L}$

Analyseur de masses : trappe ionique

Phase stationnaire : puce 500nL (Tableau II- 1)

Phase mobile : eau avec 0,1 % de HCOOH (A) et MeCN avec 0,1 % de HCOOH (B)

Gradient à 0,4 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$:

Temps (minutes)	0	7	8	10
% B	15	50	80	80

$t_{R(\text{COC})}=5,2\text{min}$ $t_{R(\text{BZE})}=3,7\text{min}$ $\text{LDQ}_{(\text{COC})}=13\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ et $\text{LDQ}_{(\text{BZE})}=7\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$

Méthode 5 :

Pompe de chargement : 4 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 90% eau 10% MeCN

$V_{\text{injection}} = 2 \mu\text{L}$ $V_{\text{flush}} = 5 \mu\text{L}$

Analyseur de masses : trappe ionique

Phase stationnaire : puce 500nL (Tableau II- 1)

Phase mobile : eau avec 0,1 % de HCOOH (A) et MeCN avec 0,1 % de HCOOH (B)

Gradient à 0,4 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$:

Temps (minutes)	0	7	8	10
% B	15	50	80	80

$t_{R(\text{COC})} = 5,2 \text{ min}$ $t_{R(\text{BZE})} = 3,7 \text{ min}$

$\text{LDQ}_{(\text{COC})} = 7 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ et $\text{LDQ}_{(\text{BZE})} = 4 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$

Méthode 6 :

Pompe de chargement : 4 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 90% eau 10% MeCN

$V_{\text{injection}} = 2 \mu\text{L}$ $V_{\text{flush}} = 5 \mu\text{L}$

Analyseur de masses : triple quadripôle

Phase stationnaire : puce 500nL (Tableau II- 1)

Phase mobile : eau avec 0,1 % de HCOOH (A) et MeCN avec 0,1 % de HCOOH (B)

Gradient à 0,4 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$:

Temps (minutes)	0	7	8	10
% B	15	50	80	80

$t_{R(\text{COC})} = 5,2 \text{ min}$ $t_{R(\text{BZE})} = 3,7 \text{ min}$

$\text{LDQ}_{(\text{COC})} = 30 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ et $\text{LDQ}_{(\text{BZE})} = 5 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$

Méthode 7 :

Pompe de chargement : 4 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 90% eau 10% MeCN

$V_{\text{injection}} = 2 \mu\text{L}$ $V_{\text{flush}} = 6 \mu\text{L}$

Analyseur de masses : triple quadripôle

Phase stationnaire : puce 500nL (Tableau II- 1)

Phase mobile : eau avec 0,1 % de HCOOH (A) et MeCN avec 0,1 % de HCOOH (B)

Gradient à 0,4 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$:

Temps (minutes)	0	4,5	11,5	13,5
% B	5	5	80	80

$t_{R(\text{COC})} = 8,5 \text{ min}$ $t_{R(\text{BZE})} = 5,8 \text{ min}$

$\text{LDQ}_{(\text{COC})} = 31 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ et $\text{LDQ}_{(\text{BZE})} = 22 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$

Méthode isocratique :

Pompe de chargement : 4 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, 90% eau 10% MeCN

$V_{\text{injection}} = 2 \mu\text{L}$ $V_{\text{flush}} = 5 \mu\text{L}$

Analyseur de masses : triple quadripôle

Phase stationnaire : puce 500nL (Tableau II- 1)

Phase mobile : 70 % eau (0,1 % de HCOOH) et 30 % MeCN (0,1 % de HCOOH)

Débit = 0,4 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$

$t_{R(\text{COC})} = 3,8 \text{ min}$ $t_{R(\text{BZE})} = 3,8 \text{ min}$

$\text{LDQ}_{(\text{COC})} = 3 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ et $\text{LDQ}_{(\text{BZE})} = 3 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$

Méthode LC-MS conventionnelle :

$V_{\text{injection}} = 5 \mu\text{L}$

Analyseur de masses : triple quadripôle

Phase stationnaire : Colonne Zorbax C18 (150mmx2,1mm d.i., 5 μm)

Phase mobile : 70 % eau (0,1 % de HCOOH) et 30 % MeCN (0,1 % de HCOOH)

Débit = 0,2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$

$t_{R(\text{COC})} = 2,5 \text{ min}$ $t_{R(\text{BZE})} = 1,95 \text{ min}$

$\text{LDQ}_{(\text{COC})} = 47 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ et $\text{LDQ}_{(\text{BZE})} = 62 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$

**Méthodes pour l'analyse par LC/UV et la LC/MS conventionnelles
(chapitre III)**

Méthode LC-UV conventionnelle :Vinjection = 20 μL

Détecteur DAD à 233 nm

Phase stationnaire : Colonne Symmetry Shield RP18 (150 mm x 2,1 mm d.i., 3,5 μm)

Phase mobile : tampon formate d'ammonium 5mM pH = 3,2 (A) et MeCN (B)

Gradient à 0,2 mL.min⁻¹ :

Temps (minutes)	0	2	6	7	9	10	23
% B	17	20	20	80	80	17	17

Température de la colonne : 35°C

 $t_{R(\text{COC})} = 5,8 \text{ min}$ $t_{R(\text{BZE})} = 4,7 \text{ min}$ $\text{LDQ}_{(\text{COC})} = 10 \text{ ng.mL}^{-1}$ et $\text{LDQ}_{(\text{BZE})} = 7 \text{ ng.mL}^{-1}$ Méthode LC-MS Symmetry ShieldVinjection = 5 μL

Analyseur de masses : triple quadripôle

Phase stationnaire : Colonne Symmetry Shield RP18 (150 mm x 2,1 mm d.i., 3,5 μm)

Phase mobile : eau avec 0,1 % de HCOOH (A) et MeCN avec 0,1 % de HCOOH (B)

Gradient à 0,2 mL.min⁻¹ :

Temps (minutes)	0	1,5	3	8	10	11	13	20
% B	0	50	15	15	80	80	0	0

 $t_{R(\text{COC})} = 9,7 \text{ min}$ $t_{R(\text{BZE})} = 10,6 \text{ min}$ $t_{R(\text{EME})} = 1,6 \text{ min}$ $\text{LDQ}_{(\text{COC})} = 0,08 \text{ ng.mL}^{-1}$ $\text{LDQ}_{(\text{BZE})} = 0,20 \text{ ng.mL}^{-1}$ $\text{LDQ}_{(\text{EME})} = 0,53 \text{ ng.mL}^{-1}$

Annexe 3 : Etude des volumes morts des puces utilisées

La détermination des volumes des canaux des puces utilisées n'est pas évidente et les valeurs données par le fournisseur sont incohérentes. Le tableau A3-1 présente les dimensions et les différents volumes calculés ou annoncés par le fournisseur pour chacun des 2 canaux des puces.

Capacité du canal d'enrichissement (nL)	40	160	500
Longueur du canal d'enrichissement (mm)	4	9	25
Largeur calculée du canal d'enrichissement (μm)	130	237	267
Dimensions du canal de séparation (mm x μm x μm)	43 x 75 x 75	150 x 75 x 75	150 x 75 x 75
Volume mort du canal de séparation donné par Agilent (nL)	160	660	160
Volume géométrique du canal de séparation (nL)	410	840	840
Volume mort du canal de séparation calculé pour une porosité de 0,8 (nL)	328	672	672
Volume mort calculé du canal de séparation (nL)	32	128	400

Tableau A3- 1 : Résumé des dimensions et volumes de canaux d'enrichissement et de séparation des trois puces utilisées pour ce travail

Le calcul de la largeur du canal d'enrichissement a été effectuée en considérant qu'il s'agit d'un canal droit de forme rectangulaire avec une profondeur de 75 μm . Le calcul du volume géométrique du canal de séparation a été effectué en considérant que ce canal est droit et a une forme carrée. Les volumes morts calculés correspondent à une porosité de 0,8 pour les deux canaux. Dans le cas du canal d'enrichissement, ce volume a été calculé en considérant que le volume annoncé nommé capacité par Agilent soit le volume géométrique de la colonne. Dans le cas du canal d'enrichissement, comme le volume géométrique a été calculé, il a été utilisé directement pour déterminer le volume mort en le multipliant par une porosité hypothétique de 0,8.

Une incohérence est observée pour le volume mort du canal de séparation donnée par Agilent pour la puce de 500 nL de capacité. En effet, ses dimensions sont les mêmes que celles du canal de la puce de 160 nL de capacité, mais le volume mort annoncé est celui de la puce de 40 nL dont la longueur est inférieure. Il doit certainement s'agir d'une erreur d'impression de la fiche de données de la puce. Le calcul du volume mort du canal de séparation effectué pour une porosité hypothétique de 0,8 est assez proche de 660 nL, donc il semblerait que ce soit effectivement ce volume qui correspond mieux au volume mort du canal de séparation. Si le volume mort du canal de séparation était vraiment de 160 nL alors il serait plus faible que le volume mort du canal d'enrichissement et il n'y aurait pas de pics observés.

En ce qui concerne le canal d'enrichissement, Agilent annonce une capacité et cite ce volume comme s'il s'agissait du volume mort, or si c'était vraiment le cas alors le volume mort du canal d'enrichissement serait quasiment le même que celui du canal de séparation et les pics seraient très larges ou même inexistantes. Considérant les résultats obtenus pour la puce de 500 nL, on peut penser que ce volume est en effet le volume géométrique du canal d'enrichissement et pas son volume mort.

Annexe 4 : Préparation de différents échantillons biologiques

Échantillons de cheveux :

Décontamination

Décontaminer les cheveux avant l'extraction (mèche de 2 cm, 10-20 g), pour cela, il faut placer les cheveux dans un flacon qui permette l'agitation par un agitateur rotatif.

Par la suite, réaliser trois lavages successifs :

1^{er} bain : eau, agitation mécanique horizontale ou agitateur rotatif 5min.

2^{ème} bain : eau / MeOH 50/50, agitation mécanique horizontale ou agitateur rotatif 5min.

3^{ème} bain : dichlorométhane, agitation mécanique horizontale ou agitateur rotatif 5min.

Entre chaque lavage, déposer les cheveux sur du papier filtre au-dessus d'un erlenmeyer.

Séchage

Placer les cheveux dans une boîte à Pétri et les mettre dans l'étuve à 50°C pendant deux heures. Garder les cheveux secs dans un pot plastique à vis de capacité de 30 mL. À la fin de cette étape on peut garder les cheveux préparés dans le réfrigérateur à 4°C.

Découpage

En mettant des gants et à l'aide de ciseaux bien propres, donc nettoyés au MeOH, découper très finement (1-2 mm) les cheveux et les garder dans un flacon en verre. Pour ce découpage, il convient de placer une mèche de cheveux dans un flacon et d'y introduire les ciseaux pour faire le découpage dans le flacon et diminuer les pertes d'échantillon.

À la fin de cette étape on peut garder les cheveux préparés à température ambiante dans un endroit sec et sombre.

Pesée

Peser 50 mg de cheveux dans un flacon en verre. Ajouter 2 mL de MeCN et fermer le flacon.

Extraction

Extraire aux ultrasons pendant 2h tout en vérifiant la température du bain pour éviter qu'elle aille au-delà de 40°C. Pour ce faire, un bain d'ultrasons thermostaté a été utilisé avec un réfrigérant pour éviter de surchauffer le bain par les ultrasons.

Laisser sédimenter les cheveux puis récupérer le surnageant à l'aide d'une seringue de 1mL avec aiguille. C'est le surnageant qui sera analysé.

Échantillons de sérum

Pour la préparation d'échantillons de sérum, le pH a tout d'abord été ajusté par l'ajout d'acide chlorhydrique $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ et/ou de soude $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$. Pour mesurer le pH résultant, du papier pH a été utilisé car un pHmètre aurait pu être abîmé par la présence des protéines de l'échantillon. La force ionique de l'échantillon résultant n'a pas été contrôlée. Ensuite, la précipitation des protéines est effectuée par l'ajout de MeCN de façon à avoir une solution avec 50 % de MeCN. Le sérum avec le MeCN est par la suite agité au vortex pendant 1 minute, puis centrifugé pendant 5 minutes à 6000 g et 4°C . Le surnageant est alors récupéré pour son analyse.

Échantillons urinaires

Préparation de la solution de tampon phosphate salin (PBS) $0,25 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH = 7,4): solubilisation activée sous ultrasons de 1,701g de KH_2PO_4 , de 2,177 g de K_2HPO_4 et de 14,6 g de NaCl dans 50 mL d'eau ultra-pure.

Les échantillons urinaires ont été préparés en fonction de leur facteur de dilution. Par exemple, dans le cas d'une dilution de 1/50, 1 mL d'urine a été introduit dans une fiole jaugée de 50 mL, puis 1 mL du tampon phosphate salin à $0,25 \text{ mol.L}^{-1}$ a été ajouté ainsi que la cocaïne, BZE et EME, pour les solutions dopées. La solution a ensuite été complétée avec de l'eau jusqu'au trait de jauge.

Annexe 5 : Protocole de synthèse en bloc

Polymérisation :

Suite au calcul des quantités requises de chacun des réactifs (calcul de volumes), la synthèse a été effectuée de la façon qui suit :

- 1) Mélange de la molécule empreinte, le monomère fonctionnel et le solvant porogène dans un flacon en verre de 7 mL. On ferme le flacon, on agite et on garde au réfrigérateur pendant 1 heure.
- 2) Ajout de l'agent réticulant et de l'initiateur dans le flacon plongé dans un bain de glace.
- 3) Transvasement dans un tube à sceller à l'aide d'une pipette Pasteur en verre, puis dégazage sous flux d'azote pendant 20 minutes avec le tube dans un bain de glace.
- 4) Le tube à sceller est bouché avec du parafilm pour faire la polymérisation. Lors de la polymérisation par voie thermique, le tube est tout simplement plongé dans un bain thermostaté et maintenu à la température souhaitée pendant 24 heures. Dans le cas de l'initiation photochimique, la lampe UV (TQ 150, 150 W, *Heraeus*, Hanau, Allemagne) est allumée une heure avant la synthèse ainsi que le bain thermostaté. Le tube est introduit dans la chambre de polymérisation, protégée par une boîte couverte d'aluminium, et pendant les premières 15 minutes de la réaction, le tube, immergé dans le bain thermostaté, est tourné d'un quart de tour toutes les 30 secondes. Ensuite le tube est fixé avec la lampe allumée pendant 24 heures.

Broyage, tamisage et sédimentation :

Une fois la réaction de polymérisation complétée, les tubes sont cassés et le bloc de polymère est récupéré pour son broyage et son tamisage.

Le broyage s'effectue avec un broyeur automatique (broyeur vibrant AS200, *Retsch*) avec trois billes d'acier recouvertes de téflon, utilisé à une fréquence de 20 Hz pendant 10 secondes. Plusieurs cycles de broyage de 10 secondes sont possibles. En effet, il a fallu observer l'allure du polymère à la fin de chaque étape pour vérifier que le polymère ne forme plus de grosses particules en évitant tout de même de trop broyer. Le nombre de cycles dépend de la composition du polymère.

Après le broyage, le tamisage a été effectué avec une tamiseuse automatique (tamiseuse AS200 control, *Retsch*). La poudre obtenue après le broyage a donc été placée sur un premier tamis de 36 μm , lui-même posé sur un tamis de 25 μm . Des cycles de tamisage de 30 minutes à une amplitude de 3,5 g ont été effectués. Entre chaque cycle, les tamis ont été retirés de l'appareil, et du MeCN a été utilisé pour favoriser le passage des particules d'un tamis à l'autre. Après séchage à l'air ambiant du MeCN, la fraction de polymère entre les deux tamis,

donc avec des tailles de particule p entre 25 μm et 36 μm , a été récupérée avant le cycle de tamisage suivant. Environ 3 cycles de tamisage ont été nécessaires pour chaque polymère.

Finalement, pour éliminer les particules les plus fines qui auraient pu rester coincées dans la fraction de polymère récupérée, une sédimentation a été effectuée. Pour ce faire, la fraction de particules de polymère sélectionnée a été introduite dans un flacon de 50 mL puis une solution de MeOH/eau 80/20 a été ajoutée jusqu'au remplissage du flacon. La solution a été agitée puis elle est restée au repos pendant 20 minutes. Le surnageant a été par la suite éliminé. Cette procédure a été répétée jusqu'à avoir un surnageant sans particules suspendues apparentes après le repos de 20 minutes. Environ 3 cycles de sédimentation ont été nécessaires pour toutes les synthèses. Finalement, le polymère ainsi obtenu a été séché sous flux d'azote.

Préparation des cartouches

Pour la préparation des cartouches d'extraction, le polymère a été pesé puis introduit dans des cartouches en polypropylène de 1 mL contenant un fritté de 20 μm de taille de pore. De le MeCN a été versé par la suite dans les cartouches pour tasser la poudre de polymère puis un deuxième fritté a été introduit dans la cartouche jusqu'au niveau de la poudre de polymère sans appliquer de la pression.

Annexe 6 : Protocoles d'extraction liquide liquide

Pour cette étude, le pH de l'échantillon urine a tout d'abord été ajusté à pH = 9 avec un tampon borate, puis la LLE a été réalisée avec les différentes méthodes étudiées. Les deux phases ont été mises en contact et l'extraction a été réalisée à l'aide d'une agitation par un vortex pendant 2 minutes. Après la centrifugation de l'échantillon, la phase aqueuse a été éliminée et la phase organique a été évaporée sous flux d'azote à température ambiante. Solution tampon borate 250 mmol.L⁻¹ pH = 9 : Dans un bécher, ajouter 2,38 g de tétraborate de sodium décahydraté (ou Borax : Na₂B₄O₇.10H₂O), 0,38 g d'acide borique (H₃BO₃) et environ 40 mL d'eau ultra-pure. Ajuster le pH avec une solution de soude (NaOH) à 0,1 mol.L⁻¹ puis transvaser à une fiole jaugée de 50 mL et jauger avec de l'eau.

Protocole d'extraction 1 (basé sur [207]) :

Mélange de 50 µL de la solution à extraire (eau ou urine dopées) à 100 µL de tampon borate 250 mmol.L⁻¹ pH = 9 et 1,2 mL d'un mélange chloroforme : isopropanol 9 :1. Agitation au vortex pendant 2 minutes, puis centrifugation 5 minutes à 1100 g. La phase aqueuse est éliminée (phase supérieure) et la phase organique est récupérée et évaporée sous flux d'azote. Reprise de la phase organique pendant 1,5 minutes au vortex avec 200 µL d'eau.

Ce protocole a par la suite été adapté pour la LLE suivie de l'extraction par MIP, pour cette application, le protocole a été le suivant : agitation au vortex pendant 2 minutes de 0,5 mL d'échantillon (eau ou urine) avec 1 mL de tampon borate pH = 9 et 10 mL de chloroforme : isopropanol 9 :1. Centrifugation 5 minutes à 1100 g. Récupération de la phase organique et évaporation totale sous flux d'azote. Reprise avec 3 mL de MeCN pendant 1,5 minutes au vortex.

Protocole d'extraction 2 (basé sur [62]) :

Mélange de 50 µL de la solution à extraire (eau ou urine dopées) à 100 µL de tampon borate 250 mmol.L⁻¹ pH = 9 et 1 mL d'un mélange chloroforme / isopropanol 60/40 v/v. Agitation au vortex pendant 2 minutes, puis centrifugation 5 minutes à 1100 g. La phase aqueuse est éliminée (phase supérieure) et la phase organique est récupérée et évaporée sous flux d'azote. Reprise de la phase organique pendant 1,5 minutes au vortex avec 200 µL d'eau.

Protocole d'extraction 3 (basé sur [92]) :

Mélange de 50 µL de la solution à extraire (eau ou urine dopées) à 100 µL de tampon borate 250 mmol.L⁻¹ pH = 9 et 1 mL d'un mélange chloroforme / éthanol 87,5/12,5 v/v. Agitation au vortex pendant 2 minutes, puis centrifugation 5 minutes à 1100 g. La phase aqueuse est

éliminée (phase supérieure) et la phase organique est récupérée et évaporée sous flux d'azote. Reprise de la phase organique pendant 1,5 minutes au vortex avec 200 μL d'eau.

Protocole d'extraction 4 (basé sur [14]) :

Mélange de 100 μL de la solution à extraire (eau ou urine dopées) à 50 μL de tampon borate 250 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH = 9. Agitation pendant 30 secondes au vortex puis ajout de 750 μL d'acétate d'éthyle. Agitation au vortex pendant 2 minutes, puis centrifugation 5 minutes à 1100 g. La phase aqueuse est éliminée (phase supérieure) et la phase organique est récupérée et évaporée sous flux d'azote. Reprise de la phase organique pendant 1,5 minutes au vortex avec 200 μL d'eau.

Annexe 7 : Protocole de synthèse d'un MIP par précipitation

Polymérisation :

Suite au calcul des quantités requises de chacun des réactifs (calcul de volumes), la synthèse a été effectuée de la façon qui suit :

- 1) Mélange de la molécule empreinte, le monomère fonctionnel et le solvant porogène dans un ballon avec un agitateur magnétique. On ferme le ballon avec un septum, on agite et on garde au réfrigérateur pendant 1 heure.
- 2) Ajout de l'agent réticulant et de l'initiateur dans le ballon plongé dans un bain de glace.
- 3) Dégazage sous flux d'azote pendant 20 minutes. Pour ce faire, le septum est percé par une seringue connectée à une ligne d'azote et aussi avec une aiguille de seringue pour dégager l'air du ballon. Pour cette étape le ballon est donc fermé par un septum et placé dans un bain de glace.
- 4) Le ballon est par la suite placé dans un bain d'huile thermostaté muni d'une agitation magnétique. La polymérisation a lieu pendant 24 heures puis le ballon est sorti du bain thermostaté.
- 5) Les particules ainsi obtenues sont récupérées par filtration sous vide avec des membranes en nylon de 0,2 μm de taille de pore. Les particules sont par la suite lavées avec 40 mL de MeCN puis séchées sous flux d'azote pour leur étude.

Annexe 8 : Utilisation du microscope électronique à balayage

Principe

La microscopie électronique à balayage (MEB ou SEM pour *Scanning Electron Microscopy*) est une technique de microscopie basée sur le principe des interactions électrons-matière. La Figure A7 - 1 montre une photo du MEB utilisé dans cette étude (Hitachi S-3600 N) ainsi que le schéma de principe d'un MEB.

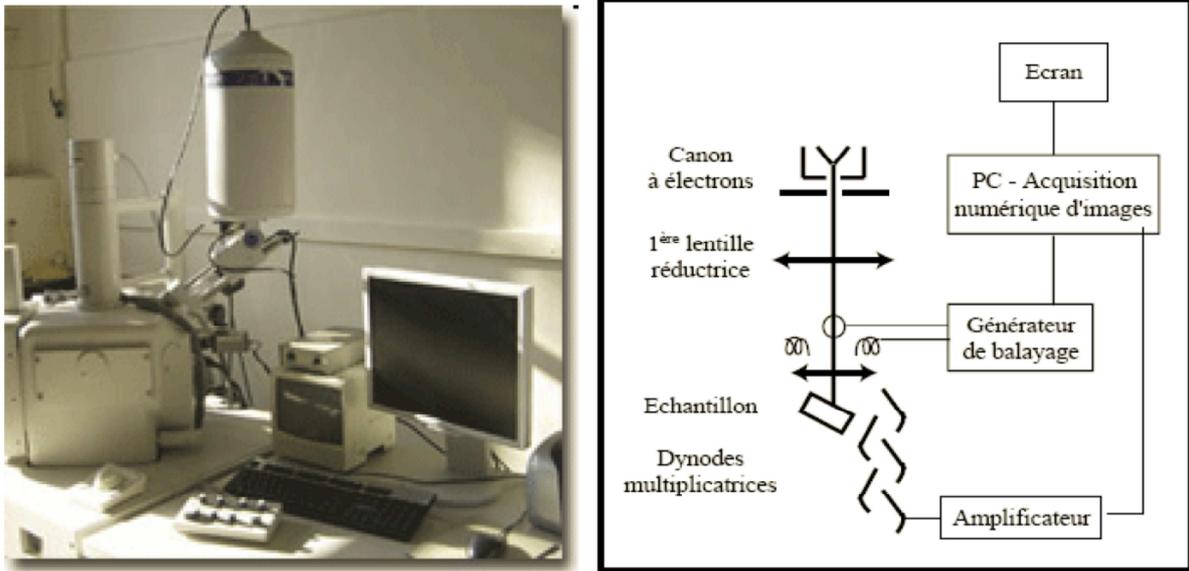


Figure A7 - 1 : Photographie et schéma de principe du microscope électronique à balayage utilisé pour ce travail

Un faisceau d'électrons est projeté sur l'échantillon à analyser. L'interaction entre les électrons et l'échantillon génère des électrons secondaires, de basse énergie qui sont accélérés vers un détecteur d'électrons secondaires qui amplifie le signal. À chaque point d'impact correspond ainsi un signal électrique. L'intensité de ce signal électrique dépend à la fois de la nature de l'échantillon au point d'impact qui détermine le rendement en électrons secondaires, et de la topographie de l'échantillon au point considéré. Il est ainsi possible, en balayant le faisceau sur l'échantillon, d'obtenir une cartographie de la zone balayée. Dans la pratique, les MEB actuels permettent d'atteindre une résolution de l'ordre de 20 nm et un grossissement qui peut aller jusqu'à $30 \cdot 10^4$.

Les observations MEB reproduites dans ce rapport ont été réalisées au Laboratoire Colloïdes et Matériaux Divisés avec l'aide de M. Patrice Legeay. L'appareil utilisé dans le cadre de notre étude est le MEB S-3600 N (Hitachi). La résolution maximale est de 3 nm à 25 kV. La tension d'accélération peut varier de 0,3 kV à 30 kV. La gamme de grossissement varie entre 12 x et $30 \cdot 10^4$ x.

Préparation des échantillons

La qualité des images obtenues au MEB dépend de la qualité de l'échantillon analysé. Celui-ci doit être absolument propre, de dimension inférieure au centimètre et surtout, il doit

être conducteur afin de pouvoir évacuer les électrons. Les polymères organiques n'étant pas conducteurs, une mince couche d'or y a été déposée avant l'obtention des images sur le MEB. Pour ce faire, un appareil de métallisation avec de l'or a été utilisé (Appareil Polaron 550). En effet, le polymère (particules ou capillaires) est déposé sur une pastille de carbone adhésive ($d = 7 \text{ mm}$), elle-même collée à un support métallique. Le tout est par la suite introduit dans l'appareil de métallisation où un plasma est généré en présence d'argon et d'or dans une chambre sous vide. Le dépôt est effectué pendant 2 minutes pour déposer une couche d'or d'environ 2,5 nm d'épaisseur.

Ajustements de l'image et capture des photographies

Une fois l'échantillon placé sur la platine du MEB, le système est refermé en mode « High Vacuum ». Par la suite, la platine où est déposé l'échantillon métallisé est déplacée de façon à rapprocher l'échantillon à 5 mm du canon à électrons. Dans le cas de l'analyse de capillaires, la disposition change car il est nécessaire d'appliquer un angle d'inclinaison à la platine. Avant de lancer le voltage, il est nécessaire de vérifier que le diaphragme soit sur 3, ou dans le cas de très petites particules il convient de l'ajuster à 4. Par la suite la différence de potentiel est déclenchée avec un voltage de 5 kV (le voltage peut être augmenté si la luminosité de l'image n'est pas suffisante après ajustement).

Pour les ajustements, la première chose à faire est de placer l'échantillon directement sous le faisceau d'électrons. Ceci se fait avec les commandes nommées « Stage » ou manuellement avec la boule de navigation. Par la suite, il est possible d'amplifier l'image avec le bouton « Magnification », et une fois la figure amplifiée à la taille désirée, il est nécessaire d'ajuster la focalisation de l'appareil avec le bouton « Focus ». Par la suite, il est nécessaire d'ajuster la luminosité et le contraste et ceci peut se faire avec les boutons « Brightness » et « Contrast » respectivement. Finalement, ayant ajusté la focalisation, le contraste et la luminosité, le stigma peut être ajusté avec les boutons « Stigma X » et « Stigma Y » (cet ajustement est plus facile à faire en amplifiant fortement l'image durant la mise au point). Des commandes automatiques existent et peuvent permettre la mise au point de l'image, mais des fois la mise au point obtenue est moyenne, notamment avec des amplifications de plus de 5000 x.

Annexe 9 : Protocole de synthèse de MIP in situ dans un capillaire

Découpage d'environ 18 cm d'un capillaire en silice vierge de $100 \pm 0,04 \mu\text{m}$ de diamètre interne et de $363 \pm 15 \mu\text{m}$ de diamètre externe avec une gaine de Téflon[®] AF (TSU 100375 Polymicrotech).

Tous les remplissages se font avec un pousse-seringue à $0,5 \mu\text{L min}^{-1}$. Les solutions sont toutes soniquées pendant 2 minutes avant de les placer dans la seringue pour remplir les capillaires.

Pré-traitement du capillaire :

Solution de silanisation γ -MAPS $1,7 \text{ mmol.L}^{-1}$ dans CH_3COOH 6 mmol.L^{-1} (pH=3,5) : ajout de $40 \mu\text{L}$ de γ -MAPS, et $10 \mu\text{L}$ d'acide acétique dans une fiole jaugée avec de l'eau ultra-pure.

- NaOH 1 mol.L^{-1} pendant 1 heure
- H₂O pendant 5 minutes
- HCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ pendant 1 heure
- H₂O pendant 5 minutes
- Solution de silanisation pendant 1 heure
- H₂O pendant 5 minutes
- Séchage avec de l'azote (maximum 20 psi) à 50°C pendant 20 minutes

Synthèse du polymère

Suite au calcul des quantités requises de chacun des réactifs (calcul de volumes), la synthèse a été effectuée de la façon qui suit :

- 1) Mélange de la molécule empreinte, le monomère fonctionnel et les solvants porogène et co-porogène dans un flacon. On ferme le flacon, on agite et on garde au réfrigérateur pendant 1 heure.
- 2) Ajout de l'agent réticulant et de l'initiateur dans le flacon plongé dans un bain de glace.
- 3) Dégazage sous flux d'azote pendant 20 minutes. Pour ce faire, on place un septum sur le flacon et celui-ci est percé par une seringue connectée à une ligne d'azote et aussi avec une aiguille de seringue pour dégager l'air du ballon. Cette étape se fait dans un bain de glace.
- 4) Le flacon fermé et dégazé est placé 2 minutes aux ultrasons puis l'aiguille est par la suite remplie avec son contenu pour remplir les capillaires pendant 5 minutes à $0,5 \mu\text{L min}^{-1}$.
- 5) Le capillaire est bouché des deux côtés par des bouchons de GC et il est placé par la suite dans un bain thermostaté. La polymérisation a lieu pendant 24 heures.
- 6) Les polymères ainsi obtenus sont connectés à la nano-LC et rincés avec du MeCN à un débit de $0,2 \mu\text{L.min}^{-1}$ (ou $0,1 \mu\text{L min}^{-1}$ si la pression est trop importante) pendant 30 minutes.

Liste des figures et des tableaux

Liste des figures

Chapitre I

FIGURE I- 1 : LA COCAÏNE : STRUCTURE CHIMIQUE (A), FEUILLES DE COCA (B), CRISTAUX DE CLORHYDRATE DE COCAÏNE (C), « CAILLOUX » DE COCAÏNE BASE OU « CRACK » (D) (ADAPTEE DE [2]).	12
FIGURE I- 2 : SCHEMA DES PRINCIPALES ROUTES METABOLIQUES DE LA COCAÏNE DANS LE CORPS HUMAIN (ADAPTE DE [5]).	14
FIGURE I- 3 : PRINCIPE DE L'ELECTROSPRAY (ADAPTE DE [74]).	26
FIGURE I- 4 : SCHEMA REPRESENTANT UN FILTRE QUADRIPOLAIRE (ADAPTE DE [73]).	29
FIGURE I- 5 : SCHEMA DE PRINCIPE DU TRIPLE QUADRIPOLE (ADAPTE DE [73]).	30
FIGURE I- 6 : CHROMATOGRAMMES EN HPLC-MS/MS POST INFUSION DE MORPHINE A 10 µG.ML ⁻¹ AVEC UNE IONISATION PAR ESI OU PAR APCI D'UNE INJECTION DE PHASE MOBILE (A) ET D'UNE INJECTION D'UN ECHANTILLON DE SALIVE APRES LA PRECIPITATION DE SES PROTEINES AVEC DE L'ACETONITRILE (B). (ADAPTE DE [81]).	33
FIGURE I- 7 : PRINCIPE DE L'EXTRACTION SUR PHASE SOLIDE (SPE).	39
FIGURE I- 8 : FORMATS DISPONIBLES POUR LA SPE.	41
FIGURE I- 9 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU COUPLAGE AN LIGNE. LES CONNEXIONS DES LIQUIDES SONT REPRESENTEES EN BLEU POUR LA POSITION DE CHARGEMENT ET EN ROUGE POUR LA POSITION D'ANALYSE (ADAPTE DE [96]).	42
FIGURE I- 10 : CHROMATOGRAMMES HPLC-UV RESULTANTS DE L'EXTRACTION DE LA COCAÏNE D'UN ECHANTILLON DE PLASMA DOPE APRES SON EXTRACTION PAR UN SUPPORT CONVENTIONNEL C18 (A) ET PAR UN OLIGOADSORBANT CIBLE POUR LA COCAÏNE (B) (ADAPTE DE [118]).	49
FIGURE I- 11 : PRINCIPE DE SYNTHESE D'UN POLYMERE A EMPREINTES MOLECULAIRES PAR DIFFERENTES APPROCHES : APPROCHE COVALENTE (A), APPROCHE SEMI-COVALENTE (B), APPROCHE NON-COVALENTE AVEC FORMATION D'INTERACTIONS ELECTROSTATIQUES (C), FORMATION D'INTERACTIONS HYDROPHOBES (D), ET FORMATION DE COMPLEXES METAL-LIGAND (ADAPTE DE [122]).	51
FIGURE I- 12 : SCHEMA DU PRINCIPE DE FONCTIONNEMENT DE LA DI-SDME (ADAPTE DE [137]).	62
FIGURE I- 13 : SYSTEMES DE MICROEXTRACTION EN PHASE LIQUIDE ASSISTEE PAR FIBRE CREUSE EN CONFIGURATION EN D (A), EN CONFIGURATION EN U (B) ET EN CONFIGURATION EN D ASSISTEE PAR UN POUSSE SERINGUE (C) (ADAPTE DE [140]).	64
FIGURE I- 14 : DISPOSITIF EXPERIMENTAL POUR LA SPME (ADAPTE DE [140]).	65
FIGURE I- 15 : SCHEMA D'UNE SERINGUE POUR LA SPDE (ADAPTE DE [147]).	67
FIGURE I- 16 : SCHEMA D'UN DISPOSITIF EXPERIMENTAL UTILISES EN MEPS (ADAPTE DE [9]).	68
FIGURE I- 17 : SCHEMAS REPRESENTANT UN DISPOSITIF DE BASE POUR UNE SEPARATION ELECTROKINETIQUE AVEC LA DESCRIPTION GENERALE DU SYSTEME (A), L'ETAPE D'INJECTION ELECTROKINETIQUE DE L'ECHANTILLON (B), ET L'ETAPE DE SEPARATION (C) (ADAPTE DE [165]).	74
FIGURE I- 18 : SCHEMA D'UNE COLONNE D'ELECTROCHROMATOGRAPHIE EN FORMAT COMOSS ET IMAGE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE D'UNE SECTION DE CE COMOSS [171].	76
FIGURE I- 19 : SCHEMA REPRESENTANT LE COUPLAGE D'UN MICROSYSTEME DE SEPARATION ET PRE-CONCENTRATION A UN SPECTROMETRE DE MASSE AVEC UNE SOURCE ESI (P : POUSSE SERINGUE, I : VANNE D'INJECTION MANUELLE, U : RACCORD, C : PUCE) [177].	78

FIGURE I- 20 : SCHEMA DE FONCTIONNEMENT DE LA SEPARATION DE MOLECULES SUR UNE PUCE EN VERRE CONTENANT UNE COLONNE DE SILICE GREFFEE AVEC DES GROUPEMENTS HYDROPHOBES (S : ECHANTILLON, ECD : DETECTEUR ELECTROCHIMIQUE, W1 : POUBELLE DE LA PHASE MOBILE, W2 : POUBELLE DE L'ECHANTILLON, V1 : VANNE D'ENTREE DE LA PHASE MOBILE, V2 : VANNE DE SORTIE DE LA PHASE MOBILE, V3 : VANNE D'ENTREE DE L'ECHANTILLON, V4 : VANNE DE SORTIE DE L'ECHANTILLON) [178].	79
FIGURE I- 21 : IMAGES MEB DES MONOLITHES IMPRIME ALFUZOZINE (10) ET NON IMPRIME (NI-MC 10) SYNTHETISES DANS DES CAPILLAIRES EN SILICE DE 100 μM DE DIAMETRE INTERNE (ADAPTE DE [158]).	81
FIGURE I- 22 : PHOTOS DU MONTAGE UTILISE POUR LE COUPLAGE EN LIGNE DU MIP ALFUZOZINE A LA NANOLC. LA PHOTOGRAPHIE DE DROITE REPRESENTE UN AGRANDISSEMENT DE LA PARTIE ENCERCLEE EN ROUGE SUR LA FIGURE DE GAUCHE. (ADAPTE DE [158]).	82
FIGURE I- 23 : CHROMATOGRAMMES LC-UV OBTENUS APRES UNE INJECTION D'UNE SOLUTION STANDARD D'ALFUZOZINE (A), APRES UNE INJECTION DE PLASMA/MECN DOPE AVEC DE L'ALFUZOZINE PUIS EXTRAIT EN LIGNE PAR LE MIP ALFUZOZINE EN FORMAT CAPILLAIRE (B), OU PAR LE NIP (C), ET INJECTION DIRECTE DE PLASMA/MECN DOPE AVEC DE L'ALFUZOZINE (D). (ADAPTE DE [158]).	82
FIGURE I- 24 : ELECTROCHROMATOGRAMMES D'UN MELANGE DE FLUORANTHENE ET DE BENZO(A)ANTHRACENE A 3,3 $\text{NG}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ET DE BENZO(K)FLUORANTHENE A 5 $\text{NG}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ OBTENUS APRES UNE INJECTION NORMALE (A), OU APRES UNE PRE-CONCENTRATION DE 60 SECONDES (B) [180].	83
FIGURE I- 25 : SCHEMA DE LA PUCE UTILISEE POUR L'ANALYSE DE MARQUEURS DE L'INFLAMMATION (A), ET ELECTROPHEROGARME OBTENU DES CONCENTRATIONS DE BIOMARQUEURS POUR UN ECHANTILLON CUTANE D'UN PATIENT AVEC UNE LESION CUTANEE LEGERE (B) (ADAPTE DE [181]).	85
FIGURE I- 26 : SCHEMA DU DISPOSITIF PUCE AGILENT (ADAPTE DE [185]).	86
FIGURE I- 27 : SYSTEME CHIPLC-NANOFLEX DE EKSIGENT ET SCHEMA DE CONNEXION DES ETAPES D'ENRICHISSEMENT ET DE SEPARATION VIA DIFFERENTES PUCES INDEPENDANTES (ADAPTE DE [198]).	87

Chapitre II

FIGURE II- 1 : SCHEMA DE LA PUCE COMMERCIALE ETUDIEE (SOURCE AGILENT).	92
FIGURE II- 2 : SCHEMA DE L'INTERFACE « CHIP CUBE ».	94
FIGURE II- 3 : SCHEMA DES CONNEXIONS DE LA PUCE DANS LA POSITION D'ENRICHISSEMENT (A), ET DANS LA POSITION D'ANALYSE (B) EN MODE « FORWARD FLUSH ».	95
FIGURE II- 4 : CHROMATOGRAMMES LC-MS (TRAPPE D'IONS) CORRESPONDANT AUX COURANTS IONIQUES DE LA COCAÏNE A $m/z = 304,1$ ET DE LA BZE A $m/z = 290,1$ POUR UNE INJECTION DE 1 μL D'UNE SOLUTION AQUEUSE DE COCAÏNE ET BZE A 25 $\text{NG}\cdot\text{ML}^{-1}$ AVEC 2 % ME CN. PUCE DE 40 NL DE CAPACITE. DEBIT = 0,3 $\mu\text{L}\cdot\text{MIN}^{-1}$, GRADIENT SUR LE TABLEAU ET EN ANNEXE 2, METHODE 1.	99
FIGURE II- 5 : CHROMATOGRAMMES LC-MS CORRESPONDANT AUX COURANTS IONIQUES DE LA COCAÏNE A $m/z = 304$, ET DE LA BZE A $m/z = 290,1$ POUR UNE INJECTION DE 1 μL D'UNE SOLUTION AQUEUSE DE COCAÏNE ET BZE A 100 $\text{NG}\cdot\text{ML}^{-1}$ AVEC 2 % ME CN, AVEC UNE GRADIENT COMPOSE D'UN TAMPON FORMATE D'AMMONIUM 5 MM PH = 3,5 ET ME CN (A), OU D'UN MELANGE D'EAU ET ME CN TOUS DEUX AVEC 0,1 % D'ACIDE FORMIQUE (B). PUCE CAPACITE = 500 NL. MS = TRAPPE IONIQUE. DEBIT = 0,4 $\mu\text{L}\cdot\text{MIN}^{-1}$, GRADIENT DECRIT SUR LES TABLEAUX ET EN ANNEXE 2 METHODES 2 (A) ET 3 (B).	101
FIGURE II- 6 : VARIATIONS DE L'AIRES DES PICS DE COCAÏNE (A) ET DE BZE (B) EN FONCTION DU VOLUME INJECTE D'UNE SOLUTION AQUEUSE CONTENANT 2 % ME CN ET DOPEE A 100 $\text{NG}\cdot\text{ML}^{-1}$ AVEC DE LA COCAÏNE ET DE LA BZE. PUCE DE 500 NL, V_{FLUSH} DE 5 μL APPLIQUE A 4 $\mu\text{L}\cdot\text{MIN}^{-1}$ AVEC UNE SOLUTION A 10 % DE ME CN ET 90 % D'EAU. LES DROITES FIGURANT SUR LES	

GRAPHIQUES CORRESPONDENT AUX VALEURS DES AIRES DE PIC QUI DEVRAIENT THEORIQUEMENT ETRE RETROUVEES EN PRENANT COMME REFERENCE L'AIRES OBTENUE POUR L'INJECTION DE 1 μL D'ECHANTILLON. MS = TRAPPE D'IONS. METHODE COMPLETE EN ANNEXE 2, METHODE 3.	104
FIGURE II- 7 : INFLUENCE DU POURCENTAGE DE MeCN DANS L'ECHANTILLON SUR LE SIGNAL DE LA COCAÏNE (◆) ET DE LA BZE (▲) POUR UNE INJECTION DE 2 μL D'ECHANTILLON CONTENANT 100 NG.ML^{-1} DES ANALYTES. PUCE DE 500 NL, V_{FLUSH} DE 5 μL D'UNE SOLUTION DE TRANSFERT CONTENANT 10 % MeCN ET 90 % D'EAU. MS = TRAPPE IONIQUE. METHODE COMPLETE EN ANNEXE 2, METHODE 3.	105
FIGURE II- 8 : ETUDE DE LA REPOSE DE LA COCAÏNE (◆) ET DE LA BZE (▲) EN FONCTION DU VOLUME DE TRANSFERT V_{FLUSH} D'UNE SOLUTION DE $\text{H}_2\text{O} / \text{MeCN}$ 90/10 (v/v) LORS DE L'UTILISATION D'UNE PUCE DE 160 NL (A) OU DE 500 NL (B) DE CAPACITE POUR L'INJECTION DE 2 μL D'UN ECHANTILLON D'EAU A 2 % DE MeCN DOPEE AVEC 100 NG.ML^{-1} DE CHAQUE ANALYTE. METHODE COMPLETE EN ANNEXE 2, METHODE 3.	106
FIGURE II- 9 : ETUDE DE LA REPOSE DE LA COCAÏNE (◆) ET DE LA BZE (▲) EN FONCTION DU VOLUME DE TRANSFERT V_{FLUSH} D'UNE SOLUTION DE $\text{H}_2\text{O} / \text{MeCN}$ 95/5 (v/v) LORS DE L'UTILISATION D'UNE PUCE DE 160 NL (A) OU DE 500 NL (B) DE CAPACITE POUR L'INJECTION DE 2 μL D'UN ECHANTILLON D'EAU A 2 % DE MeCN DOPEE AVEC 100 NG.ML^{-1} DE CHAQUE ANALYTE. METHODE COMPLETE EN ANNEXE 2, METHODE 3.	108
FIGURE II- 10 : CHROMATOGRAMMES LC-MS CORRESPONDANT AUX TRANSITIONS MRM DE LA COCAÏNE ET DE LA BZE POUR UNE INJECTION DE 2 μL D'UNE SOLUTION AQUEUSE DE COCAÏNE ET BZE A 500 PG.ML^{-1} AVEC 2 % DE MeCN DANS LES CONDITIONS DECRITES SUR LE TABLEAU II- 3. DEBIT : 0,4 $\mu\text{L.MIN}^{-1}$. MS = TRIPLE QUADRIPOLE. PUCE 500 NL. TABLEAU PRESENTANT LES CONDITIONS DU GRADIENT UTILISE, MAIS AUSSI EN ANNEXE 2, METHODE 6.	110
FIGURE II- 11 : CHROMATOGRAMMES LC-MS CORRESPONDANT AUX TRANSITIONS MRM DE LA COCAÏNE ET DE LA BZE POUR UNE INJECTION DE 2 μL D'UNE SOLUTION AQUEUSE DE COCAÏNE ET BZE A 100 PG.ML^{-1} AVEC 2 % DE MeCN APRES L'ADAPTATION DE LA METHODE POUR LIMITER LES EFFETS DE MEMOIRE. $V_{\text{FLUSH}} = 6 \mu\text{L}$. DEBIT = 4 $\mu\text{L.MIN}^{-1}$. PUCE 500 NL. MS = TRIPLE QUADRIPOLE GRADIENT DECRIT SUR LE TABLEAU ET EN ANNEXE 2, METHODE 7.	113
FIGURE II- 12 : CHROMATOGRAMMES LC-MS CORRESPONDANT AUX TRANSITIONS MRM DE LA COCAÏNE ET DE LA BZE POUR UNE INJECTION DE 5 μL D'UNE SOLUTION AQUEUSE DE COCAÏNE ET BZE A 50 PG.ML^{-1} AVEC 2 % DE MeCN. LC-MS CONVENTIONNELLE, COLONNE ZORBAX C18 5 μM 150 MM X 2,1 MM D.I., PHASE MOBILE EAU/MeCN/HCOOH 70/30/0,1 v/v/v, DEBIT 0,2 $\mu\text{L.MIN}^{-1}$. MS = TRIPLE QUADRIPOLE. METHODE COMPLETE EN ANNEXE 2, METHODE CONVENTIONNELLE.	114
FIGURE II- 13 : CHROMATOGRAMMES LC-MS CORRESPONDANT AUX TRANSITIONS MRM DE LA COCAÏNE ET DE LA BZE POUR UNE INJECTION DE 2 μL D'UNE SOLUTION AQUEUSE DOPEE A 10 PG.ML^{-1} AVEC 2 % DE MeCN. PUCE DE 500 NL. $V_{\text{FLUSH}} = 5 \mu\text{L}$. DEBIT = 0,4 $\mu\text{L.MIN}^{-1}$. MS = TRIPLE QUADRIPOLE. METHODE ISOCRATIQUE EAU/MeCN/HCOOH 70/30/0,1 v/v/v. METHODE COMPLETE EN ANNEXE 2, METHODE ISOCRATIQUE.	116
FIGURE II- 14 : PROCEDURE D'EXTRACTION DE LA COCAÏNE ET SES METABOLITES DE LA MATRICE CHEVEUX.	118
FIGURE II- 15 : CHROMATOGRAMMES EN MODE MRM D'UN EXTRAIT DE CHEVEUX DOPE A 500 PG.MG^{-1} DE COCAÏNE ET DE BZE ($C_{\text{FINALE}} = 250 \text{PG.ML}^{-1}$) PAR SPE-LC SUR PUCE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE. PUCE DE 500 NL. $V_{\text{FLUSH}} = 5 \mu\text{L}$. DEBIT = 0,4 $\mu\text{L.MIN}^{-1}$. MS = TRIPLE QUADRIPOLE. METHODE ISOCRATIQUE EAU/MeCN/HCOOH 70/30/0,1 v/v/v. METHODE COMPLETE EN ANNEXE 2, METHODE ISOCRATIQUE.	119
FIGURE II- 16 : RENDEMENT DE LA BZE ET DE LA COCAÏNE DANS DES ECHANTILLONS D'URINE DILUES (2 % MeCN) COMPARES A DES ECHANTILLONS PURS (2 % MeCN) AVEC LA MEME CONCENTRATION. L'URINE A ETE DOPEE INITIALEMENT AVEC 8 NG.ML^{-1} DE COCAÏNE ET DE BZE AVANT SA DILUTION AVEC DE L'EAU. $V_{\text{FLUSH}} = 6 \mu\text{L}$. DEBIT = 4 $\mu\text{L.MIN}^{-1}$. PUCE 500 NL. MS = TRIPLE QUADRIPOLE GRADIENT DECRIT EN ANNEXE 2, METHODE 7.	121
FIGURE II- 17 : CHROMATOGRAMMES EN MODE MRM D'UN ECHANTILLON D'URINE DOPE AVEC 8 NG.ML^{-1} DE COCAÏNE ET DE BZE ET DILUE 50 FOIS AVEC DE L'EAU. LA CONCENTRATION FINALE APRES DILUTION POUR LES DEUX MOLECULES EST DE 0,160 NG.ML^{-1}	

ET L'ÉCHANTILLON CONTIENT 2 % DE MeCN. $V_{FLUSH} = 6 \mu\text{L}$. DÉBIT = $4 \mu\text{L} \cdot \text{MIN}^{-1}$. PUCE 500 NL. MS = TRIPLE QUADRIPOLE GRADIENT DECRIT EN ANNEXE 2, METHODE 7.	122
FIGURE II- 18 : DROITES D'ÉTALONNAGE DE LA COCAÏNE ET LA BZE POUR DES ÉCHANTILLONS AQUEUX OU URINAIRES (DILUÉS 50 FOIS) DOPEES ET CONTENANT 2 % DE MeCN. $V_{FLUSH} = 6 \mu\text{L}$. DÉBIT = $4 \mu\text{L} \cdot \text{MIN}^{-1}$. PUCE 500 NL. MS = TRIPLE QUADRIPOLE GRADIENT DECRIT EN ANNEXE 2, METHODE 7.	123

Chapitre III

FIGURE III- 1 : CHROMATOGRAMME LC-UV D'UNE SOLUTION D'EAU AVEC 10 % DE MeCN DOPEE AVEC $50 \text{ NG} \cdot \text{ML}^{-1}$ DE COCAÏNE ET DE BZE. DETECTION UV A $\lambda = 233 \text{NM}$. GRADIENT TAMPON FORMATE D'AMMONIUM 5 MM PH = 3,2 ET MeCN. DÉBIT = $0,2 \text{ ML} \cdot \text{MIN}^{-1}$. $V_{INJECTION} = 20 \mu\text{L}$. TEMPERATURE = 35°C . METHODE DECRITE EN ANNEXE 2 COMME METHODE LC- UV.	132
FIGURE III- 2 : CHROMATOGRAMMES LC-MS DES TRANSITIONS MRM DE LA COCAÏNE, LA BZE ET L'EME D'UNE SOLUTION DOPEE AVEC $0,5 \text{ NG} \cdot \text{ML}^{-1}$ DE CHACUNE DES MOLECULES CIBLES. METHODE LC-MS SYMMETRY SHIELD DECRITE EN ANNEXE 2.....	134
FIGURE III- 3 : ÉVALUATION DE LA RETENTION DE LA COCAÏNE SUR LE MIP TH ET LE NIP TH LORS DE L'UTILISATION DE MeCN COMME SOLVANT D'ÉLUTION. FRACTIONS DE 1 ML.....	141
FIGURE III- 4 : ÉVALUATION DE LA RETENTION DE LA COCAÏNE SUR LE MIP TH ET LE NIP TH LORS DE L'UTILISATION DE MeOH COMME SOLVANT D'ÉLUTION. FRACTIONS DE 1 ML.....	142
FIGURE III- 5 : ÉVALUATION DE LA RETENTION DE LA COCAÏNE SUR LE MIP TH ET LE NIP TH LORS DE L'UTILISATION DE MeOH/ACIDE ACETIQUE 95/5 V/V COMME SOLVANT D'ÉLUTION. FRACTIONS DE 1 ML.	143
FIGURE III- 6 : PROFILS D'EXTRACTION DE LA COCAÏNE ET LA BZE AVEC LE MIP TH ET LE NIP TH. PERCOLATION (P) : 1ML MeCN DOPE DE COCAÏNE ET BZE A $0,1 \mu\text{G} \cdot \text{ML}^{-1}$, LAVAGES (L1, L2, L3) : 1 ML MeCN, ELUTION : 1 ML MeOH/ACIDE ACETIQUE 95/5 V/V.	144
FIGURE III- 7 : PROFILS D'EXTRACTION OPTIMISES DE LA COCAÏNE ET LA BZE SUR LE MIP TH ET SUR LE NIP TH (N = 3).	145
FIGURE III- 8 : ÉVALUATION DE SOLVANTS DE LAVAGE POUR LES PROFILS D'EXTRACTION DE LA COCAÏNE ET LA BZE AVEC LE MIP UV ET LE NIP UV (N=3). FRACTIONS DE 1 ML.	147
FIGURE III- 9 : PROFILS D'EXTRACTION OPTIMISES DE LA COCAÏNE ET LA BZE AVEC LE MIP UV ET LE NIP UV. FRACTIONS DE 1 ML.	148
FIGURE III- 10 : COURBES DE SATURATION DU MIP UV (♦) ET DU NIP UV (●) CORRESPONDANT POUR LA COCAÏNE LORS DE SON EXTRACTION APRES LA PERCOLATION DE 1 ML DE SOLUTION DE MeCN CONTENANT DES CONCENTRATIONS CROISSANTES DE COCAÏNE. LE PROTOCOLE D'EXTRACTION EST DETAILLE DANS LE TABLEAU III- 3.	150
FIGURE III- 11 : PROFILS D'EXTRACTION DE LA COCAÏNE (A), LA BZE (B) ET L'EME (C) DU MIP ET DE SON NIP CORRESPONDANT DANS LES CONDITIONS DECRITES SUR LE TABLEAU III- 3, MAIS POUR UNE PERCOLATION DE 1ML D'UNE SOLUTION DE MeCN DOPEE AVEC $10 \text{ NG} \cdot \text{ML}^{-1}$ DE COCAÏNE, BZE ET EME (N = 3).....	152
FIGURE III- 12 : PROFILS D'EXTRACTION DE LA COCAÏNE (A), LA BZE (B) ET L'EME (C) DU MIP UV ET DE SON NIP CORRESPONDANT DANS LES CONDITIONS DECRITES SUR LE TABLEAU III- 3, MAIS POUR UNE PERCOLATION DE 1ML D'UNE SOLUTION CONSTITUEE D'UN MELANGE EAU/MeCN 50/50 (V/V) DOPEE AVEC $5 \text{ NG} \cdot \text{ML}^{-1}$ DE COCAÏNE, BZE ET EME.	154
FIGURE III- 13 : PROFILS D'EXTRACTION DE LA COCAÏNE (A), LA BZE (B) ET L'EME (C) DU MIP UV ET DE SON NIP CORRESPONDANT DANS LES CONDITIONS DECRITES SUR LE TABLEAU III- 3, MAIS AVEC UNE PERCOLATION DE 1 ML D'UNE SOLUTION AQUEUSE DOPEE AVEC $50 \text{ NG} \cdot \text{ML}^{-1}$ DE COCAÏNE, BZE ET EME.	155
FIGURE III- 14 : PROFILS D'EXTRACTION DE LA BZE DU MIP UV ET DE SON NIP D'UN MILIEU AQUEUX DANS LES CONDITIONS DECRITES SUR LA FIGURE.....	156

FIGURE III- 15 : PROFILS D'EXTRACTION DE LA COCAÏNE (A) ET L'EME (B) AVEC LE MIP UV ET LE NIP CORRESPONDANT D'UN MILIEU AQUEUX (N=3).	157
FIGURE III- 16 : PREMIER PROFIL D'EXTRACTION DE LA BZE SUR LE MIP DVB ET SON NIP EN MILIEU MeCN. FRACTIONS DE 1 ML.	159
FIGURE III- 17 : PROFIL D'EXTRACTION OPTIMISE EN MILIEU MeCN DE LA COCAÏNE ET LA BZE SUR LE MIP DVB ET SON NIP. FRACTIONS DE 1 ML.....	160
FIGURE III- 18 : PROFILS D'EXTRACTION DE LA COCAÏNE ET LA BZE EN MILIEU MeCN SUR LES MIP TRIM ET NIP TRIM. FRACTIONS DE 1 ML.	161
FIGURE III- 19 : PROFILS D'EXTRACTION DE LA COCAÏNE ET LA BZE EN MILIEU HYDRO-ORGANIQUE SUR LES MIP TRIM ET NIP TRIM. FRACTIONS DE 1 ML.....	162
FIGURE III- 20 : PROFILS D'EXTRACTION DE LA COCAÏNE ET LA BZE EN MILIEU AQUEUX PUR SUR LES MIP TRIM ET NIP TRIM. FRACTIONS DE 1 ML.....	163
FIGURE III- 21 : PROFILS D'EXTRACTION DE LA COCAÏNE ET LA BZE EN MILIEU MeCN SUR LES MIP 2-VP ET NIP 2-VP. FRACTIONS DE 1 ML.....	164
FIGURE III- 22 : PROFILS D'EXTRACTION DE LA COCAÏNE ET LA BZE EN MILIEU HYDRO-ORGANIQUE SUR LES MIP 2-VP ET NIP 2-VP. FRACTIONS DE 1 ML.....	165
FIGURE III- 23 : PROFILS D'EXTRACTION DE LA COCAÏNE ET LA BZE EN MILIEU AQUEUX PUR SUR LES MIP 2-VP ET SON NIP. FRACTIONS DE 1 ML.....	166
FIGURE III- 24 : PROFILS D'EXTRACTION DE LA COCAÏNE ET LA BZE AVEC LE MIP ET SON NIP APRES PERCOLATION DE 1 ML D'EXTRAIT DE CHEVEUX EN MeCN DOPE A 4 NG.MG ⁻¹ DE CHEVEUX DE COCAÏNE ET DE BZE (N = 3). LES CONDITIONS D'EXTRACTION SONT CELLES DU (TABLEAU III- 3).	167
FIGURE III- 25 : CHROMATOGRAMMES LC-UV D'EXTRAITS DE CHEVEUX DANS DU MeCN DOPES (LIGNE NOIRE UNIE) ET NON-DOPE (LIGNE NOIRE POINTILLEE) AVEC DE LA COCAÏNE ET DE LA BZE A 4 NG MG ⁻¹ (A), ET D'UN EXTRAIT MeCN DE CHEVEUX DOPE A 4 NG.MG ⁻¹ APRES UNE ETAPE DE SPE SUR LE MIP (B).....	168
FIGURE III- 26 : CHROMATOGRAMMES LC-MS DES TRANSITIONS MRM DE LA COCAÏNE (A) ET DE LA BZE (B) D'UN EXTRAIT MeCN DE CHEVEUX DOPE AVEC 0,5 NG.MG ⁻¹ DE COCAÏNE ET DE BZE AVANT (LIGNE NOIRE) ET APRES (LIGNE GRISE) PURIFICATION PAR LE MIP.	169
FIGURE III- 27 : PROFILS D'EXTRACTION DE LA COCAÏNE D'UN ECHANTILLON DE SERUM DOPE APRES LA PRECIPITATION DES PROTEINES PAR DU MeCN. LES PROTOCOLES CORRESPONDANT A CHAQUE PROFIL SONT DETAILLES SUR LE TABLEAU III- 6.	171
FIGURE III- 28 : POURCENTAGE DE COCAÏNE ET DE BZE DES FRACTIONS D'ELUTION (A) ET DE PERCOLATION (B) EN FONCTION DU PH APRES APPLICATION DU PROTOCOLE D'EXTRACTION DU PROFIL 3 (TABLEAU III- 6).	172
FIGURE III- 29 : PROFILS D'EXTRACTION DE LA COCAÏNE SUR LE MIP ET LE NIP OBTENUS APRES PERCOLATION DE 0,5 ML D'UN ECHANTILLON DE SERUM TRAITE PAR 50 % DE MeCN, DOPE AVEC 1 µG.ML ⁻¹ DE COCAÏNE (N = 3). LAVAGE : 1 ML DE MeCN, ELUTION : 2 ML MeOH/ACIDE ACETIQUE 95/5 v/v.	174
FIGURE III- 30 : CHROMATOGRAMMES LC-UV D'ECHANTILLONS DE SERUM DOPES AVEC 50 NG.ML ⁻¹ DE COCAÏNE (PIC MONTRE PAR UNE FLECHE), AVANT EXTRACTION (LIGNE CONTINUE), ET APRES L'EXTRACTION AVEC LE MIP (TIRETS).....	174
FIGURE III- 31 : PROFILS D'EXTRACTION DE L'EME OBTENUS AVEC LE MIP ET LE NIP APRES PERCOLATION DE 0,5 ML D'UN ECHANTILLON DE SERUM TRAITE PAR 50 % DE MeCN ET DOPE 50 NG.ML ⁻¹ D'EME.....	175
FIGURE III- 32 : PROFILS D'EXTRACTION DE LA COCAÏNE SUR MIP ET NIP APRES LA PERCOLATION D'URINE DOPEE.....	176
FIGURE III- 33 : PROFILS D'EXTRACTION OPTIMISES DE LA COCAÏNE SUR MIP ET NIP APRES PERCOLATION D'URINE DOPEE ET PROTOCOLE D'EXTRACTION ASSOCIE (N=3).	177
FIGURE III- 34 : CHROMATOGRAMMES LC-UV D'ECHANTILLONS D'URINE DOPES AVEC 50 NG.ML ⁻¹ DE COCAÏNE, AVANT EXTRACTION (LIGNE CONTINUE), ET APRES L'EXTRACTION SUR MIP (TIRETS). ENCADRE INFERIEUR : ZOOM DE LA PARTIE ENCADREE.....	178

FIGURE III- 35 : PROFILS D'EXTRACTION DE L'EME SUR MIP ET NIP APRES PERCOLATION D'URINE DOPEE. LES FRACTIONS OBTENUES AVEC LE PROTOCOLE PRESENTE SUR CETTE FIGURE SONT DILUEES 50 FOIS AVANT LEUR ANALYSE PAR LC-MS.	180
FIGURE III- 36 : PROFILS D'EXTRACTION DE LA COCAÏNE ET L'EME SUR LE MIP ET LE NIP APRES PERCOLATION D'UN ECHANTILLON D'URINE DOPE ET DILUE 50 FOIS AVEC DE L'EAU SUIVANT LE PROTOCOLE DECRIT SUR LA FIGURE.....	180
FIGURE III- 37 : CHROMATOGRAMMES EN LC-UV (A) ET EN LC-MS (B) CORRESPONDANTS A L'URINE AVANT (LIGNE POINTILLEE NOIRE) ET APRES EXTRACTION AVEC LA CARTOUCHE OASIS HLB (LIGNE CONTINUE NOIRE) ET A UNE SOLUTION AQUEUSE CONTENANT 50 NG.ML ⁻¹ DE COCAÏNE ET DE BZE (LIGNE CONTINUE GRISE).	182
FIGURE III- 38 : CHROMATOGRAMMES EN LC-UV CORRESPONDANTS A L'URINE DOPEE AVEC DE LA COCAÏNE ET DE LA BZE ET PURIFIEE PAR UNE CARTOUCHE OASIS HLB (LIGNE CONTINUE NOIRE) OU PAR LE MIP (TIRETS NOIRS).	182
FIGURE III- 39 : PROFILS D'EXTRACTION DE LA COCAÏNE, LA BZE ET L'EME SUR LE MIP UV ET SON NIP CORRESPONDANT A UN ECHANTILLON URINE DOPE AVEC 100 NG.ML ⁻¹ APRES UNE LLE. LE PROTOCOLE D'EXTRACTION EST CELUI DECRIT SUR LE TABLEAU III- 3 AVEC UNE SOLUTION DE PERCOLATION DIFFERENTE PROVENANT DE LA LLE DE L'URINE DOPEE.	185
FIGURE III- 40 : CHROMATOGRAMMES EN LC-MS D'UN ECHANTILLON URINE DOPE AVEC 100 NG.ML ⁻¹ DE COCAÏNE, BZE ET EME APRES SA PURIFICATION PAR LLE SUIVIE D'UNE EXTRACTION SUR MIP.	186
FIGURE III- 41 : CHROMATOGRAMME LC-UV D'UN ECHANTILLON URINE DOPE AVEC DE LA COCAÏNE ET DE LA BZE A 100 NG.ML ⁻¹ APRES UNE PREMIERE ETAPE DE LLE (LIGNE CONTINUE) ET APRES UNE DEUXIEME ETAPE DE SPE SELECTIVE SUR LE MIP UV (LIGNE POINTILLEE).	187

Chapitre IV

FIGURE IV- 1 : PRINCIPE DE LA SYNTHÈSE DE PARTICULES DE MIP AVEC UNE POLYMERISATION PAR SUSPENSION.....	191
FIGURE IV- 2 : SCHEMA REPRESENTANT UN MICROREACTEUR EN SPIRALE UTILISE POUR LA SYNTHÈSE DE MIP PROPRANOLOL ET DETAIL DE LA ZONE D'INTRODUCTION DU MELANGE DE POLYMERISATION DANS LA PHASE CONTINUE (ADAPTE DE [220]).	194
FIGURE IV- 3 : PRINCIPE DE LA SYNTHÈSE DE PARTICULES DE MIP AVEC UNE POLYMERISATION PAR	196
FIGURE IV- 4 : PRINCIPE DE LA SYNTHÈSE DE PARTICULES AVEC UNE POLYMERISATION PAR PRECIPITATION (ADAPTE DE [216], M = MONOMERE, I = AGENT RETICULANT).....	198
FIGURE IV- 5 : IMAGES MEB DES PARTICULES DE NIP OBTENUES PAR LES SYNTHÈSES DES NIP 3, 5, 6, 7 ET 12 DU PLAN D'EXPERIENCES (TABLEAU IV- 4 ET TABLEAU IV- 5). AGRANDISSEMENT : x4000 . TENSION : 5kV.....	213
FIGURE IV- 6 : IMAGES MEB DES NIP ET MIP SYNTHETISES DANS LES CONDITIONS DE LA SYNTHÈSE A DU TABLEAU IV- 8. TENSION = 5kV.	216
FIGURE IV- 7 : PROFILS D'EXTRACTION DE LA COCAÏNE ET LA BZE SUR DES PRE-COLONNES DE 20 MM DE LONGUEUR ET 1 MM DE DIAMETRE INTERNE REMPLIES AVEC LE MIP 1/8/200 ET AVEC LE NIP DECRIT DANS LE TABLEAU IV- 7 MAIS AVEC UNE POLYMERISATION A 60°C (N=3).	220
FIGURE IV- 8 : PROFILS D'EXTRACTION HORS LIGNE DE LA COCAÏNE ET LA BZE APPLIQUES SUR DES PRE-COLONNES DE 20 MM DE LONGUEUR ET 1 MM DE DIAMETRE INTERNE REMPLIES AVEC LE MIP 1/8/20 AVEC 25 % D'EGDMA ET 75 % DE DVB ET AVEC LE NIP CORRESPONDANT (N=3).	222
FIGURE IV- 9 : OBSERVATION PAR MICROSCOPE OPTIQUE D'UN CAPILLAIRE REMPLI DE MIP COCAÏNE ISSU D'UNE SYNTHÈSE SANS ETAPE PREALABLE DE SONICATION AVANT (EN HAUT) ET APRES (EN BAS) SON RINÇAGE AVEC DU MECN A 200 NL.MIN ⁻¹	228
FIGURE IV- 10 : IMAGES MEB DES NIP ET MIP SYNTHETISES AVEC DE L'EGDMA AVEC DES RAPPORTS VOLUMIQUES DE (MF+AR)/P DE 30/70 ET 20/80 v/v. AUTRES CONDITIONS : VOIR TABLEAU IV- 14.....	230
FIGURE IV- 11 : IMAGES MEB DES NIP SYNTHETISES AVEC DU TRIM AVEC DES RAPPORTS VOLUMIQUES DE (MF+AR)/P DE 30/70 ET 20/80. AUTRES CONDITIONS : VOIR TABLEAU IV- 14.....	231

FIGURE IV- 12 : ETUDE DU RAPPORT $\Delta P/L$ DES MONOLITES DE NIP ET DE MIP AVEC UN RATIO MOLAIRE COC/MAA/TRIM DE 1/4/20 EN FONCTION DU RATIO VOLUMIQUE (MF+AR)/P. LA LIGNE POINTILLEE ROUGE REPRESENTA LA LIMITE POUR UN $\Delta P/L$ DE 10 BAR.CM ⁻¹	232
FIGURE IV- 13 : IMAGES MEB D'UNE COUPE TRANSVERSALE DE CAPILLAIRES DE TROIS SYNTHES DE MONOLITHES DE NIP ET MIP SYNTHETISES IN SITU DANS DES CAPILLAIRES DE SILICE DE 100 μ M DE DIAMETRE INTERNE DANS LES CONDITIONS DU TABLEAU IV-15. TENSION = 5 KV. AGRANDISSEMENT = x 1000.....	234
FIGURE IV- 14 : IMAGES MEB D'UNE COLONNE CHROMOLITH [®] CAPROD [®] , COLONNE COMMERCIALE MONOLITHIQUE DE SILICE GREFFEE C18 (ADAPTE DES BROCHURES DE CHROMOLITH [®] , MERCK).....	235
FIGURE IV- 15 : CHROMATOGRAMMES LC-UV OBTENUS APRES INJECTION DE 250 NL DE COCAÏNE, OU BZE, OU ACETONE SUR UNE COLONNE CAPILLAIRE DE 5 CM DE LONGUEUR ET 100 μ M DE DIAMETRE INTERNE DE NIP (TIRETS) OU DE MIP (LIGNE CONTINUE).....	236
FIGURE IV- 16 : SCHEMA DU MONTAGE UTILISE POUR LE COUPLAGE EN LIGNE DU NIP OU DU MIP A LA NANOLC POUR L'EXTRACTION SELECTIVE DE LA COCAÏNE.	239
FIGURE IV- 17 : CHROMATOGRAMME LC-UV D'UNE INJECTION DE 250 NL DE COCAÏNE ET BZE A 1 μ G.ML ⁻¹ DANS DE L'EAU SUR UNE COLONNE CHROMOLITH [®] CAPROD [®] (150 MMX0,1 MM D.I.) AVEC UNE PHASE MOBILE CONSTITUEE D'UN MELANGE EAU/MECN 85/15 V/V AVEC 0,1% D'ACIDE FORMIQUE A 0,5 μ L.MIN ⁻¹	242
FIGURE IV- 18 : CHROMATOGRAMMES LC-UV DE L'INJECTION DE 250 NL DE COCAÏNE ET BZE A 2 μ G.ML ⁻¹ EN INJECTION DIRECTE A 0,5 μ L.MIN ⁻¹ , OU APRES UNE ETAPE D'EXTRACTION EN LIGNE SUR LE MIP A 0,2 μ L.MIN ⁻¹ AVEC UN TRANSFERT REALISE AVEC 3XV ₀ AVEC UN MELANGE EAU/MECN 90/10 V/V. COLONNE CHROMOLITH [®] CAPROD [®] (150 MMX0,1 MM D.I.), PHASE MOBILE : EAU/MECN 85/15 V/V AVEC 0,1 % D'ACIDE FORMIQUE.	244
FIGURE IV- 19 :AIRE DE PIC NORMALISEE POUR LA COCAÏNE ET LA BZE EN FONCTION DU VOLUME DE CHARGEMENT xV ₀ CALCULE A PARTIR DU DEBIT ET DU VOLUME MORT (V ₀ = 344 NL).	245
FIGURE IV- 20 : CHROMATOGRAMMES LC-UV CORRESPONDANT A DES INJECTIONS SOIT D'EAU, SOIT D'URINE FILTREE DOPEES AVEC DE LA COCAÏNE ET DE LA BZE A 2 μ G.ML ⁻¹ AVEC LE DISPOSITIF PRESENTE DANS LA FIGURE IV- 16 AVEC LE MIP POUR PRE-COLONNE ET UN TEMPS DE CHARGEMENT CORRESPONDANT A 3xV ₀ . CONDITIONS ANALYTIQUES CF FIGURE IV- 18.	247
FIGURE IV- 21 : CHROMATOGRAMMES LC-UV CORRESPONDANT A DES INJECTIONS D'EAU OU D'URINE DILUEE 50 FOIS AVEC DE L'EAU DOPEES AVEC 2 μ G.ML ⁻¹ DE COCAÏNE ET DE BZE REALISEES AVEC LE MONTAGE DE LA FIGURE IV- 16 AVEC LE MIP POUR PRE-COLONNE ET UN TEMPS DE CHARGEMENT VARIABLE xV ₀ . PHASE MOBILE : EAU/MECN 85/15 V/V AVEC 0,1 % D'ACIDE FORMIQUE. DEBIT : 0,2 μ L.MIN ⁻¹ . COLONNE : CHROMOLITH [®] CAPROD [®] (150 MM X 0,1 MM D.I.).	248
FIGURE IV- 22 : CHROMATOGRAMMES LC-UV DE L'INJECTION DE 250 NL D'UN ECHANTILLON D'URINE DILUEE 50 FOIS AVEC DE L'EAU ET DOPE AVEC 2 μ G.ML ⁻¹ DE COCAÏNE ET BZE, INJECTE DIRECTEMENT SUR LA COLONNE DE SEPARATION (A) OU APRES L'EXTRACTION SUR LE MIP COUPLE A LA NANOLC AVEC L'UTILISATION D'UN VOLUME DE TRANSFERT DE 7V ₀ AVEC UN MELANGE EAU/MECN 90/10 V/V. CONDITIONS D'ANALYSE SUR LA FIGURE IV- 18.	249

Annexes

FIGURE A7 - 1 : PHOTOGRAPHIE ET SCHEMA DE PRINCIPE DU MICROSCOPE ELECTRONIQUE A BALAYAGE UTILISE POUR CE TRAVAIL..	273
--	-----

Liste des tableaux

Chapitre I

TABLEAU I- 1 : VALEURS DES PKA DE LA COCAÏNE ET DE SES PRINCIPAUX METABOLITES AINSI QUE DE LEURS COEFFICIENTS DE PARTAGE OCTANOL/EAU (LOG POCT). EN ROUGE : PKA DE LA FONCTION AMINE.	16
TABLEAU I- 2 : SEUILS DE POSITIVITE ET QUANTITES USUELLES DE COCAÏNE ET DE SES DEUX METABOLITES PRINCIPAUX, BZE ET EME, DANS LES MATRICES BIOLOGIQUES COURAMMENT ANALYSEES.	17
TABLEAU I- 3 : LLE DE LA COCAÏNE (COC) ET DE SES METABOLITES DANS DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES (N.M. = NON MENTIONNE).	38
TABLEAU I- 4 : CONDITIONS D'EXTRACTION UTILISEES POUR LE TRAITEMENTS DE DIVERS ECHANTILLONS BIOLOGIQUES BASES SUR L'EXTRACTION SUR PHASE SOLIDE (METHYLECG : METHYLECGONINE, N.M. : NON MENTIONNE, MS : SPECTROMETRIE DE MASSE, FID : DETECTEUR A IONISATION DE FLAMME, PS-DVB : POLYSTYRENE-DIVINYLEBENZENE).	45
TABLEAU I- 5 : RESUME DES CONDITIONS DE SYNTHESE DE MIP DEDIES A LA COCAÏNE ET SES METABOLITES.	57
TABLEAU I- 6 : QUELQUES APPLICATIONS DE LA PUCE COMMERCIALE FABRIQUEE PAR AGILENT.	86

Chapitre II

TABLEAU II- 1 : CARACTERISTIQUES DES PUCES EVALUEES.	93
TABLEAU II- 2 : PARAMETRES DE MASSE OPTIMISES POUR LE TRIPLE QUADRIPOLE.	98
TABLEAU II- 3 : PARAMETRES FIXES POUR L'ANALYSE DE LA COCAÏNE ET LA BZE SUR PUCE OBTENUS AVEC LA TRAPPE IONIQUE.	109
TABLEAU II- 4 : BILAN DES METHODES UTILISEES. LA DESCRIPTION DES GRADIENTS UTILISES POUR CHAQUE METHODE SE TROUVE EN ANNEXE 2 (QQQ = TRIPLE QUADRIPOLE).	117
TABLEAU II- 5 : RESULTATS DE L'APPROCHE STATISTIQUE POUR LA COMPARAISON DES DROITES D'ETALONNAGE EN EAU ET DANS L'URINE DILUEE 50 FOIS AVEC DE L'EAU POUR LA COCAÏNE ET LA BZE.	124
TABLEAU II- 6 : RESULTATS DE LA QUANTIFICATION DE COCAÏNE ET DE BZE D'ECHANTILLONS URINAIRES REELS DILUES AVEC DE L'EAU. CES RESULTATS ONT ETE OBTENUS AVEC LA METHODE 7 DECRITE EN ANNEXE 2, OU PAR LA METHODE LLE/GC/MS UTILISEE PAR TOXLAB. (ET=ECART TYPE, CV=COEFFICIENT DE VARIATION, N=3).	125
TABLEAU II- 7 : RESULTATS OBTENUS POUR LA METHODE DES AJOUTS DOSES ET POUR LES DEUX AUTRES METHODES DE QUANTIFICATION UTILISEES.	126

Chapitre III

TABLEAU III- 1 : CONDITIONS DE SYNTHESE DE MIP DEDIES A LA COCAÏNE ET SES METABOLITES.	135
TABLEAU III- 2 : CONDITIONS DE SYNTHESE SELECTIONNEES POUR LA SYNTHESE DU MIP TH.	139
TABLEAU III- 3 : PROCEDURE D'EXTRACTION OPTIMISEE DE LA COCAÏNE ET LA BZE SUR LE MIP UV ET LE NIP UV.	148
TABLEAU III- 4 : MOYENNES ET ECARTS TYPE OBTENUS POUR LES RENDEMENTS (EN %) D'EXTRACTION DE LA COCAÏNE ET LA BZE EN MILIEU MeCN AVEC LE PROTOCOLE DU TABLEAU III- 3 PAR TROIS CARTOUCHES DIFFERENTES DE NIP ET DE MIP.	151
TABLEAU III- 5 : CONDITIONS DE SYNTHESE POUR LA SYNTHESE D'UN MIP AVEC DU TRIM COMME AGENT RETICULANT.	161
TABLEAU III- 6 : PROTOCOLES D'EXTRACTION TESTES EN MILIEU SERUM/MeCN 50/50 (V/V) POUR LE MIP ET SON NIP CORRESPONDANT.	171

TABLEAU III- 7 : SUPPRESSION DU SIGNAL OBTENU POUR LA TRANSITION DE L'EME EN FONCTION DU FACTEUR DE DILUTION (AVEC DE L'EAU) D'UN ECHANTILLON URINE DOPE AVEC 10 NG.ML ⁻¹ D'EME.....	179
TABLEAU III- 8 : PARAMETRES DES METHODES LLE TESTEES POUR EXTRAIRE LA COCAÏNE ET SES DEUX METABOLITES PRINCIPAUX, LA BZE ET L'EME, D'ECHANTILLONS AQUEUX OU D'ECHANTILLONS URINAIRES DOPES.	184
TABLEAU III- 9 : RENDEMENTS (EN % DE LA QUANTITE INITIALE DANS L'ECHANTILLON) ASSOCIES AUX PROTOCOLES LLE DECRITS EN TABLEAU III- 8 POUR DES ECHANTILLONS D'EAU PURE ET D'URINE DOPES A 50 NG.ML ⁻¹ AVEC DE LA COCAÏNE, DE LA BZE ET DE L'EME (N = 3).....	184
TABLEAU III- 10 : QUANTITES ET RENDEMENTS POUR LA COCAÏNE, LA BZE ET L'EME OBTENUS A DIFFERENTES ETAPES DU PROTOCOLE DE TRAITEMENT D'UN ECHANTILLON DE 0,5 ML D'URINE DOPE INITIALEMENT AVEC 100 NG.ML ⁻¹ DES TROIS COMPOSES. LE TRAITEMENT DE CET ECHANTILLON A CONSISTE A UNE ETAPE DE LLE (ANNEXE 6), SUIVIE DE L'EVAPORATION DU SOLVANT ORGANIQUE PUIS DE LA REPRISSE AVEC DU MeCN POUR FINALEMENT FAIRE UNE ETAPE DE SPE SUR LE MIP UV SELON LE PROTOCOLE DECRIT SUR LE TABLEAU III- 3.	185

Chapitre IV

TABLEAU IV- 1 : COMPARAISON DES DIFFERENTES METHODES EXISTANTES POUR PREPARER DES PARTICULES SPHERIQUES DE MIP (ADAPTE DE [209]).....	190
TABLEAU IV- 2 : EXEMPLES DE MIP SYNTHETISES AVEC UNE POLYMERISATION PAR PRECIPITATION (4-VP : 4-VINYLPYRIDINE, DEM : 2-(DIETHYLAMINO)ETHYL METHACRYLATE, HMDPA : ACRYLATE DE 4-(HYDROXYMETHYL)-2,5-DIPHENYLOXAZOLE, NPA : ACRYLATE DE 4-NITROPHENYLE, BDDA : 1,4-BUTANEDIYLDIACRYLATE).	203
TABLEAU IV- 3 : MORPHOLOGIE DES PARTICULES DE NIP OBTENUES APRES 16 OU 24 HEURES PAR PRECIPITATION EN FONCTION DE L'AGENT RETICULANT UTILISE ET DU TEMPS DE POLYMERISATION.	207
TABLEAU IV- 4 : CONDITIONS DE SYNTHESE A TESTER POUR LA SYNTHESE DE NIP PAR POLYMERISATION PAR PRECIPITATION.	210
TABLEAU IV- 5 : PLAN D'EXPERIENCES DE PLACKETT-BURNMAN POUR 12 ESSAIS AVEC 8 FACTEURS A 2 NIVEAUX ET AVEC 3 DEGRES DE LIBERTE ET RESULTATS OBTENUS POUR LA TAILLE DES PARTICULES ET LE RENDEMENT. FACTEURS DECRITS EN TABLEAU IV- 4. 211	211
TABLEAU IV- 6 : EFFETS OBSERVES ET SIGNIFICATIVITES OBTENUS POUR LE PLAN D'EXPERIENCE DE PLACKETT-BURMAN DECRIT DANS LES TABLEAU IV- 4 ET TABLEAU IV- 5.	212
TABLEAU IV- 7 : RESUME DES CONDITIONS DE SYNTHESE DU NIP 3.	214
TABLEAU IV- 8 : INFLUENCE DE DIFFERENTS PARAMETRES SUR LA FORME ET LA TAILLE DES PARTICULES DE NIP.....	215
TABLEAU IV- 9 : IMAGES MEB DES PARTICULES DE NIP ET DE MIP SYNTHETISEES DANS LES CONDITIONS CITEES DANS LE TABLEAU IV- 7, MAIS AVEC UNE TEMPERATURE DE 60°C ET EN FAISANT VARIER LE VOLUME DE SOLVANT.	217
TABLEAU IV- 10 : IMAGES MEB DES PARTICULES DE NIP ET DE MIP SYNTHETISEES AVEC DU MAA COMME MONOMERE FONCTIONNEL (MF), DE LA COCAÏNE COMME MOLECULE CIBLE (MC) ET UN MELANGE DE EGDMA/DVB (75/25, MOL/MOL) (AR), AVEC DIFFERENTS RATIOS MC/MF/AR DANS DU MeCN.	218
TABLEAU IV- 11 : IMAGES MEB DES PARTICULES DE NIP ET DE MIP SYNTHETISEES AVEC DU MAA COMME MONOMERE FONCTIONNEL (MF), DE LA COCAÏNE COMME MOLECULE CIBLE (MC) ET UN MELANGE DE EGDMA/DVB VARIABLE (AR), DANS DU MeCN.	221
TABLEAU IV- 12 : PROTOCOLES DE PRETRAITEMENT DE CAPILLAIRES EN SILICE POUR LA SYNTHESE DE MONOLITHES IN SITU DE MIP (TAMB : TEMPERATURE AMBIANTE, MIN : MINUTES, H : HEURES, γ -MAPS : γ -METHACRYLOXYPROPYL TRIMETHOXYSIANE, DPPH : HYDRATE DE 2,2-DIPHENYL-1-PICRYLHYDRAZYL, THF : TETRAHYDROFURANE, ADAPTE DE [158]).	225
TABLEAU IV- 13 : CONDITIONS FINALES DE TRAITEMENT DES CAPILLAIRES EN SILICE DE 100 μ M DE DIAMETRE INTERNE, AVANT LEUR REMPLISSAGE AVEC LA SOLUTION DE POLYMERISATION (ADAPTE DE [158]).	226

TABLEAU IV- 14 : CONDITIONS DE SYNTHÈSE INITIALES POUR LA SYNTHÈSE DE MONOLITHES DE NIP OU DE MIP PAR SYNTHÈSE IN SITU DANS DES CAPILLAIRES DE 100 μM DE DIAMÈTRE INTERNE.	230
TABLEAU IV- 15 : CONDITIONS DE SYNTHÈSE FINALES POUR LA SYNTHÈSE DE MONOLITHES DE NIP ET DE MIP IN SITU DANS DES CAPILLAIRES DE 100 μM DE DIAMÈTRE INTERNE.	233
TABLEAU IV- 16 : DETERMINATION DE LA PERMEABILITE DES COLONNES MONOLITHIQUES CAPILLAIRES DE NIP ET DE MIP SYNTHETISEES DANS LES CONDITIONS DU TABLEAU IV- 15, AVEC UN DEBIT DE 200 $\text{NL}\cdot\text{MIN}^{-1}$ DE MECN. POUR LA COLONNE COMMERCIALE CHROMOLITH [®] , LA PHASE MOBILE UTILISEE POUR LA MESURE DE PERMEABILITE EST UN MELANGE EAU/MECN 85/15 V/V A UN DEBIT DE 500 $\text{NL}\cdot\text{MIN}^{-1}$	234
TABLEAU IV- 17 : FACTEURS DE RETENTION CORRESPONDANT AUX TROIS COLONNES CAPILLAIRES DE NIP ET DE MIP SYNTHETISEES DANS LES CONDITIONS DECRITES SUR LE TABLEAU IV- 15. (K_{COC} = FACTEUR DE RETENTION DE LA COCAÏNE, K_{BZE} = FACTEUR DE RETENTION DE LA BZE).	237
TABLEAU IV- 18 : FACTEURS D'IMPRESSIION CORRESPONDANT AUX TROIS COUPLES DE NIP/MIP SYNTHETISES DANS LES CONDITIONS DECRITES SUR LE TABLEAU IV- 15 (I_{COC} = FACTEUR D'IMPRESSIION DE LA COCAÏNE, I_{BZE} = FACTEUR D'IMPRESSIION DE LA BZE).	237
TABLEAU IV- 19 : FACTEURS DE RETENTION (K') ET RESOLUTION OBTENUS POUR LA COCAÏNE ET LA BZE POUR UNE COLONNE CHROMOLITH [®] CAPROD [®] RP18 DE 150MM X 0,1MM A DIFFERENTES COMPOSITIONS DE PHASE MOBILE. $V_{\text{INJECTION}} = 250 \text{ NL}$. INJECTION D'UNE SOLUTION DE COCAÏNE ET BZE A 5 $\mu\text{G}\cdot\text{ML}^{-1}$ EN EAU.	241

Annexes

TABLEAU A1- 1 : PARAMETRES OPTIMISES POUR LA DETECTION DE LA COCAÏNE ET LA BZE SUR LA TRAPPE IONIQUE.	259
TABLEAU A3- 1 : RESUME DES DIMENSIONS ET VOLUMES DE CANAUX D'ENRICHISSEMENT ET DE SEPARATION DES TROIS PUCE UTILISEES POUR CE TRAVAIL.	264

Références :

- [1] Goldstein RA, DesLauriers C, Burda A, Johnson-Arbor K (2009) *Seminars in Diagnostic Pathology* 26:10-17
- [2] U.S. Drug Enforcement Administration
http://www.justice.gov/dea/images_cocaine.html.
- [3] Janicka M, Kot-Wasik A, Namiesnik J (2010) *Trends in Analytical Chemistry* 29:209-224
- [4] Karch SB (2002) *Karch's Pathology of Drug Abuse*. Third edition CRC Press LLC USA, 541 pages.
- [5] Jufer RA, Darwin WD, Cone EJ, Maciej JB (2000) Chapter 2. In: *Handbook of Analytical Separations Elsevier Science B.V.*, pp. 67-106
- [6] Verstraete AG (2002) *Annales de Toxicologie Analytique* 14:390-394
- [7] Warner A, Norman AB (2000) *Therapeutic Drug Monitoring* 22:266-270
- [8] Jatlow P (1988) *The Yale Journal of Biology and Medicine* 61:105-113
- [9] Jagerdeo E, Abdel-Rehim M (2009) *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 20:891-899
- [10] Castiglioni S, Zuccato E, Chiabrando C, Fanelli R, Bagnati R (2008) *Mass Spectrometry Reviews* 27:378-394
- [11] Peterson KL, Logan BK, Christian GD (1995) *Forensic Science International* 73:183-196
- [12] Bones J, Thomas KV, Paull B (2007) *Journal of Environmental Monitoring* 9:701-707
- [13] Needham SR, Jeanville PM, Brown PR, Estape ES (2000) *Journal of Chromatography B* 748:77-87
- [14] Maquille A, Guillaume D, Rudaz S, Veuthey J-L (2009) *Chromatographia* 70:1373-1380
- [15] Virtual Computational Chemistry Laboratory LogP Calculator
<http://www.vcclab.org/lab/alogps/start.html>.
- [16] ACE acidity and basicity calculator
<http://aceorganic.pearsoncmg.com/epoch-plugin/public/pKa.jsp>.
- [17] Badia R, de la Torre R, Corcione S, Segura J (1998) *Clinical Chemistry* 44:790-799
- [18] Antonilli L, Suriano C, Grassi MC, Nencini P (2001) *Journal of Chromatography B* 751:19-27
- [19] Paul BD, Lalani S, Bosy T, Jacobs AJ, Huestis MA (2005) *Biomedical Chromatography* 19:677-688
- [20] Pépin G, Duffort G, Rommel N, Kintz P, Dumestre-Toulet V, Kergueris MF, Lachatre G, Moulsmas M, Goullé JP, Lacroix C, Ricoordel I, Mura P, Vincent F, Gruson A, Gruson A, Lhermitte M, Capolaghi B, Turcant A, Ghysel MH, Corteel P (2003) *Annales de Toxicologie Analytique* 15:108-116
- [21] Cardona PS, Chaturvedi AK, Soper JW, Canfield DV (2006) *Forensic Science International* 157:46-56
- [22] Pragst F, Balikova MA (2006) *Clinica Chimica Acta* 370:17-49
- [23] Wylie FM, Torrance H, Seymour A, Buttress S, Oliver JS (2005) *Forensic Science International* 150:199-204
- [24] Bosker WM, Huestis MA (2009) *Clinical Chemistry* 55:1910-1931

- [25] Kiszka M, Buszewicz G, Madro R (2000) *Problems in Forensic Sciences* 46:7-23
- [26] Dumestre-Toulet V (2002) *Annales de Toxicologie Analytique* 14:43-49
- [27] Moeller MR, Steinmeyer S, Kraemer T (1998) *Journal of Chromatography B* 713:91-109
- [28] Kintz P, Villain M, Cirimele V (2006) *Spectra Analyse* 248:24-17
- [29] De Oliveira CDR, Roehsig M, de Almeida RM, Rocha WL, Yonamine M (2007) *Current Pharmaceutical Analysis* 3:95-109
- [30] Bucelli F, Fratini A, Bavazzano P, Comodo N (2009) *Journal of Chromatography B* 877:3931-3936
- [31] Cordero R, Paterson S (2007) *Journal of Chromatography B* 850:423-431
- [32] Society of Hair Testing (2004) *Forensic Science International* 145:83-84
- [33] Townsend S, Fanning L, O'Kennedy R (2008) *Analytical Letters* 41:925-948
- [34] Brunet B, Barnes A, Scheidweiler K, Mura P, Huestis M (2008) *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 392:115-127
- [35] Valente-Campos S, Yonamine M, Moreau RLdM, Silva OA (2006) *Forensic Science International* 159:218-222
- [36] de Castro A, Concheiro M, Shakleya DM, Huestis MA (2009) *Journal of Chromatography B* 877:3065-3071
- [37] Huerta-Fontela M, Galceran MT, Ventura F (2007) *Analytical Chemistry* 79:3821-3829
- [38] Castiglioni S, Zuccato E, Crisci E, Chiabrando C, Fanelli R, Bagnati R (2006) *Analytical Chemistry* 78:8421-8429
- [39] Kasprzyk-Hordern B, Dinsdale RM, Guwy AJ (2008) *Water Research* 42:3498-3518
- [40] Postigo C, Lopez de Alda MJ, Barceló D (2008) *Trends in Analytical Chemistry* 27:1053-1069
- [41] Yonamine M, Saviano AM (2006) *Biomedical Chromatography* 20:1071-1075
- [42] Cognard E, Bouchonnet S, Staub C (2006) *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41:925-934
- [43] Marchei E, Colone P, Nastasi GG, Calabrò C, Pellegrini M, Pacifici R, Zuccaro P, Pichini S (2008) *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 48:383-387
- [44] Kintz P, Mangin P (1995) *Forensic Science International* 73:93-100
- [45] Fucci N, De Giovanni N, Chiarotti M (2003) *Forensic Science International* 134:40-45
- [46] Lachenmeier K, Musshoff F, Madea B (2006) *Forensic Science International* 159:189-199
- [47] Strano-Rossi S, Colamonici C, Botrè F (2008) *Analytica Chimica Acta* 606:217-222
- [48] Ortuño J, De La Torre R, Segura J, Camí J (1990) *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 8:911-914
- [49] Virag L, Jamdar S, Chao CR, Morishima HO (1994) *Journal of Chromatography B* 658:135-141
- [50] Lacroix C, Saussereau E, Bodin G, Goullé JP (2008) *Annales de Toxicologie Analytique* 20:25-38
- [51] Mercolini L, Mandrioli R, Saladini B, Conti M, Baccini C, Raggi MA (2008) *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 48:456-461
- [52] Fernández P, Morales L, Vázquez C, Bermejo AM, Tabernero MJ (2006) *Forensic Science International* 161:31-35

- [53] Jeanville PM, Estapé ES, Needham SR, Cole MJ (2000) *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 11:257-263
- [54] Hummel D, Loffler D, Fink G, Ternes TA (2006) *Environmental Science and Technology* 40:7321-7328
- [55] López P, Martello S, Bermejo A, De Vincenzi E, Tabernero M, Chiarotti M (2010) *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397:1539-1548
- [56] Jatlow P, Nadim H (1990) *Clinical Chemistry* 36:1436-1439
- [57] Ferreirós Bouzas N, Dresen S, Munz B, Weinmann W (2009) *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 395:2499-2507
- [58] Puopolo P, Chamberlin P, Flood J (1992) *Clinical Chemistry* 38:1838-1842
- [59] Tagliaro F, Antonioli C, De Battisti Z, Ghielmi S, Marigo M (1994) *Journal of Chromatography A* 674:207-215
- [60] Quintela O, Lendoiro E, Cruz A, de Castro A, Quevedo A, Jurado C, López-Rivadulla M (2010) *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396:1703-1712
- [61] Gheorghe A, van Nuijs A, Pecceu B, Bervoets L, Jorens P, Blust R, Neels H, Covaci A (2008) *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391:1309-1319
- [62] Sun L, Hall G, Lau CE (2000) *Journal of Chromatography B* 745:315-323
- [63] Fernández P, Morales L, Vázquez C, Lago M, Bermejo A. M. (2008) *Journal of Applied Toxicology* 28:998-1003
- [64] Foulon C, Menet M, Manuel N, Pham-Huy C, Galons H, Claude J, Guyon F (1999) *Chromatographia* 50:721-727
- [65] da Costa JL, Tonin FG, Zanolli LA, da Matta Chasin AA, Maggi Tavares MF (2009) *Electrophoresis* 30:2238-2244
- [66] Concheiro M, Gray T, Shakleya D, Huestis M (2010) *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398:915-924
- [67] Nováková L, Vlcková H (2009) *Analytica Chimica Acta* 656:8-35
- [68] Badoud F, Grata E, Perrenoud L, Avois L, Saugy M, Rudaz S, Veuthey JL (2009) *Journal of Chromatography A* 1216:4423-4433
- [69] Berg T, Lundanes E, Christophersen AS, Strand DH (2009) *Journal of Chromatography B* 877:421-432
- [70] Caufield WV, Stewart JT (2002) *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 25:2977-2998
- [71] Mikuš P, Maráková K (2009) *Electrophoresis* 30:2773-2802
- [72] Tagliaro F, Manetto G, Crivellente F, Scarcella D, Marigo M (1998) *Forensic Science International* 92:201-211
- [73] Bouchoux G, Sablier M (2005) *Les techniques de l'ingénieur* P2645:1-32
- [74] Monégier B (1997) *Techniques de l'Ingénieur* PE 3350
- [75] Lemiere F (2001) *LC-GC Europe* dec 2
- [76] Cleon P, D'Angeli D (2005) *Spectra Analyse* 242:13-25
- [77] Lemiere F (2001) *LC-GC Europe* dec 2
- [78] Taylor PJ (2005) *Clinical Biochemistry* 38:328-334
- [79] King R, Bonfiglio R, Fernandez-Metzler C, Miller-Stein C, Olah T (2000) *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 11:942-950
- [80] Annesley TM (2003) *Clin Chem* 49:1041-1044
- [81] Dams R, Huestis MA, Lambert WE, Murphy CM (2003) *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 14:1290-1294
- [82] Polson C, Sarkar P, Incledon B, Raguvaran V, Grant R (2003) *Journal of Chromatography B* 785:263-275
- [83] Souverain S, Rudaz S, Veuthey JL (2004) *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 35:913-920

- [84] Johansen SS, Bhatia HM (2007) *Journal of Chromatography B* 852:338-344
- [85] Jagerdeo E, Montgomery MA, LeBeau MA, Sibum M (2008) *Journal of Chromatography B* 874:15-20
- [86] Sergi M, Bafile E, Compagnone D, Curini R, D'Ascenzo G, Romolo F (2009) *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 393:709-718
- [87] Bjørk M, Nielsen M, Markussen L, Klinke H, Linnet K (2010) *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396:2393-2401
- [88] Chang MS, Ji Q, Zhang J, El-Shourbagy TA (2007) *Drug Development Research* 68:107-133
- [89] Hopfgartner G, Bourgoigne E (2003) *Mass Spectrometry Reviews* 22:195-214
- [90] Rofael HZ, Abdel-Rahman MS (2002) *Journal of Applied Toxicology* 22:123-128
- [91] Pan W-j, Hedaya MA (1997) *Journal of Chromatography B* 703:129-138
- [92] Ma F, Zhang J, Lau CE (1997) *Journal of Chromatography B* 693:307-312
- [93] Garside D, Goldberger BA, Preston KL, Cone EJ (1997) *Journal of Chromatography B* 692:61-65
- [94] Hennion M-C (1999) *Journal of Chromatography A* 856:3-54
- [95] Humbert L (2010) *Annales de Toxicologie Analytique* 22:61-68
- [96] Pichon V (2007) *Les techniques de l'ingénieur P1420*:1-13
- [97] Majors RE (2007) *LC-GC North America* 25
- [98] Souverain S, Rudaz S, Veuthey JL (2004) *Journal of Chromatography B* 801:141-156
- [99] Fernández P, Aldonza M, Bouzas A, Lema M, Bermejo AM, Tabernero MJ (2006) *Journal of Applied Toxicology* 26:253-257
- [100] Bijlsma L, Sancho JV, Pitarch E, Ibáñez M, Hernández F (2009) *Journal of Chromatography A* 1216:3078-3089
- [101] Maralikova B, Weinmann W (2004) *Journal of Chromatography B* 811:21-30
- [102] Zeng H, Wu J-T, Unger SE (2002) *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 27:967-982
- [103] Wylie FM, Torrance H, Anderson RA, Oliver JS (2005) *Forensic Science International* 150:191-198
- [104] Brunetto MR, Cayama YD, García LG, Galignani M, Obando MA (2005) *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 37:115-120
- [105] Fernández P, Vázquez C, Morales L, Bermejo AM (2005) *Journal of Applied Toxicology* 25:200-204
- [106] Clauwaert KM, Van Bocxlaer JF, Lambert WE, Van den Eeckhout EG, Lemiére F, Esmans EL, De Leenheer AP (1998) *Analytical Chemistry* 70:2336-2344
- [107] Wood M, Laloup M, Fernandez MdMR, Jenkins KM, Young MS, Ramaekers JG, Boeck GD, Samyn N (2005) *Forensic Science International* 150:227-238
- [108] Mortier KA, Maudens KE, Lambert WE, Clauwaert KM, Van Bocxlaer JF, Deforce DL, Van Peteghem CH, De Leenheer AP (2002) *Journal of Chromatography B* 779:321-330
- [109] Zuccato E, Chiabrando C, Castiglioni S, Calamari D, Bagnati R, Schiarea S, Fanelli R (2005) *Environmental Health: A Global Access Science Source* 4:14
- [110] Wu J-T (2001) *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 15:73-81
- [111] Svec F (2006) *Journal of Chromatography B* 841:52-64
- [112] Stryer L (1988) *Biochemistry*. W.H. Freeman Company / New York
- [113] Hennion MC, Pichon V (2003) *Journal of Chromatography A* 1000:29-52

- [114] Hammett-Stabler CA, Pesce AJ, Cannon DJ (2002) *Clinica Chimica Acta* 315:125-135
- [115] Madru B (2010) Développement d'un support d'extraction sélective à base d'aptamères : synthèse, caractérisation et application à des matrices complexes. In: *Laboratoire Sciences Analytiques Bioanalytiques et Miniaturisation - ESPCI - PECSA Université Pierre et Marie Curie, Paris*
- [116] Ellington AD, Szostak JW (1990) *Nature* 346:818-822
- [117] Tuerk C, Gold L (1990) *Science* 249:505-510
- [118] Madru B, Chapuis-Hugon F, Peyrin E, Pichon Vr (2009) *Analytical Chemistry* 81:7081-7086
- [119] Stojanovic MN, Landry DW (2002) *Journal of the American Chemical Society* 124:9678-9679
- [120] Caro E, Marcé RM, Borrull F, Cormack PAG, Sherrington DC (2006) *Trends in Analytical Chemistry* 25:143-154
- [121] Cormack PAG, Elorza AZ (2004) *Journal of Chromatography B* 804:173-182
- [122] Cameron Alexander HSA, Lars I. Andersson, Richard J. Ansell, Nicole Kirsch, Ian A. Nicholls, John O'Mahony, Michael J. Whitcombe, (2006) *Journal of Molecular Recognition* 19:106-180
- [123] Ye L, Mosbach K (2008) *Chemistry of Materials*. 20:859-868
- [124] Sellergren B (2001) *Molecularly Imprinted Polymers - Man-made mimics of antibodies and their applications in analytical chemistry*. Elsevier 2001, 557pages.
- [125] Pichon V (2007) *Journal of Chromatography A* 1152:41-53
- [126] Hugon-Chapuis F., Pichon V (2007) *Annales de Toxicologie Analytique* 19:239-251
- [127] Pichon V, Chapuis-Hugon F (2008) *Analytica Chimica Acta* 622:48-61
- [128] Lu Y, Li C, Wang X, Sun P, Xing X (2004) *Journal of Chromatography B* 804:53-59
- [129] He C, Long Y, Pan J, Li K, Liu F (2007) *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 70:133-150
- [130] Chapuis F, Pichon V, Lanza F, Sellergren B, Hennion MC (2004) *Journal of Chromatography B* 804:93-101
- [131] Zurutuza A, Bayouhd S, Cormack PAG, Dambies L, Deere J, Bischoff R, Sherrington DC (2005) *Analytica Chimica Acta* 542:14-19
- [132] Piletska EV, Romero-Guerra M, Guerreiro AR, Karim K, Turner APF, Piletsky SA (2005) *Analytica Chimica Acta* 542:47-51
- [133] Piletska EV, Romero-Guerra M, Chianella I, Karim K, Turner APF, Piletsky SA (2005) *Analytica Chimica Acta* 542:111-117
- [134] Piletska EV, Guerreiro AR, Romero-Guerra M, Chianella I, Turner APF, Piletsky SA (2008) *Analytica Chimica Acta* 607:54-60
- [135] Tüdos AJ, Besselink GAJ, Schasfoort RBM (2001) *Lab on a Chip* 1:83-95
- [136] Björklund E, von Holst C, Anklam E (2002) *Trends in Analytical Chemistry* 21:40-53
- [137] Xu L, Basheer C, Lee HK (2007) *Journal of Chromatography A* 1152:184-192
- [138] de Jager LS, Andrews ARJ (2001) *Journal of Chromatography A* 911:97-105
- [139] Fang H, Zeng Z, Liu L, Pang D (2005) *Analytical Chemistry* 78:1257-1263
- [140] Chen Y, Guo Z, Wang X, Qiu C (2008) *Journal of Chromatography A* 1184:191-219
- [141] de Jager L, Andrews ARJ (2002) *Analytica Chimica Acta* 458:311-320
- [142] de Jager LS, Andrews ARJ (2001) *Analyst* 126:1298-1303

- [143] Álvarez I, Bermejo AM, Tabernero MJ, Fernández P, López P (2007) *Journal of Chromatography B* 845:90-94
- [144] Yonamine M, Saviano AM (2006) *Biomedical Chromatography* 20:1071-1075
- [145] Gentili S, Cornetta M, Macchia T (2004) *Journal of Chromatography B* 801:289-296
- [146] Lan L, Hu B, Yu C (2010) *Journal of Chromatography A* 1217:7003-7009
- [147] Lachenmeier DW, Kroener L, Musshoff F, Madea B (2003) *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 17:472-478
- [148] Altun Z, Blomberg LG, Jagerdeo E, Abdelâ€ Rehim M (2006) *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 29:829-839
- [149] Prieto A, Schrader S, Bauer C, Möder M (2011) *Analytica Chimica Acta* 685:146-152
- [150] Prieto A, Vallejo A, Zuloaga O, Paschke A, Sellergen B, Schillinger E, Schrader S, Möder M (2011) *Analytica Chimica Acta* 703:41-51
- [151] Hernández-Borges J, Aturki Z, Rocco A, Fanali S (2007) *Journal of Separation Science* 30:1589-1610
- [152] Faure K (2010) *ELECTROPHORESIS* 31:2499-2511
- [153] Noga M, Sucharski F, Suder P, Silberring J (2007) *Journal of Separation Science* 30:2179-2189
- [154] Piraino SM, Dorsey JG (2003) *Analytical Chemistry* 75:4292-4296
- [155] Mayer M, Rapp E, Marck C, Bruin GJM (1999) *Electrophoresis* 20:43-49
- [156] Fanali S, Aturki Z, Kaicka V, Raggi MA, D'Orazio G (2005) *Journal of Separation Science* 28:1719-1728
- [157] Phillips TM, Smith PD (2002) *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 25:2889-2900
- [158] Bel Hadj-Kaabi F (2008) Développement et caractérisation de polymères à empreintes moléculaires pour l'extraction de composés pharmaceutiques à l'état de traces dans les fluides biologiques. Miniaturisation du format de synthèse et couplage en-ligne à la nano-chromatographie. In: *Laboratoire Sciences Analytiques Bioanalytiques et Miniaturisation - ESPCI - PECSA Université Pierre et Marie Curie, Paris*, p. 218
- [159] Shi XX, Xu L, Duan HQ, Huang YP, Liu ZS *Electrophoresis* 32:1348-1356
- [160] Kapnissi-Christodoulou CP, Zhu X, Warner IM (2003) *Electrophoresis* 24:3917-3934
- [161] Nilsson S, Schweitz L, Petersson M (1997) *Electrophoresis* 18:884-890
- [162] Zaidi SA, Han KM, Hwang DG, Cheong WJ *Electrophoresis* 31:1019-1028
- [163] Saunders KC, Ghanem A, Boon Hon W, Hilder EF, Haddad PR (2009) *Analytica Chimica Acta* 652:22-31
- [164] Wu Ra, Hu L, Wang F, Ye M, Zou H (2008) *Journal of Chromatography A* 1184:369-392
- [165] Peng Y, Pallandre A, Tran NT, Taverna M (2008) *Electrophoresis* 29:157-178
- [166] Culbertson CT, Jacobson SC, Ramsey JM (2000) *Analytical Chemistry* 72:5814-5819
- [167] Manz A, Miyahara Y, Miura J, Watanabe Y, Miyagi H, Sato K (1990) *Sensors and Actuators B: Chemical* 1:249-255
- [168] Jacobson SC, Hergenroeder R, Koutny LB, Ramsey JM (1994) *Analytical Chemistry* 66:2369-2373
- [169] Pumera M (2005) *Talanta* 66:1048-1062
- [170] Gaspar A, Hernandez L, Stevens S, Gomez FA (2008) *Electrophoresis* 29:1638-1642

- [171] Slentz BE, Penner NA, Regnier FE (2002) *Journal of Chromatography A* 948:225-233
- [172] Illa X, De Malsche W, Bomer J, Gardeniers H, Eijkel J, Morante JR, Romano-Rodriguez A, Desmet G (2009) *Lab on a Chip* 9:1511-1516
- [173] Gaspar A, Piyasena ME, Gomez FA (2007) *Analytical Chemistry* 79:7906-7909
- [174] Tabeling P (2003) *Introduction à la microfluidique*. Belin collection Echelles 256 pages.
- [175] Xu L, Shi Z-G, Feng Y-Q (2011) *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 399:3345-3357
- [176] Wu Q, Bienvenue JM, Hassan BJ, Kwok YC, Giordano BC, Norris PM, Landers JP, Ferrance JP (2006) *Analytical Chemistry* 78:5704-5710
- [177] Tan A, Benetton S, Henion JD (2003) *Analytical Chemistry* 75:5504-5511
- [178] Ishida A, Yoshikawa T, Natsume M, Kamidate T (2006) *Journal of Chromatography A* 1132:90-98
- [179] Chapuis F (2004) *Immunoadsorbants et polymères à empreintes moléculaires pour l'extraction sélective de composés de matrices environnementales et biologiques: synthèse et caractérisation en vue de leur intégration au système total d'analyse*. In: *Laboratoire Sciences Analytiques Bioanalytiques et Miniaturisation - ESPCI - PECSA Université Pierre et Marie Curie, Paris*, p. 256
- [180] Proczek G, Augustin V, Descroix S, Hennion M-C (2009) *Electrophoresis* 30:515-524
- [181] Phillips TM, Wellner EF (2007) *Electrophoresis* 28:3041-3048
- [182] Yang W, Sun X, Wang H-Y, Woolley AT (2009) *Analytical Chemistry* 81:8230-8235
- [183] Yin H, Killeen K, Brennen R, Sobek D, Werlich M, van de Goor T (2004) *Analytical Chemistry* 77:527-533
- [184] Buckenmaier S, Vollmer M, Trojer L, Emotte C (2008) *The Column* May 2008:20-25
- [185] Brochure produit du site internet d'Agilent
<http://www.chem.agilent.com/Library/brochures/5990-6221EN.pdf>.
- [186] Flamini R, De Rosso M, Smaniotto A, Panighel A, Vedova AD, Seraglia R, Traldi P (2009) *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 23:2891-2896
- [187] Groleau PE, Desharnais P, Côté L, Ayotte C (2008) *Journal of Mass Spectrometry* 43:924-935
- [188] Vollmer M, Hörth P, Rozing G, Couté Y, Grimm R, Hochstrasser D, Sanchez J-C (2006) *Journal of Separation Science* 29:499-509
- [189] Niñonuevo MR, Perkins PD, Francis J, Lamotte LM, LoCascio RG, Freeman SL, Mills DA, German JB, Grimm R, Lebrilla CB (2007) *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:618-626
- [190] Staples GO, Bowman MJ, Costello CE, Hitchcock AM, Lau JM, Leymarie N, Miller C, Naimy H, Shi X, Zaia J (2009) *Proteomics* 9:686-695
- [191] Chu CS, Niñonuevo MR, Clowers BH, Perkins PD, An HJ, Yin H, Killeen K, Miyamoto S, Grimm R, Lebrilla CB (2009) *Proteomics* 9:1939-1951
- [192] Mohammed S, Kraiczek K, Pinkse MWH, Lemeer S, Benschop JJ, Heck AJR (2008) *Journal of Proteome Research* 7:1565-1571
- [193] Ghitun M, Bonneil E, Fortier M-H, Yin H, Killeen K, Thibault P (2006) *Journal of Separation Science* 29:1539-1549
- [194] Brambilla F, Resta D, Isak I, Zanotti M, Arnoldi A (2009) *Proteomics* 9:272-286

- [195] Srbek J, Eickhoff J, Effelsberg U, Kraiczek K, Goor Tvd, Coufal P (2007) *Journal of Separation Science* 30:2046-2052
- [196] Hardouin J, Joubert-Caron R, Caron M (2007) *Journal of Separation Science* 30:1482-1487
- [197] Staes A, Timmerman E, Damme JV, Helsens K, Vandekerckhove J, Vollmer M, Gevaert K (2007) *Journal of Separation Science* 30:1468-1476
- [198] Catalogue en ligne des produits Eksigent
<http://www.eksigent.com/hplc/productS/BanoLC/nanoflex.php>.
- [199] Hongfeng Yin KK (2007) *Journal of Separation Science* 30:1427-1434
- [200] Smith N, Evans M (1994) *Chromatographia* 38:649-657
- [201] Ghitun M, Bonneil E, Côté L, Gauthier GL, Thibault P (2006) *Agilent Application Notes* 5989-5222EN
- [202] Hill V, Cairns T, Schaffer M (2008) *Forensic Science International* 176:23-33
- [203] Chapuis-Hugon F, Cruz-Vera M, Savane R, Ali WH, Valcarcel M, Deveaux M, Pichon V (2009) *Journal of Separation Science* 32:3301-3309
- [204] Tsanaclis L, Wicks JFC (2008) *Forensic Science International* 176:19-22
- [205] Wilson JF, Smith BL, Toseland PA, Watson ID, Williams J, Thomson AH, Capps NE, Sweeney G, Sandle LN (2001) *Forensic Science International* 119:23-27
- [206] Chapuis F, Mullot JU, Pichon V, Tuffal G, Hennion M-C (2006) *Journal of Chromatography A* 1135:127-134
- [207] Ye NS, Wang XB, Wang JF, Gu XX (2010) *Chinese Journal of Applied Chemistry* 27:1221-1224
- [208] Bel Hadj Kaabi F., Pichon V (2007) *LC-GC Europe* Jul 1
- [209] Pérez-Moral N, Mayes AG (2002) *Bioseparation* 10:287-299
- [210] Dowding PJ, Vincent B (2000) *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 161:259-269
- [211] Özcan AA, Say R, Denizli A, Ersöz A (2006) *Analytical Chemistry* 78:7253-7258
- [212] Lai J-P, Niessner R, Knopp D (2004) *Analytica Chimica Acta* 522:137-144
- [213] Hu S-G, Li L, He X-W (2005) *Analytica Chimica Acta* 537:215-222
- [214] Mayes AG, Mosbach K (1996) *Anal. Chem.* 68:3769-3774
- [215] Kempe H, Kempe M (2004) *Macromolecular Rapid Communications* 25:315-320
- [216] Arshady R (1992) *Colloid & Polymer Science* 270:717-732
- [217] Serra C. A. CZ (2008) *Chemical Engineering & Technology* 31:1099-1115
- [218] Seo M, Nie Z, Xu S, Mok M, Lewis PC, Graham R, Kumacheva E (2005) *Langmuir* 21:11614-11622
- [219] Song H, Chen DL, Ismagilov RF (2006) *Angewandte Chemie International Edition* 45:7336-7356
- [220] Zourob M. MS, Mayes A.G., Macaskill A., Pérez-Moral N., Fielden P.R., Goddard N.J. (2006) *Lab on a Chip* 6:296-301
- [221] Kubo A, Shinmori H, Takeuchi T (2006) *Chemistry Letters* 35:588-589
- [222] Roeseling D, Tuercke T, Krause H, Loebbecke S (2009) *Organic Process Research & Development* 13:1007-1013
- [223] Ugelstad J, Mørk PC, Kaggerud KH, Ellingsen T, Berge A (1980) *Advances in Colloid and Interface Science* 13:101-140
- [224] Hosoya K, Yoshizako K, Tanaka N, Kimata K, Araki T, Haginaka J (1994) *Chemistry Letters* 23:1437-1438
- [225] Haginaka J (2008) *Journal of Chromatography B* 866:3-13

- [226] Turiel E, Martín-Esteban A (2004) *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378:1876-1886
- [227] Sanbe H, Haginaka J (2003) *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 30:1835-1844
- [228] Sambe H, Hoshina K, Hosoya K, Haginaka J (2006) *Journal of Chromatography A* 1134:16-23
- [229] Haginaka J, Sanbe H (2001) *Journal of Chromatography A* 913:141-146
- [230] Haginaka J, Sakai Y (2000) *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 22:899-907
- [231] Haginaka J, Sanbe H (2000) *Analytical Chemistry* 72:5206-5210
- [232] Sanbe H, Haginaka J (2003) *Analyst* 128:593-597
- [233] Ye L, Mosbach K (2001) *Reactive and Functional Polymers* 48:149-157
- [234] Ye L, CPAG, Mosbach K. (1999) *Analytical Communications* 36:35-38
- [235] Halary JL, Laupêtre F (2006) *De la macromolécule au matériau polymère: Synthèse et propriétés des chaînes*. Belin 334 pages.
- [236] Surugiu I, Ye L, Yilmaz E, Anatoli D, Danielsson B, Mosbach K, Haupt K (2000) *The Analyst Communication* 125:13-16
- [237] Ping Li FR, Chunwei Yuan, (2003) *Polymer International* 52:1799-1806
- [238] Yong Jiang A-JT (2004) *Journal of Applied Polymer Science* 94:542-547
- [239] Bompert M, Gheber LA, De Wilde Y, Haupt K (2009) *Biosensors and Bioelectronics* 25:568-571
- [240] Lai J-P, Yang M-L, Niessner R, Knopp D (2007) *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389:405-412
- [241] Jin Y, Jiang M, Shi Y, Lin Y, Peng Y, Dai K, Lu B (2008) *Analytica Chimica Acta* 612:105-113
- [242] Jiang M, Zhang J-h, Mei S-r, Shi Y, Zou L-j, Zhu Y-x, Dai K, Lu B (2006) *Journal of Chromatography A* 1110:27-34
- [243] Oxelbark J, Legido-Quigley C, Aureliano CSA, Titirici M-M, Schillinger E, Sellergren B, Courtois J, Irgum K, Dambies L, Cormack PAG, Sherrington DC, De Lorenzi E (2007) *Journal of Chromatography A* 1160:215-226
- [244] Ye L, Weiss R, Mosbach K (2000) *Macromolecules* 33:8239-8245
- [245] Beltran A, Marcé RM, Cormack PAG, Borrull F (2009) *Journal of Chromatography A* 1216:2248-2253
- [246] Javanbakht M, Eynollahi Fard S, Abdouss M, Mohammadi A, Reza Ganjali M, Norouzi P, Safaraliev L (2008) *Electroanalysis* 20:2023-2030
- [247] Gallego-Gallegos M, Munoz-Olivas R, Carmen C (2009) *Journal of Environmental Management* 90:S69-S76
- [248] Turiel E, Martín-Esteban A, Tadeo JL (2007) *Journal of Chromatography A* 1172:97-104
- [249] Yan S, Fang Y, Gao Z (2007) *Biosensors and Bioelectronics* 22:1087-1091
- [250] Wang L, Zhang Z, Huang L (2008) *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 390:1431-1436
- [251] Wang L, Zhang Z (2008) *Sensors and Actuators B: Chemical* 133:40-45
- [252] de Boer TRM, de Zeeuw RA, de Jong GJ, Sherrington DC, Cormack PAG, Ensing K, (2002) *Electrophoresis* 23:1296-1300
- [253] Zhang Z, Liu Y, Long Y, Nie L, Yao S (2004) *Analytical Sciences* 20:291-295
- [254] Ye L, Cormack PAG, Mosbach K (2001) *Analytica Chimica Acta* 435:187-196
- [255] Wei S, Molinelli A, Mizaikoff B (2006) *Biosensors and Bioelectronics* 21:1943-1951

- [256] Zhu Q, Wang L, Wu S, Joseph W, Gu X, Tang J (2009) *Food Chemistry* 113:608-615
- [257] Tamayo FG, Casillas JL, Martin-Esteban A (2003) *Analytica Chimica Acta* 482:165-173
- [258] Kan X, Zhao Q, Zhang Z, Wang Z, Zhu J-J (2008) *Talanta* 75:22-26
- [259] Javanbakht M, Fard SE, Mohammadi A, Abdouss M, Ganjali MR, Norouzi P, Safaraliev L (2008) *Analytica Chimica Acta* 612:65-74
- [260] Tamayo FG, Casillas JL, Martin-Esteban A (2005) *Journal of Chromatography A* 1069:173-181
- [261] Carabias-Martínez R, Herrero-Hernández E, Díaz-García ME, (2005) *Journal of Separation Science* 28:453-461
- [262] Yan S, Gao Z, Fang Y, Cheng Y, Zhou H, Wang H (2007) *Dyes and Pigments* 74:572-577
- [263] Tang K, Chen S, Gu X, Wang H, Dai J, Tang J (2008) *Analytica Chimica Acta* 614:112-118
- [264] Ho KC, Yeh WM, Tung TS, Liao JY (2005) *Analytica Chimica Acta* 542:90-96
- [265] Otero-Romaní J, Moreda-Piñeiro A, Bermejo-Barrera P, Martin-Esteban A (2008) *Analytica Chimica Acta* 630:1-9
- [266] Sambe H, Hoshina K, Moaddel R, Wainer IW, Haginaka J (2006) *Journal of Chromatography A* 1134:88-94
- [267] Pérez-Moral N, Mayes AG (2004) *Analytica Chimica Acta* 504:15-21
- [268] Yoshimatsu K, Reimhult K, Krozer A, Mosbach K, Sode K, Ye L (2007) *Analytica Chimica Acta* 584:112-121
- [269] Castell OK, Allender CJ, Barrow DA (2006) *Biosensors and Bioelectronics* 22:526-533
- [270] Schweitz L, Spégel P, Nilsson S (2000) *The Analyst Communication* 125:1899-1901
- [271] Ye L, Surugiu I, Haupt K (2002) *Analytical Chemistry* 74:959-964
- [272] Spégel PLS, Nilsson S, (2001) *Electrophoresis* 22:3833-3841
- [273] Cacho C, Turiel E, Martin-Esteban A, Pérez-Conde C, Cámara C (2004) *Journal of Chromatography B* 802:347-353
- [274] Carabias-Martínez R, Rodríguez-Gonzalo E, Herrero-Hernández E (2005) *Journal of Chromatography A* 1085:199-206
- [275] Carabias-Martínez R, Rodríguez-Gonzalo E, Herrero-Hernández E (2006) *Analytica Chimica Acta* 559:186-194
- [276] Cacho C, Turiel E, Martín-Esteban A, Pérez-Conde C, Cámara C (2003) *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 376:491-496
- [277] Puoci FI, Muzzalupo R, Spizzirri UG, Trombino S, Cassano R, Picci N, (2004) *Macromolecular Bioscience* 4:22-26
- [278] Hu MI, Jiang M, Wang P, Mei SR, Lin YF, Hu XZ, Shi Y, Lu B, Dai K (2007) *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387:1007-1016
- [279] Jing T, Gao XD, Wang P, Wang Y, Lin YF, zong XC, Zhou YK, Mei SR (2007) *Chinese Chemical Letters* 18:1535-1538
- [280] Wang J, Cormack PAG, Sherrington DC, Khoshdel E (2003) *Angewandte Chemie International Edition* 42:5336-5338
- [281] Turiel E, Tadeo JL, Cormack PAG, Martin-Esteban A (2005) *The Analyst* 130:1601-1607
- [282] Feng Q, Zhao L, Lin JM (2009) *Analytica Chimica Acta* 650:70-76
- [283] Feng QZ, Zhao LX, Chu BL, Yan W, Lin JM (2008) *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 392:1419-1429

- [284] Chaitidou S, Kotrotsiou O, Kotti K, Kammona O, Bukhari M, Kiparissides C (2008) *Materials Science and Engineering B* 152:55-59
- [285] Tse Sum Bui B, Haupt K *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398:2481-2492
- [286] Hjertén S (1985) *Journal of Chromatography A* 347:191-198
- [287] Gusev I, Huang X, Horváth C (1999) *Journal of Chromatography A* 855:273-290
- [288] Lin J-M, Nakagama T, Uchiyama K, Hobo T (1997) *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 15:1351-1358
- [289] Yan W, Gao R, Zhang Z, Wang Q, Jiang CV, Yan C (2003) *Journal of Separation Science* 26:555-561
- [290] Schweitz L, Andersson LI, Nilsson S (1997) *Journal of Chromatography A* 792:401-409