



**HAL**  
open science

# Développement de nouvelles méthodologies de préconcentration électrocinétique in-situ en électrophorèse capillaire pour l'analyse de traces

Philippe Anrès

► **To cite this version:**

Philippe Anrès. Développement de nouvelles méthodologies de préconcentration électrocinétique in-situ en électrophorèse capillaire pour l'analyse de traces. Chimie analytique. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : . pastel-00744659

**HAL Id: pastel-00744659**

**<https://pastel.hal.science/pastel-00744659>**

Submitted on 23 Oct 2012

**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**

Spécialité : Chimie analytique  
(ED 388)

Présentée par

M. Philippe Anres

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE**

# **Développement de nouvelles méthodologies de préconcentration électrocinétique in-situ en électrophorèse capillaire pour l'analyse de traces**

Date de soutenance prévue le 20 septembre 2012

devant le jury composé de :

M. Serge Rudaz

Rapporteur

Mme. Claire Demesmay

Rapporteur

Mme. Valérie Pichon

Examineur

Mr. Eric Peyrin

Examineur

Pierre Gareil

Directeur de thèse

Mme Nathalie Delaunay

Examineur

*Si tu veux comprendre le mot bonheur, il faut l'entendre comme récompense  
et non comme but.*

Antoine de Saint Exupéry

## **Remerciements**

Ce travail a été réalisé au Laboratoire PECSA dirigé par le Professeur Pierre Levitz, au sein de l'équipe du Professeur Pierre Gareil accueillie dans les locaux de Chimie ParisTech (dirigée par le Professeur Valérie Cabuil). Le financement du contrat doctoral a été assuré par l'Université Pierre et Marie Curie (Paris VI). Je remercie donc toutes ces instances et personnes, car sans leur accueil ce travail n'aurait pas été possible.

Je tiens à remercier vivement le Professeur Pierre Gareil, directeur de thèse, pour m'avoir accueilli dans son équipe. Je le remercie de toute l'attention, l'intérêt et la disponibilité qu'il a manifestés pendant ces trois ans. Merci beaucoup aussi pour la qualité des rapports humains au quotidien.

Je voudrais aussi remercier le Docteur Nathalie Delaunay qui a co-encadré ce travail pendant trois ans. Merci pour ses conseils tout au long de notre collaboration.

J'adresse mes plus sincères remerciements au Professeur Claire Demesmay et au Professeur Serge Rudaz pour avoir accepté de juger ce travail en qualité de rapporteur. Je remercie aussi le Professeur Eric Peyrin de l'Université de Grenoble pour avoir accepté de faire partie du jury de thèse, de son accueil pendant deux jours dans son équipe et de tous les conseils qu'il m'a donnés pour les travaux qui concernent l'utilisation des aptamères. Merci aussi au Professeur Valérie Pichon pour avoir accepté de faire partie du jury de thèse.

Je tiens aussi à remercier le Professeur Wolfgang Thormann de l'Université de Bern (Suisse) qui m'a accueilli dans son équipe pendant trois jours afin d'effectuer les travaux de simulation. Un grand merci au Docteur Jérôme Vial du Laboratoire PECSA de l'ESPCI pour toute l'aide qu'il nous a fournie concernant l'utilisation des outils statistiques et chimiométriques.

Je tiens à remercier toutes les personnes du laboratoire PECSA basées à l'ESPCI pour leur accueil lorsque j'ai dû me rendre à plusieurs reprises dans leurs locaux. Enfin, je tiens à remercier Ludivine Ferey et Elodie Alinat (doctorantes de l'équipe de Pierre Gareil) pour leur bonne humeur au quotidien pendant cette dernière année de thèse.

## SOMMAIRE

<i>INTRODUCTION GENERALE</i> .....	8
<i>PARTIE I- ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</i> .....	9
Liste des abréviations .....	11
I.1. Introduction.....	13
I.2. Considérations générales sur les phénomènes de migration, d'ajustement des concentrations et de dispersion en électrophorèse capillaire .....	14
I.2.1 Densité de courant et champ électrique .....	14
I.2.2 L'écoulement électroosmotique (EOF).....	15
I.2.3 La vitesse électrophorétique .....	16
I.2.4 Vitesse d'un soluté en présence d'une phase micellaire .....	17
I.2.5 Fonction de régulation de Kohlrausch .....	18
I.2.6 Les phénomènes dispersifs en CE.....	19
I.3. Préconcentration par amplification du champ électrique.....	21
I.3.1 Préconcentration par amplification du champ électrique avec injection hydrodynamique.....	21
I.3.2 Préconcentration par amplification du champ électrique avec injection d'un très grand volume d'échantillon.....	23
I.3.2.1 Préconcentration par amplification du champ électrique avec injection d'un très grand volume d'échantillon avec changement de polarité .....	23
I.3.2.2 Préconcentration par amplification du champ électrique avec injection d'un très grand volume d'échantillon sans changement de polarité .....	25
I.3.3 Préconcentration par amplification du champ électrique et injection électrocinétique.....	26
I.3.3.1 Amplification du champ électrique en tête de capillaire avec une injection électrocinétique .....	27
I.3.3.2 Amplification du champ électrique pendant l'injection électrocinétique de l'échantillon après introduction d'une grande zone de faible conductivité éliminée par l'écoulement électroosmotique .....	29
I.3.3.3. Amplification du champ électrique à l'injection avec de longues injections électrocinétiques.....	30
I.3.3.4 Déplétion provoquée par les longues injections électrocinétiques .....	31
I.3.4. Préconcentration par amplification du champ électrique et médiation du pH.....	32
I.3.5. Préconcentration par isotachophorèse capillaire.....	33
I.4. Préconcentration par déplacement d'équilibres chimiques.....	36
I.4.1. Préconcentration par changement du degré d'ionisation par changement de pH.....	36
I.4.2. Préconcentration par extraction dynamique par une phase micellaire.....	37
I.4.3. Préconcentration par déplacement d'un équilibre de distribution micellaire par un changement de composition hydroorganique.....	40
I.5. Conclusions sur l'application des méthodes de préconcentration .....	43
I.6. Couplage des méthodes de préconcentration .....	44

I.6.1 Couplage du FESI avec la t-ITP .....	45
I.6.2. Couplage du FESI avec le <i>sweeping</i> .....	47
I.6.2.1. Mécanisme du FESI-Sweep-MEKC .....	47
I.6.2.2. Applications du FESI-Sweep-MEKC .....	50
I.7. Conclusion générale sur la bibliographie.....	54
I.8. Références.....	56
<i>PARTIE II- STABILITE DES CAPILLAIRES GREFFES AVEC DU POLYACRYLAMIDE LINEAIRE EN MILIEU ACIDE, HYDRO-ORGANIQUE, EN PRESENCE DE SURFACTANT EN VUE DE LEUR UTILISATION POUR LA PRECONCENTRATION ELECTROKINETIQUE IN-SITU</i> .....	
	66
II. INTRODUCTION .....	68
Article- Stabilité et efficacité des capillaires greffés par du polyacrylamide linéaire pour la suppression de l'écoulement électroosmotique dans des milieux acides en présence de solvants organiques et de surfactants. ....	69
II.1. Abstract.....	70
II.2. Introduction .....	71
II.3. Materials and methods.....	72
II.3.1. Chemicals and solutions .....	72
II.3.2. Apparatus and software .....	73
II.3.3. Experimental procedures .....	73
II.3.4. Data analysis.....	74
II.4. Results and discussion .....	75
II.4.1. Stability of the LPA coating under acidic conditions.....	75
II.4.2. LPA coating effectiveness under acidic conditions.....	76
II.5. Concluding remarks.....	81
II.6. References .....	83
II. CONCLUSION .....	84
<i>PARTIE III- PRECONCENTRATION ELECTROKINETIQUE IN-SITU PAR COUPLAGE DE L'AMPLIFICATION DE CHAMP ELECTRIQUE AVEC UNE INJECTION ELECTROKINETIQUE ET LE SWEEPING : ETUDE DU MECANISME ET APPLICATION</i> .....	
	85
III. INTRODUCTION.....	86
CHAPITRE I-Article-Elucidation de l'impact des paramètres influençant le couplage de la préconcentration électrocinétique <i>in-situ</i> par amplification de champ électrique avec une injection électrocinétique et le <i>sweeping</i> .....	87
III.I.1. Abstract.....	88
III.I.2. Introduction.....	89
III.I.3. Materials and methods .....	91
III.I.3.1. Chemicals and solutions .....	91
III.I.3.2. Apparatus and software.....	91

III.I.3.3. Experimental procedures .....	92
III.I.4. Design of experiments .....	95
III.I.4.1. Choice of the responses and factors .....	95
III.I.4.2. Choice of the experimental design.....	95
III.I.4.3. Factor levels .....	96
III.I.4.4. Matrix of experiments.....	96
III.I.4.5. Determination of the effects.....	97
III.I.5. Results and discussion .....	98
III.I.5.1. Setup of the MEKC separation .....	98
III.I.5.2. Investigation on HCB composition.....	99
III.I.5.3. Influence of the experimental factors .....	102
III.I.6. Conclusion .....	111
III.I.7. References.....	113
CHAPITRE II-Article-Influence de la composition de la zone de haute conductivité sur l'amplification de champ électrique avec une injection électrocinétique couplée avec le <i>sweeping</i> en électrophorèse capillaire. ....	115
III.II.1. Abstract.....	116
III.II.2. Introduction .....	117
III.II.3. Materials and method .....	118
III.II.3.1 Chemicals and solutions .....	118
III.II.3.2. Apparatus and software .....	119
III.II.3.3. Capillary treatment .....	119
III.II.3.4. General FESI-Sweep-MEKC procedure .....	120
III.II.3.5. Procedure to highlight the influence of the HCB composition .....	120
III.II.4. Design of experiment.....	121
III.II.4.1. Choice of the factors and responses .....	121
III.II.4.2. Choice of the design of experiment.....	121
III.II.4.3. Factor levels.....	121
III.II.4.4. Matrix of experiments .....	121
III.II.4.5. Determination of the effects .....	122
III.II.5. Computer simulations of the FESI process .....	123
III.II.6. Results and discussions .....	123
III.II.6.1. Choice of the factor levels .....	124
III.II.6.2. Influence of the experimental parameters .....	125
III.II.6.3. Deeper insight into the influence of the nature of the HCB on the FESI step	126
III.II.6.4. Simulation of the FESI process .....	129
III.II.7. Concluding remarks.....	134
III.II.8. References .....	136

III.II.9. Supporting information.....	138
CHAPITRE III-Article-Application du FESI-Sweep-MEKC pour l'analyse d'herbicides dans des eaux potables présents à l'état d'ultra trace .....	140
III.III.1. Introduction .....	140
III.III.2. Matériels et procédures électrophorétiques.....	141
III.III.2.1. Produits et solutions .....	141
III.III.2.2. Matériels.....	142
III.III.2.3. Procédures électrophorétiques.....	143
III.III.3. Résultats et discussions .....	144
III.III.3.1. Séparation par MEKC .....	145
III.III.3.2. FESI-Sweep-MEKC.....	146
III.III.4. Conclusion.....	152
III.III.5. Références .....	153
III. CONCLUSION .....	155
<i>PARTIE IV- POTENTIEL DES LIQUIDES IONIQUES POUR LA PRECONCENTRATION ELECTROCINETIQUE IN-SITU EN ELECTROPHORESE CAPILLAIRE .....</i>	<i>156</i>
IV. INTRODUCTION .....	158
Article- Potentiel des liquides ioniques à longue chaîne pour les méthodes de préconcentration : application à la préconcentration par déplacement d'un équilibre de distribution micellaire par un changement de composition hydroorganique. ....	159
IV.1. Abstract .....	160
IV.2. Introduction .....	161
IV.3. Experimental .....	162
IV.3.1. Apparatus .....	162
IV.3.2. Reagents and solutions.....	162
IV.3.3. Electrophoretic procedures .....	163
IV.4. Results and discussion .....	164
IV.4.1. Effect of C <sub>12</sub> -MIM-BF <sub>4</sub> concentration on MSS CZE.....	164
IV.4.2. Elucidation of the $\mu_{ep}(a')$ reversal.....	165
IV.4.3. Effect of type and concentration of organic solvent on MSS CZE.....	167
IV.4.4. Effect of ammonium acetate concentration in the S .....	168
IV.4.5. Effect of S injection time .....	169
IV.4.6. MSS of herbicides .....	170
IV.4.7. Analytical performance.....	171
IV.4.8. C <sub>12</sub> -MIM-BF <sub>4</sub> versus CTAB as micelle carriers for MSS.....	173
IV.4. Conclusion .....	177
IV.5. References.....	178
IV. CONCLUSION.....	180

<i>PARTIE V- FAISABILITE DE L'UTILISATION D'APTAMERE POUR LA PRECONCENTRATION ELECTROKINETIQUE IN-SITU SELECTIVE</i> .....	181
<i>PRECONCENTRATION ELECTROKINETIQUE IN SITU SELECTIVE PAR SWEEPING PAR UN APTAMERE : PREUVE DE CONCEPT AVEC L'ANALYSE DE TRACE D'OCRATOXINE A DANS LE VIN</i> .....	183
V.1. Introduction .....	183
V.2. Matériels et procédures électrophorétiques .....	185
V.2.1. Produits et solutions .....	185
V.2.2 Matériels .....	186
V.2.3 Procédures électrophorétiques .....	186
V.3. Résultats et discussions .....	187
V.3.1. Mobilités électrophorétiques .....	188
V.3.2. Fluorescence du complexe aptamère/ochratoxine .....	189
V.3.3 Sweeping de l'ochratoxine A par l'aptamère .....	190
V.3.4 Sélectivité du processus de sweeping .....	192
V.3.5 Analyse d'un vin dopé avec de l'ochratoxine A .....	194
V.4. Conclusion .....	196
V.5. Références .....	197
<i>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</i> .....	202

# ***INTRODUCTION GENERALE***

Parmi l'arsenal des outils utilisés en chimie analytique, les techniques séparatives présentent l'avantage certain de pouvoir séparer, détecter, identifier et quantifier, en une seule opération, des analytes présents dans des matrices plus ou moins complexes. Parmi elles, au cours de ces vingt dernières années, l'électrophorèse capillaire est devenue une méthode alternative importante grâce à son principe de séparation sous champ électrique (donnant de grandes efficacités), son échelle miniaturisée et sa conception respectueuse de l'environnement.

Cependant, à cause du faible chemin optique disponible (diamètre interne des capillaires 25-75  $\mu\text{m}$ ), lorsque des détecteurs spectrophotométriques (ultra-violet, fluorescence induite par laser...) sont utilisés, la sensibilité de la détection est faible. Pour pallier ce problème, depuis une vingtaine d'années, des méthodes de préconcentration électrocinétique *in-situ*, qui ne nécessitent aucune modification d'appareillage, ont été développées. Ces méthodes sont basées sur les propriétés d'ajustement des concentrations des espèces entre deux zones adjacentes de compositions (conductivité, pH...) différentes présentes au sein du capillaire. Ainsi, ces méthodes mettent principalement en jeu des variations du champ électrique et des déplacements d'équilibre chimique (par exemple, extraction ou complexation).

Afin d'améliorer les gains en sensibilité des méthodes de préconcentration électrocinétique *in-situ*, plusieurs stratégies sont envisageables. Deux d'entre elles sont particulièrement intéressantes, à savoir, le couplage de deux techniques de préconcentration aux mécanismes différents et l'utilisation d'espèces extractantes pouvant présenter des interactions fortes et/ou sélectives avec les analytes d'intérêt.

Au cours de ces travaux de thèse, nous nous sommes donc tout d'abord intéressés à l'étude du mécanisme du couplage de la préconcentration par amplification de champ électrique avec une injection électrocinétique (*FESI*) et de l'extraction dynamique par une phase micellaire (*sweeping*). Des travaux réalisés auparavant au laboratoire nous ont incités à considérer des liquides ioniques à longue chaîne comme agent micellaire pour la préconcentration par déplacement d'un équilibre de distribution micellaire par un changement de composition hydro-organique (*Micelle to Solvent Stacking*). Enfin, nous avons évalué le potentiel d'une préconcentration par extraction dynamique l'utilisant un aptamère en milieu libre comme agent d'extraction.

## ***PARTIE I- ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE***



### Liste des abréviations

BGE: BackGround Electrolyte (Electrolyte de séparation)

CE: Capillary Electrophoresis (électrophorèse capillaire)

CMC: Concentration Micellaire Critique

CSEI-Sweep-MEKC : Cation Selective Exhaustive Injection-Sweeping-Micellar ElectroKinetic Chromatography (Préconcentration par couplage du FESI et du Sweeping pour les espèces cationiques)

CZE: Capillary Zone Electrophoresis (Electrophorèse capillaire de zone)

DETA: DiEthyleneTriAmine (Diéthylènetriamine)

EDTA: Ethylene Diamine TetraAcetic (Acide éthylène diamine tétraacétique)

EKS: ElectroKineticSupercharging (Préconcentration par couplage du FESI et de la t-ITP)

EM : Electrolyte Meneur

EOF: ElectroOsmotic Flow (Ecoulement électroosmotique)

ET : Electrolyte Terminal

FAEP : Field Amplified Injection and water removal using the EOF Pump (Préconcentration par amplification de champ électrique pendant l'injection électrocinétique de l'échantillon après introduction d'une grande zone de faible conductivité éliminée par l'écoulement électroosmotique)

FASI: Field Amplified Sample Injection (Préconcentration par amplification de champ électrique avec une injection électrocinétique)

FASS: Field Amplified Sample Stacking (Préconcentration par amplification de champ électrique)

FESI: Field Enhanced Sample Injection (Préconcentration par amplification de champ électrique avec une injection électrocinétique)

FESI-RMM: Field Amplified Sample Injection with Reverse Migrating Micelles (Préconcentration par amplification de champ électrique avec injection électrocinétique et des micelles comme agent de transport)

FESI-Sweep-MEKC : Field Enhanced Sample Injection-Sweeping-Micellar ElectroKinetic Chromatography (Préconcentration par couplage du FESI et du Sweeping)

HCB : High Conductivity Buffer (Zone de haute conductivité)

IM : Ion Meneur

## Partie I - Etude Bibliographique

---

IT : Ion Terminal

ITP: IsoTachoPhoresis (Isotachophorèse capillaire)

KRF: Kohlrausch Regulation Function (Fonction de régulation de Kohlrausch)

LIF: Laser Induced Fluorescence (Fluorescence induite par laser)

LLE: Liquid Liquid Extraction (Extraction liquide liquide)

LOD: Limite Of Detection (Limite de détection)

LVSEP: Large Volume Stacking using the EOF Pump (Préconcentration par amplification de champ électrique avec injection d'un très grand volume sans changement de polarité)

LVSS: Large Volume Sample Stacking (Préconcentration par amplification de champ électrique avec injection d'un très grand volume avec changement de polarité)

MEKC: Micellar ElectroKinetic Chromatography (Chromatographie électrocinétique micellaire)

MS: Mass Spectrometry (spectrométrie de masse)

MSS: Micelle to Solvent Stacking (Préconcentration par déplacement d'un équilibre de distribution micellaire par un changement de composition hydroorganique)

SDS: Sodium DodecylSulfate (Sodium de dodécyl sulfate)

SEF: Sensitivity Enhancement Factor (Gain en sensibilité)

SPE: Solid Phase Extraction (Extraction sur phase solide)

t-ITP: Transient-IsoTachoPhoresis (Isotachophorèse capillaire en mode transitoire)

### I.1. Introduction

Au cours des dix dernières années, l'électrophorèse capillaire (CE) est devenue une technique de référence pour la mesure de certaines propriétés physicochimiques (constante de complexation, concentration micellaire critique...) et pour l'analyse de mélanges plus ou moins complexes de composés (ions inorganiques, composés pharmaceutiques, ADN, protéines, composés chiraux, ...) dans différentes matrices (eau, urine, sang, sol...) en tant que technique séparative. Cet essor résulte des nombreux avantages liés à son principe de séparation sous champ électrique (grande efficacité) et à ses dimensions miniaturisées (faible consommation d'échantillon et de solvants organiques).

Cependant, l'électrophorèse capillaire souffre d'un manque de sensibilité en concentration à cause du court chemin optique disponible, 25 à 100  $\mu\text{m}$ , pour les techniques spectrophotométriques. Pour résoudre ce problème, plusieurs stratégies ont été développées. Des capillaires à bulles ou des cellules de détection en forme de Z ont été introduits pour augmenter le chemin optique, permettant ainsi une amélioration en sensibilité de l'ordre de 3 (capillaires à bulles) à 10 (cellules en Z) [1,2]. Des détections plus sensibles peuvent être utilisées telles que la spectrométrie de masse (MS) avec comme avantage d'être une détection universelle, renseignant sur la nature et la structure du composé [3,4], ou la fluorescence induite par laser (LIF) permettant des seuils de détection très faibles [5,6], pour ne citer qu'eux.... L'utilisation de telles détections s'avère plus onéreuse et est donc moins pour tous les laboratoires. De plus, dans le cas de la MS, certains ions/additifs sont à proscrire (notamment avec l'utilisation de la source à électro-nébulisation [7,8]) et le couplage avec la CE n'est pas toujours simple [9,10]; quant à l'utilisation du LIF, celle-ci est limitée aux molécules qui fluorescent naturellement ou bien à celles qui ont été préalablement dérivées par un agent fluorophore ou fluorogène [11,12]. Une autre stratégie consiste à concentrer les analytes avant leur injection dans le capillaire de séparation (méthodes en différé, ou « *off-line* »), ou directement dans le capillaire (*in-situ*). Les méthodes *off-line* communément utilisées, telles que l'extraction sur phase solide (SPE), l'extraction liquide-liquide (LLE) et leurs variantes miniaturisées, permettent à la fois de concentrer les analytes, mais aussi d'éliminer des composés interférents qui peuvent être gênants lors de l'analyse par CE [13,14]. Cependant, ces étapes peuvent être longues et délicates. C'est pourquoi, en parallèle, ont été développées depuis maintenant une vingtaine d'années des méthodes de préconcentration électrocinétique *in-situ* ne demandant aucune modification d'appareillage.

C'est cette dernière approche qui fait l'objet de ce travail et, par mesure de simplification, le terme préconcentration sera tout au long du manuscrit utilisé au lieu de préconcentration électrocinétique *in-situ*.

L'objectif de la préconcentration est d'augmenter au maximum les quantités d'analytes injectés tout en maintenant la qualité de la séparation. Le nombre de publications et de revues traitant de ce sujet, parues depuis les années 2000 [15-22], témoigne des efforts qui sont réalisés tant pour la compréhension des phénomènes, que pour l'amélioration des méthodes. Les phénomènes principaux mis en jeu peuvent être classés selon deux catégories : (i) concentration par amplification du champ électrique dans le capillaire (« *field amplified sample stacking* ») et (ii) concentration par variation d'équilibre chimique (extraction, complexation, changement de pH, propriété de solvation) dans le capillaire. Ces différentes stratégies sont présentées dans les lignes qui suivent, mais au préalable quelques notions sur les phénomènes de migration et d'ajustement des concentrations en CE sont à considérer.

## I.2. Considérations générales sur les phénomènes de migration, d'ajustement des concentrations et de dispersion en électrophorèse capillaire

Les méthodes de préconcentration en CE s'appuient sur les propriétés de vitesse des analytes entre différentes zones, d'affinité des composés pour des pseudo-phases et d'ajustement de leur concentration, régulé par la fonction de Kohlraush (KRF).

### I.2.1 Densité de courant et champ électrique

En CE, le capillaire de séparation rempli par un électrolyte (*Background Electrolyte*, BGE) d'une certaine conductivité ( $\kappa$ ) est soumis à un champ électrique longitudinal ( $E$ ). La densité de courant liée ( $J$ ) s'exprime selon l'équation (1) :

$$J = \kappa E \quad (1)$$

Dans le cas où le capillaire est rempli de plusieurs zones de conductivités différentes, la densité de courant étant constante dans tout le capillaire, alors les champs électriques

locaux varient, de telle sorte que dans une zone de haute conductivité règne un champ faible. A l'inverse, dans une zone de faible conductivité règne un champ fort. Certaines méthodes de préconcentration jouent sur ces variations de champs électriques qui influencent les différentes vitesses électroosmotique et électrophorétique régissant le mouvement des analytes dans le capillaire.

### I.2.2 L'écoulement électroosmotique (EOF)

A l'interface solide-liquide entre le capillaire et l'électrolyte de séparation, une double couche de charges électriques se forme, du fait des propriétés acido-basiques des groupements silanol présents en surface de la silice (pKa ~5-6). Une partie des charges fixes de la surface du solide est compensée par des charges de signe opposé fournies par des ions excédentaires situés à l'intérieur d'une première couche de solution au contact du solide (couche compacte). Le restant de ces charges est compensé par des ions excédentaires se trouvant dans une seconde couche de solution, plus épaisse et plus éloignée de la surface solide (couche diffuse). Lors de l'application d'un champ électrique tangentiel à l'interface, les ions excédentaires situés dans la couche diffuse migrent, selon leur charge et l'orientation du champ, donnant naissance par friction à un transport non sélectif des molécules du solvant. Cette vitesse, appelée vitesse électroosmotique ( $v_{EO}$ ), obéit à la relation d'Helmholtz-Smoluchowski :

$$v_{EO} = \mu_{EO} E = \frac{-\epsilon_r \epsilon_0 \zeta E}{\eta} \quad (2)$$

où  $\mu_{EO}$  correspond à la mobilité électroosmotique (grandeur algébrique), qui dépend des propriétés de l'électrolyte à travers sa permittivité relative  $\epsilon_r$  et sa viscosité  $\eta$ , et des caractéristiques de l'interface solide-solution, à travers le potentiel zêta  $\zeta$ , proportionnel à la densité de charge de surface du solide [23,24,25].  $\epsilon_0$  est la permittivité du vide.

D'un point de vue expérimental, l'écoulement électroosmotique peut être modifié en jouant sur la force ionique de l'électrolyte ( $\mu_{EO}$  augmente quand la force ionique diminue), sa viscosité et son pH (car la densité de charges à la surface du capillaire dépend du pH de l'électrolyte). Cet écoulement peut aussi être contrôlé en modifiant la surface du capillaire par greffage ou adsorption de polymères neutres (l'écoulement devient alors nul) ou chargés (écoulement anodique ou cathodique en fonction de sa charge).

## Partie I - Etude Bibliographique

---

Le profil de vitesse de l'EOF est plat, ce qui entraîne une dispersion réduite puisque la répartition en vitesse des analytes est uniforme. Lorsque le capillaire contient, par exemple, deux zones de compositions différentes (pH, viscosité, force ionique), localement selon la loi d'Helmholtz-Smoluchowski, les mobilités électroosmotiques sont différentes. Or, comme il ne peut y avoir qu'une seule vitesse d'écoulement globale dans tout le capillaire à cause de l'incompressibilité des liquides, un effet piston à la frontière des deux zones est créé, entraînant une déformation du profil plat de vitesse de l'EOF. Ce dernier devient alors parabolique. Ce profil parabolique entraîne un élargissement des pics, ce qui peut, dans certains cas, avoir un impact néfaste sur les méthodes de préconcentration [26,27].

On peut considérer l'EOF comme une pompe, puisque, de par ses propriétés, il entraîne de manière non sélective aussi bien les anions, les cations et les composés neutres. Cette pompe va permettre d'accélérer ou de freiner le transport global des analytes dans le capillaire, ce qui conduit à la notion de vitesse apparente ( $v_{app}$ ), somme vectorielle de la vitesse électroosmotique et de la vitesse électrophorétique.

### I.2.3 La vitesse électrophorétique

En régime stationnaire, une particule  $i$  soumise à un champ électrique uniforme  $E$  se déplace par migration électrique à une vitesse électrophorétique linéaire constante  $v_i$  donnée par la relation :

$$v_i = \mu_i E \quad (3)$$

avec  $\mu_i$  la mobilité électrophorétique (grandeur algébrique) de la particule  $i$  [23,24,25]. Dans des conditions expérimentales données, elle est appelée mobilité électrophorétique effective de l'espèce  $i$ .

Dans le cas de composés aux propriétés acido-basiques ou accepteur/donneur de ligands, la mobilité effective est reliée à la mobilité absolue,  $\mu_i^0$ , des diverses formes par une relation faisant intervenir le coefficient de dissociation du composé. Par la suite,  $\mu_i^0$  est reliée à la mobilité absolue à dilution infinie,  $\mu_i^\infty$ , par un facteur correctif faisant intervenir la force ionique de l'électrolyte ;  $\mu_i^0$  diminue en valeur absolue quand la force ionique augmente selon l'équation suivante d'après le modèle de Friedl :

## Partie I - Etude Bibliographique

---

$$\mu_i^\infty = \frac{\mu_i^0}{e(-w\sqrt{z_i I})} \quad (4)$$

avec  $z_i$  la charge de l'espèce considérée,  $I$  la force ionique de l'électrolyte et  $w$  qui est égale 0,5 si  $z_i$  est de 1 ou 0,77 si  $z_i$  est de 2 [28].

De plus, d'après le modèle de Stokes,  $\mu_i^\infty$  dépend de la nature de l'ion selon le rapport charge/taille de l'ion solvaté :

$$\mu_i^\infty = \frac{z_i e}{6\pi\eta r_i} \quad (5)$$

avec  $e$ , qui désigne la charge de l'électron et  $r_i$ , le rayon hydraté du composé  $i$  [23,24,25].

En conséquence, les conditions expérimentales influencent la mobilité électrophorétique de l'espèce  $i$ . En effet, (i) les propriétés solvatantes du milieu contribuent au rayon solvaté de l'ion, (ii) le pH influence l'état de charge si l'analyte possède des propriétés acido-basiques et (iii) une augmentation de la force ionique ou de la viscosité fait diminuer  $\mu_i^0$ . Enfin, l'influence de la température s'exerce essentiellement à travers celle de la viscosité, des pKa ou constante de complexation des espèces.

### I.2.4 Vitesse d'un soluté en présence d'une phase micellaire

Pour résoudre certains problèmes analytiques liés à la séparation de molécules neutres, Terabe et col. ont introduit un nouveau mode de séparation, la chromatographie électrocinétique micellaire (MEKC), faisant intervenir une pseudo-phase dans l'électrolyte : un tensioactif à une concentration supérieure à sa concentration micellaire critique (cmc) [29,30]. On définit un facteur de rétention  $k$ , comme en chromatographie, comme étant le rapport des quantités de soluté présentes respectivement dans la phase micellaire et dans la phase aqueuse (qui peut être hydro-organique). Pour un soluté neutre, ce facteur est calculable expérimentalement de la manière suivante :

$$k = \frac{t_R - t_{eo}}{t_{eo}\left[1 - \frac{t_R}{t_{mc}}\right]} \quad (6)$$

où  $t_R$  correspond au temps de rétention du soluté en présence des micelles,  $t_{eo}$  au temps de rétention nulle, correspondant à un composé neutre non inclus dans les micelles, et  $t_{mc}$  le temps de migration des micelles, correspondant au temps de rétention d'un composé totalement solidaire des micelles.

Ainsi, lorsque des micelles sont présentes dans l'électrolyte, la vitesse apparente des analytes est fonction de leur affinité pour elles ; ces interactions sont d'ordre hydrophobe et électrostatique. Ainsi il est possible de jouer sur les vitesses des analytes au sein d'un capillaire en agissant sur ces interactions, propriétés qui sont utilisées dans certaines méthodes de préconcentration.

### I.2.5 Fonction de régulation de Kohlrausch

Un paramètre important intervenant dans les phénomènes de préconcentration est l'ajustement des concentrations entre deux zones dont la valeur de la fonction de régulation de Kohlrausch (KRF) est différente [31]. Il a été montré que pour un électrolyte fort mono ou polyvalent ou pour un électrolyte faible monovalent en milieu de pH compris entre 3 et 10, la KRF s'exprime de la manière suivante :

$$w(x) = \sum_i \frac{c_i(x)z_i}{|\mu_i|} = \text{const}(x) \quad (7)$$

avec  $c_i$  représentant la concentration en ion  $i$  pour un électrolyte fort ou la concentration totale des espèces relative à un électrolyte faible monovalent ;  $z_i$  est le nombre de charge de l'ion  $i$  et  $|\mu_i|$  est la valeur absolue de la mobilité absolue d'un ion présent en un point  $x$  du capillaire.

L'information importante de cette formule est que la valeur  $w(x)$  est une constante localement invariante en un point donné  $x$  dans le temps. Ainsi, si la valeur de la KRF pour l'électrolyte de séparation dans le capillaire est supérieure à celle d'une zone injectée d'échantillon de faible concentration, alors les analytes sont concentrés quand ils passent la frontière existante entre ces deux zones afin de respecter la KRF. Bien que l'expression de la KRF ainsi donnée ne soit pas applicable à tout type d'électrolyte, elle permet néanmoins d'expliquer les phénomènes d'ajustement des concentrations des analytes lors des différentes méthodes de préconcentration (pour les expressions dans les différents cas possibles, voir [32]). En effet, même si les phénomènes de préconcentration peuvent être expliqués de

manière simplifiée par un simple changement de vitesse résultant de variations d'équilibre chimique ou de champ électrique, les lois qui dirigent ces phénomènes sont dictées par la KRF.

### I.2.6 Les phénomènes dispersifs en CE

Les grandes efficacités obtenues en CE résultent du profil plat de l'EOF et d'une réduction importante de la dispersion. L'influence de tous les phénomènes dispersifs se mesure par la variance totale d'un pic,  $\sigma^2$ , dont l'expression est la suivante :

$$\sigma^2 = \sigma_D^2 + \sigma_i^2 + \sigma_T^2 + \sum_j \sigma_j^2 \text{ et } \sigma_i^2 = \frac{l_0^2}{12} \quad (8)$$

avec  $\sigma_D^2$  la variance due à la diffusion des espèces,  $\sigma_i^2$  la variance due à la longueur de la zone injectée,  $\sigma_T^2$  la variance due à la convection thermique et  $\sum_j \sigma_j^2$  la somme de toutes les

variances dues aux autres sources de dispersion (à savoir les interactions avec les parois du capillaire, la constante de temps du détecteur, les inhomogénéités locales de l'EOF, l'homogénéité des micelles...) et  $l_0$  la longueur de la zone injectée. La longueur de la zone injectée est donc une source de dispersion importante et celle-ci dépend des paramètres de séparation, c'est-à-dire le nombre de plateaux théoriques qu'on est accepte de perdre. En générale, pour que reste  $\sigma_i^2$  négligeable devant  $\sigma^2$ , le volume maximal injectable est aux alentours de 1 % du volume du capillaire. Ainsi la longueur qu'occupent les analytes, suite aux phénomènes de préconcentration, ne doit pas excéder cette valeur. Toutefois, comme le montre l'équation (8) d'autres effets parasites sont à prendre en compte à savoir plus particulièrement :

- la diffusion moléculaire, qui résulte des inévitables gradients locaux de concentration. Cette diffusion dépend de la nature de l'espèce à travers son coefficient de diffusion et son temps de séjour dans le capillaire (plus celui-ci est long plus la dispersion augmente) [24,25].
- la convection, qui est la conséquence des gradients de densité, eux-mêmes résultant des gradients de température qui apparaissent dans le milieu de séparation du fait de la production de chaleur par effet Joule et de sa dissipation incomplète. Les méthodes de préconcentration sont limitées par ce paramètre lorsque l'effet Joule devient trop

## Partie I - Etude Bibliographique

---

important, à la suite d'un champ électrique local trop élevé. Toutefois, en contrôlant au mieux les conditions opératoires (tension appliquée et conductivité des différentes zones remplissant le capillaire) ce phénomène peut-être minimisé [24,25].

- les effets pistons résultant des différences locales entre les mobilités électroosmotiques de zones adjacentes. Comme expliqué précédemment, cette déformation du profil entraîne un élargissement des bandes d'analytes concentrés. Il s'agit donc d'un effet parasite. Toutefois, il peut être éliminé en travaillant soit avec des zones ayant le même EOF quand cela est possible, soit en travaillant dans des conditions sans EOF (milieux très acides ou capillaire neutre) [26,27].
- la dispersion par amplification de champ « *destacking* » ; il s'agit de l'effet inverse du « *stacking* ». Lorsqu'une zone d'analytes rencontre une zone où règne un champ électrique plus élevé et dans laquelle la KRF est plus faible, leurs vitesses augmentent brutalement ce qui entraîne un élargissement provoquant l'abaissement de leurs concentrations. Il faut donc être attentif à contrôler au mieux les conditions opératoires pour éviter ce phénomène, en jouant sur les conductivités et les valeurs de KRF des différentes zones électrolytes.

Ainsi, des phénomènes dispersifs parasites peuvent apparaître lors de la mise en œuvre des méthodes de préconcentration. Toutefois, ils peuvent être significativement réduits en maîtrisant et contrôlant les différents paramètres opératoires, à savoir la conductivité et le pH des électrolytes, la tension appliquée et l'utilisation de capillaires sans charge de surface.

En conclusion, il est à noter qu'en jouant sur les différents paramètres opératoires (conductivité, viscosité et pH des électrolytes, affinité pour une phase micellaire, présence de solvant organique) il est possible d'ajuster la vitesse apparente (somme vectorielle de  $v_{EO}$  et de  $v_i$ ) des analytes. Si cette vitesse est différente entre deux zones adjacentes et si les concentrations en ion sont correctement choisies (cf KRF) alors il est possible de concentrer les analytes, permettant ainsi d'injecter des quantités plus élevées et donc d'abaisser les limites de détection (LOD). Les différentes méthodes de préconcentration tirant parti de ces propriétés sont exposées ci-dessous.

### I.3. Préconcentration par amplification du champ électrique

Comme montré précédemment, il est possible de modifier les vitesses apparentes des analytes entre deux zones en utilisant une discontinuité de champ électrique au sein du capillaire.

#### I.3.1 Préconcentration par amplification du champ électrique avec injection hydrodynamique

Le principe de cette méthode (« *field amplified sample stacking* » ou FASS), qui ne s'applique qu'aux composés chargés, a été montré pour la première fois par Mikkers et coll. dans les années 1980 [33]. Il est représenté en Figure I-1 dans le cas où il n'y a pas d'EOF. Le capillaire est tout d'abord conditionné par l'électrolyte de séparation, puis l'échantillon, de conductivité plus faible que l'électrolyte, est injecté de manière hydrodynamique (a). Lors de l'application de la tension, du fait des différentes KRF, les analytes sont accumulés à la frontière échantillon/électrolyte ce qui peut s'expliquer aussi par une chute brutale de leur vitesse quand ils entrent dans l'électrolyte où règne un champ électrique plus faible (b, c). Ensuite, la séparation se poursuit de manière classique c'est-à-dire en électrophorèse de zone (CZE) [23,34].

L'utilisation de ce principe de préconcentration avant la séparation permet d'injecter des volumes d'échantillon plus élevés que lors d'une injection classique, du fait de la concentration des analytes dans une bande plus fine. Toutefois, en présence d'un EOF, il a été montré que les différences entre les mobilités électroosmotiques locales, régnants dans la zone échantillon et dans l'électrolyte, entraîne des volumes maximaux d'échantillon compris 5 et 10 % (cela dépend des mobilités électrophorétiques des analytes) [27,35]. En effet, un effet piston est créé et le profil de vitesse de l'EOF devient parabolique ; ceci est lié à la différence du champ électrique entre les deux zones et donc à la différence de conductivité, mais aussi à l'ampleur de l'EOF dans le capillaire (pH, viscosité, force ionique). Ainsi, les auteurs ont montré que pour travailler dans des conditions optimales, il faut un rapport de conductivité de l'ordre de 10. Plus récemment, ce problème a été réexaminé en milieu acide, c'est-à-dire lorsque l'EOF est quasiment nul [36]. Il a été montré que dans ces conditions, où l'effet piston peut être négligé, la différence de conductivité et le volume maximal sont les

## Partie I - Etude Bibliographique

mêmes que ceux qui ont été trouvés préalablement. Le facteur limitant est dans ces conditions la diffusion moléculaire due à l'augmentation des temps de migration du fait de l'atténuation du champ électrique local. En conséquence, les gains en sensibilité («*Sensitivity Enhancement Factor*», SEF) ne sont pas supérieurs à 10.

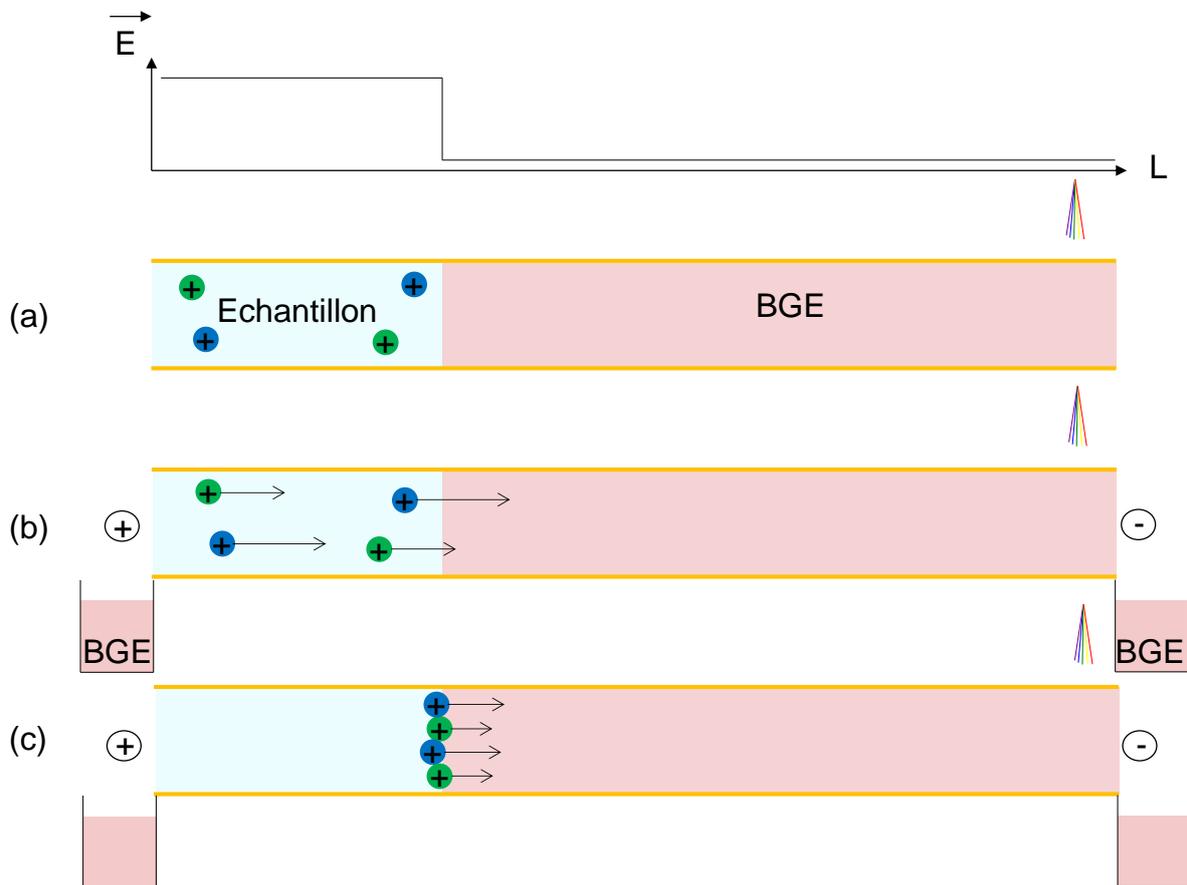


Figure I-1 : Schéma de principe de la préconcentration par FASS. (a) Injection hydrodynamique de l'échantillon (matrice de faible conductivité, grand volume). (b) Application de la tension : les analytes dans la zone échantillon sont soumis à un fort champ électrique. (c) Focalisation des analytes quand ils entrent dans le BGE (chute brutale de leur vitesse de migration électrophorétique).

Cette technique est donc plus facilement applicable aux échantillons de faibles conductivités, puisqu'il faut un rapport de conductivité de 10 entre l'échantillon et l'électrolyte [37,38]. Pour les matrices de conductivité élevée, il faut alors soit augmenter la conductivité de l'électrolyte, mais avec le risque de générer un effet Joule [39,40], soit traiter l'échantillon pour le dessaler (SPE, LLE...) [41,42]. Ainsi, de par sa simplicité de mise en œuvre, la FASS a été appliquée à de nombreux types d'échantillons et analytes tels que des alcaloïdes dans des urines [43], des antibiotiques dans des matrices alimentaires et sanguines

[44,45], des psychotropes dans du vin [46], des ions inorganiques dans des eaux potables [37], des acides alkylphosphoniques dans des eaux de rivière [47].

Une mise en pratique complémentaire du principe de concentration des analytes par une chute brutale de leur vitesse quand ils entrent dans l'électrolyte consiste à ajouter dans ce dernier un solvant organique visqueux, par exemple du glycérol ou de l'éthylène glycol pour les petites molécules [48,49] ou un polymère pour les grosses molécules [50]. Du fait de l'augmentation de la viscosité, les analytes sont brutalement freinés (Cf équation (5)). Toutefois, les phénomènes mis en jeu ne sont pas si simples puisque l'ajout de tels solvants peut entraîner une modification des mobilités électrophorétiques (déplacement des pKa, changement de conformations des protéines...), mais aussi augmenter le champ électrique dans l'électrolyte, compte tenu d'une conductivité plus faible (Cf équation (1)). Ainsi, les gains en sensibilité sont à évaluer au cas par cas, c'est-à-dire en fonction de l'additif et des analytes ; cependant, des SEF allant jusqu'à 100 ont été rapportés [48-50].

### **I.3.2 Préconcentration par amplification du champ électrique avec injection d'un très grand volume d'échantillon**

#### ***I.3.2.1 Préconcentration par amplification du champ électrique avec injection d'un très grand volume d'échantillon avec changement de polarité***

Comme présenté préalablement, les volumes d'injection sont limités en FASS ainsi que les gains en sensibilité qui en résultent. Pour pallier ce problème, Burgi et Chien ont développé une méthode permettant d'injecter un très grand volume d'échantillon : « *Large Volume Sample Stacking* » ou LVSS [51,52].

Les différentes étapes impliquées dans cette méthode sont représentées en Figure I-2, dans le cas où  $|\mu_i| < |\mu_{EOF}|$  (l'exemple est pris avec des anions). Pour que cette méthode soit applicable, il faut que les ions à analyser aient une migration électrophorétique opposée à l'EOF. Le capillaire est tout d'abord rempli avec l'électrolyte, puis un très grand volume d'échantillon, dans une matrice de conductivité plus faible, est injecté de manière hydrodynamique (a). Avec l'électrolyte présent dans les réservoirs d'entrée et de sortie, la tension est ensuite appliquée de telle sorte que l'EOF soit dirigé vers l'entrée du capillaire. Du fait de la différence de conductivité entre l'échantillon et l'électrolyte, les analytes s'accumulent à la frontière entre les deux zones par amplification du champ. Ainsi, la matrice

## Partie I - Etude Bibliographique

est au fur et à mesure éliminée dans le réservoir d'entrée (b). Au bout d'un certain temps, la frontière mobile échantillon/électrolyte est revenue en tête de capillaire avec la majorité de la matrice éliminée. Pendant cette phase d'élimination de la matrice, le courant augmente puisque l'électrolyte, plus conducteur que l'échantillon, remplit le capillaire (c). Quand l'intensité du courant atteint 80-95% de l'intensité correspondant au capillaire totalement rempli par l'électrolyte, la polarité est inversée et la séparation des analytes se poursuit sur la longueur du capillaire disponible (d). Il est à noter que cette méthode s'applique à un seul type d'ion à la fois (soit les cations, soit les anions) puisqu'il faut que les espèces à analyser migrent dans le sens opposé à l'EOF.

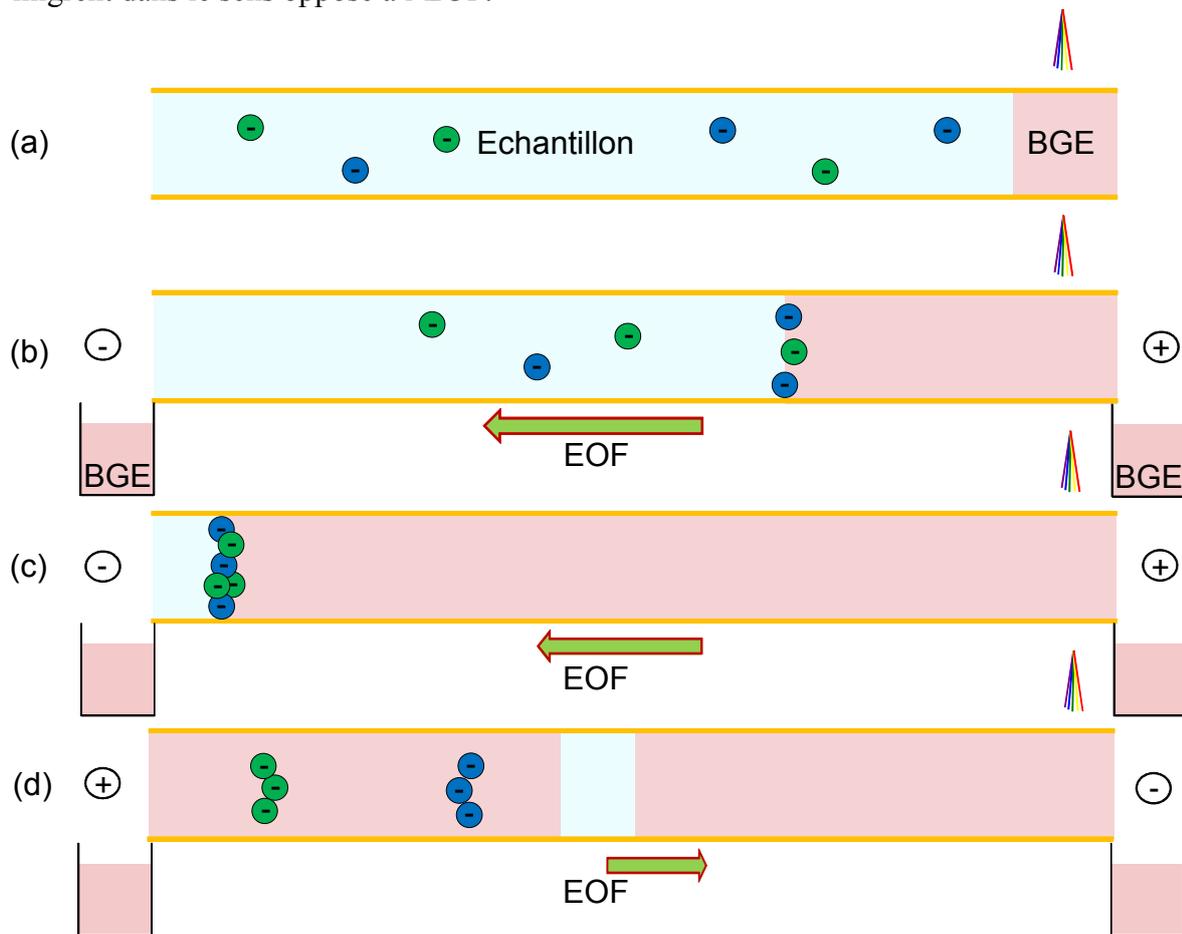


Figure I-2 : Schéma de principe de la préconcentration par « *large volume sample stacking* » dans le cas où  $|\mu_i| < |\mu_{EOF}|$ . (a) Injection hydrodynamique d'un très grand volume d'échantillon (matrice de faible conductivité). (b) Application de la tension : les analytes sont accumulés à la frontière échantillon/électrolyte et la matrice est éliminée. (c) La quasi-totalité de la matrice est éliminée et la frontière mobile entre la zone échantillon et l'électrolyte se retrouve en tête de capillaire. (d) Lorsque la valeur du courant atteint 80-95 % de la valeur correspondant au capillaire rempli par l'électrolyte, la polarité est inversée et la séparation des analytes commence.

## Partie I - Etude Bibliographique

---

Les volumes d'injection sont plus élevés qu'en FASS puisque la matrice est éliminée de la colonne en même temps que les analytes sont accumulés. Le volume d'injection maximal dépend principalement du rapport entre la mobilité électrophorétique des analytes et de l'EOF [51,52]. Aussi, comme pour la FASS, cette méthode n'est applicable qu'aux échantillons de faible conductivité et pour ceux de conductivité élevée il faut dessaler l'échantillon. En conséquence, les gains en sensibilité attendus sont très variables mais peuvent aller jusqu'à 200. Dès lors, la LVSS a été appliquée à de nombreux analytes et matrices tels que des antibiotiques dans de l'eau [53], des anti-inflammatoires dans de la salive humaine [54], des dérivés de mercure dans des cheveux [55], des peptides dans le sang [56].

### ***1.3.2.2 Préconcentration par amplification du champ électrique avec injection d'un très grand volume d'échantillon sans changement de polarité***

Dans le cas où les analytes d'intérêt sont tels que  $|\mu_i| > |\mu_{EOF}|$ , il n'est plus nécessaire de changer la polarité et le principe de la méthode est le même que précédemment. Ceci est un avantage non négligeable car le changement de polarité en cours d'analyse est une source d'erreur. Ce changement se faisant généralement en fonction du temps et non de l'intensité du courant, lorsqu'il est programmé automatiquement, les répétabilités sont alors moins bonnes. Si l'on veut changer la polarité en fonction de l'intensité du courant, il faut alors que l'opérateur reste devant l'instrument pour changer lui-même la polarité, ce qui est une entrave à l'automatisation. Ainsi, pour pallier ce problème lorsque les analytes d'intérêt sont tels que  $|\mu_i| < |\mu_{EOF}|$ , Burgi a développé une méthode où il est toujours possible d'injecter de grands volumes sans cependant changer la polarité au cours de l'analyse [57]. Cette méthode est appelée « *Large Volume Stacking using the EOF Pump* » ou LVSEP.

Pour cela un modificateur d'EOF, tel que la diéthylènetriamine (DETA), par exemple, est ajouté à l'électrolyte. Après que l'échantillon a été injecté, la tension est appliquée de façon à ce que l'EOF soit dirigé vers l'entrée du capillaire. La matrice est éliminée au fur et à mesure et les analytes sont accumulés à la frontière échantillon/électrolyte (comme en LVSS). La DETA, présente dans l'électrolyte, se lie aux groupements silanol du capillaire, réduisant progressivement l'EOF, jusqu'à ce que ce dernier se stabilise. Dès lors, comme l'EOF est quasiment nul, la séparation des analytes accumulés se poursuit sans qu'il ne soit nécessaire de changer la polarité.

## Partie I - Etude Bibliographique

---

La difficulté principale réside dans l'optimisation du modificateur d'EOF (nature et concentration) afin que les analytes migrent vers le détecteur au bon moment, c'est-à-dire quand la quasi-totalité de la matrice a été éliminée. Un avantage non négligeable de cette méthode est, qu'avec l'utilisation d'un agent de greffage dynamique, l'EOF devient indépendant du pH, favorisant son utilisation pour les composés à caractère acido-basique. Depuis la présentation de la LVSEP par Burgi, différents modificateurs d'EOF ont été utilisés comme des zwitterions [58] ou du bromure de tétradécyltriméthylammonium [59]. Différentes variantes intéressantes ont été proposées. Ainsi, au lieu d'utiliser un agent de greffage dynamique, certains auteurs ont proposé l'utilisation d'un électrolyte contenant une quantité élevée de solvant organique [60,61], un capillaire greffé avec un polymère neutre [62,63], ou encore le phénomène d'hystérésis du pH pour contrôler l'EOF [64].

Bien que les facteurs d'enrichissement obtenus soient nettement améliorés par rapport à la FASS, ceux-ci restent limités par les volumes d'injections qui ne peuvent dépasser celui du capillaire et sont du même ordre que ceux obtenus avec le LVSS (jusqu'à 200). Dès lors, le mode d'injection électrocinétique devient une alternative intéressante.

### **I.3.3 Préconcentration par amplification du champ électrique et injection électrocinétique**

L'instrumentation de l'électrophorèse capillaire permet d'injecter les composés en appliquant une tension. Si l'on suppose que les effets dynamiques sont nuls, c'est-à-dire que les conductivités de l'électrolyte et de l'échantillon ne varient pas, alors la quantité injectée est donnée par la relation suivante :

$$N_i = C_i A (\mu_{EO} + r \mu_i) E_0 t \quad (9)$$

où,  $N_i$  est le nombre de moles de l'espèce  $i$  injecté,  $C_i$  la concentration de l'espèce  $i$  dans l'échantillon,  $A$  la section du capillaire,  $\mu_{EO}$  la mobilité électroosmotique,  $r$  le rapport des conductivités entre l'électrolyte et l'échantillon,  $\mu_i$  la mobilité électrophorétique de l'espèce  $i$ ,  $E_0$  le champ électrique réparti dans le capillaire et  $t$  la durée d'injection [65]. La quantité d'analyte injectée est proportionnelle à la section du capillaire, à la durée d'injection et à la tension appliquée, mais cette équation montre aussi qu'elle dépend de l'EOF (ainsi

même les composés neutres qui n'ont pas de mobilité électrophorétique peuvent être injectés) et de la mobilité électrophorétique des espèces : ce mode d'injection permet donc de faire une discrimination des espèces lors de l'injection. Enfin, le terme  $r$  montre qu'il est possible d'augmenter la quantité injectée en jouant sur le rapport des conductivités entre l'échantillon et l'électrolyte.

### ***1.3.3.1 Amplification du champ électrique en tête de capillaire avec une injection électrocinétique***

La préconcentration par amplification du champ électrique en utilisant une injection électrocinétique de l'échantillon a été montrée pour la première fois par Chien et Burgi et cette méthode est communément nommée « *Field Enhanced Sample Injection* » (FESI), ou « *Field Amplified Sample Injection* » (FASI) [65]. Le capillaire est tout d'abord conditionné par l'électrolyte de séparation, puis l'échantillon, présent dans une matrice de plus faible conductivité, est injecté en appliquant une tension. Du fait des différences de conductivité, un champ électrique élevé règne dans le réservoir échantillon, en tête de capillaire, tandis qu'il existe un champ électrique faible dans l'électrolyte. Les analytes sont donc ralentis à leur entrée dans l'électrolyte et s'accumulent en tête de capillaire.

Comme le phénomène de concentration s'effectue en tête de capillaire, le rapport des conductivités entre l'électrolyte et l'échantillon n'est plus limité à 10. Toutefois, il a été montré qu'avec de trop grandes différences de conductivité, des élévations de température jusqu'à 100 °C peuvent être atteintes [66]. Dans l'objectif d'améliorer les performances du FESI, Chien et Burgi ont introduit une courte zone d'eau avant l'injection de l'échantillon, afin d'amplifier encore plus le champ électrique [66]. Au vu de leurs résultats et de ceux d'autres auteurs, il n'y a aucun doute que la répétabilité est améliorée avec l'ajout de cette zone d'eau, mais il y a toujours controverse quant à l'amélioration de la sensibilité [67,68]. Comme cette méthode repose sur l'amplification du champ, la maîtrise de la conductivité de l'échantillon est très importante pour que les résultats soient répétables. De plus, pour exploiter au mieux le pouvoir du FESI, il est nécessaire que les échantillons soient de faible conductivité ; en effet, du fait du mode d'injection, lorsque des espèces mobiles comme les ions sodium, potassium ou chlorure sont présents, ceux-ci sont injectés en plus grande proportion par rapport aux analytes d'intérêt (voir équation 9). Dès lors, pour les échantillons de conductivité élevée un dessalement est nécessaire [69,70].

## Partie I - Etude Bibliographique

---

L'amplification du champ électrique peut être améliorée en ajoutant des solvants organiques dans la zone échantillon tel que du méthanol, de l'acétone, de l'acétonitrile [71,72]... En effet, l'ajout de tels solvants dans l'échantillon y abaisse la conductivité de manière drastique, ce qui a pour conséquence d'y augmenter fortement le champ électrique. Toutefois, lorsque de trop grands pourcentages de solvant sont utilisés, des ruptures de courant résultant de la création de micro-bulles apparaissent très souvent [20,21]. Lorsque l'échantillon contient des quantités de sel non négligeables (par exemple du chlorure de sodium dans les échantillons biologiques), il a été montré que l'ajout de solvant organique, et plus particulièrement d'acétonitrile, permet de cumuler le phénomène de FESI et d'isotachophorèse transitoire (t-ITP). Ainsi, des gains en sensibilité allant jusqu'à 50 ont été rapportés sans qu'il n'ait été nécessaire de dessaler l'échantillon [73-78]. Le mécanisme de t-ITP est expliqué dans le paragraphe I.3.5.

Les gains en sensibilité dépendent de l'amplification du champ, mais aussi de la durée de l'injection. Tout comme pour la FASS, les durées d'injection sont limitées en FESI, car le volume final que peuvent occuper les analytes injectés est limité par les performances de séparation (sélectivité et résolution). Malgré tout, des gains en sensibilité nettement plus élevés qu'en FASS sont atteints ; ils sont généralement compris entre 100 et 1000. Ainsi, cette méthode est très intéressante et a été utilisée pour de nombreux composés présents dans différentes matrices tels que l'arginine dans du sang [79], des acides benzoïques dans des aérosols [80], de l'acrylamide dans des fruits [81], des désherbants dans de l'eau [82], des anions inorganiques dans des extraits d'explosifs [69].

Tout comme en FASS, les composés neutres n'ayant pas de vitesse électrophorétique ne peuvent être préconcentrés en FESI, même si dans certains cas ils sont injectés par l'EOF. Pour pallier ce problème, une variante du FESI, qui utilise des micelles dans l'échantillon comme agent de transport des composés neutres, a été développée. Les micelles sont injectées et concentrées entraînant avec eux les composés d'intérêts. Ensuite, la séparation se fait par MEKC puisque l'électrolyte doit aussi contenir des micelles [83]. La quantité d'analyte injectée et les gains en sensibilité dépendent de l'affinité de ceux-ci pour les micelles : plus le facteur de rétention ( $k$ ) est grand, plus les SEF seront élevés. Cette méthode de préconcentration, appelée « *Field Enhanced Sample Injection with Reverse Migrating Micelles* » (FESI-RMM), a permis de concentrer et séparer plusieurs composés tels que des terpènes dans des médicaments [84], la coumarine dans le sang [85], des amines aliphatiques dans des eaux de rivières [86], des saponines dans de l'urine [87].

### *1.3.3.2 Amplification du champ électrique pendant l'injection électrocinétique de l'échantillon après introduction d'une grande zone de faible conductivité éliminée par l'écoulement électroosmotique*

Faisant suite aux résultats de Chien et Burgi concernant l'introduction d'une courte zone d'eau en tête de colonne avant l'injection des analytes, une variante du FESI a été présentée en 2001 [88]. Le capillaire est initialement conditionné par le BGE, puis est introduite une large zone peu conductrice, par exemple de l'eau ou un mélange eau /solvant organique (Voir Figure I-3 a). Lors de l'application de la tension, il règne dans cette zone et dans l'échantillon (de faible conductivité) un champ électrique élevé, ce qui entraîne une injection amplifiée des analytes qui s'accumulent à la frontière avec l'électrolyte. En même temps, l'EOF dirigé vers l'entrée du capillaire élimine au fur et à mesure la zone de faible conductivité (b). Comme la zone de faible conductivité est progressivement éliminée, l'EOF diminue au cours de ce processus. Au bout d'un certain temps, la quasi-totalité de la zone de faible conductivité est éliminée (c). Enfin, à l'entrée du capillaire, l'échantillon est remplacé par l'électrolyte et la séparation a lieu (d). Par analogie avec l'élimination de la zone de faible conductivité par l'EOF cette méthode a été nommée « *Field amplified injection and water removal using the EOF Pump* » (FAEP).

Pour que cette méthode soit applicable, il faut que l'écoulement électroosmotique soit dirigé dans le sens opposé à la migration des analytes d'intérêt et que la vitesse électroosmotique soit plus faible que la vitesse électrophorétique des analytes quand le capillaire est presque entièrement rempli par le BGE. Ceci est réalisé par un choix judicieux du pH du BGE ou en modifiant l'état de surface du capillaire. Les durées d'injection sont généralement plus longues qu'en FESI. Tout comme en FESI, cette méthode ne s'applique qu'aux échantillons de faible conductivité ; pour les échantillons de forte conductivité un dessalement est indispensable. Les gains en sensibilité obtenus sont de manière générale supérieurs à ceux du FESI ; ils varient entre 1000 et 10 000. C'est donc une méthode très intéressante qui a été appliquée à de nombreux cas comme la détermination d'herbicides et d'agents neurotoxiques dans des eaux de rivières [89,90], des anti-inflammatoires et de l'Oxymatrine dans du sang [91,92].

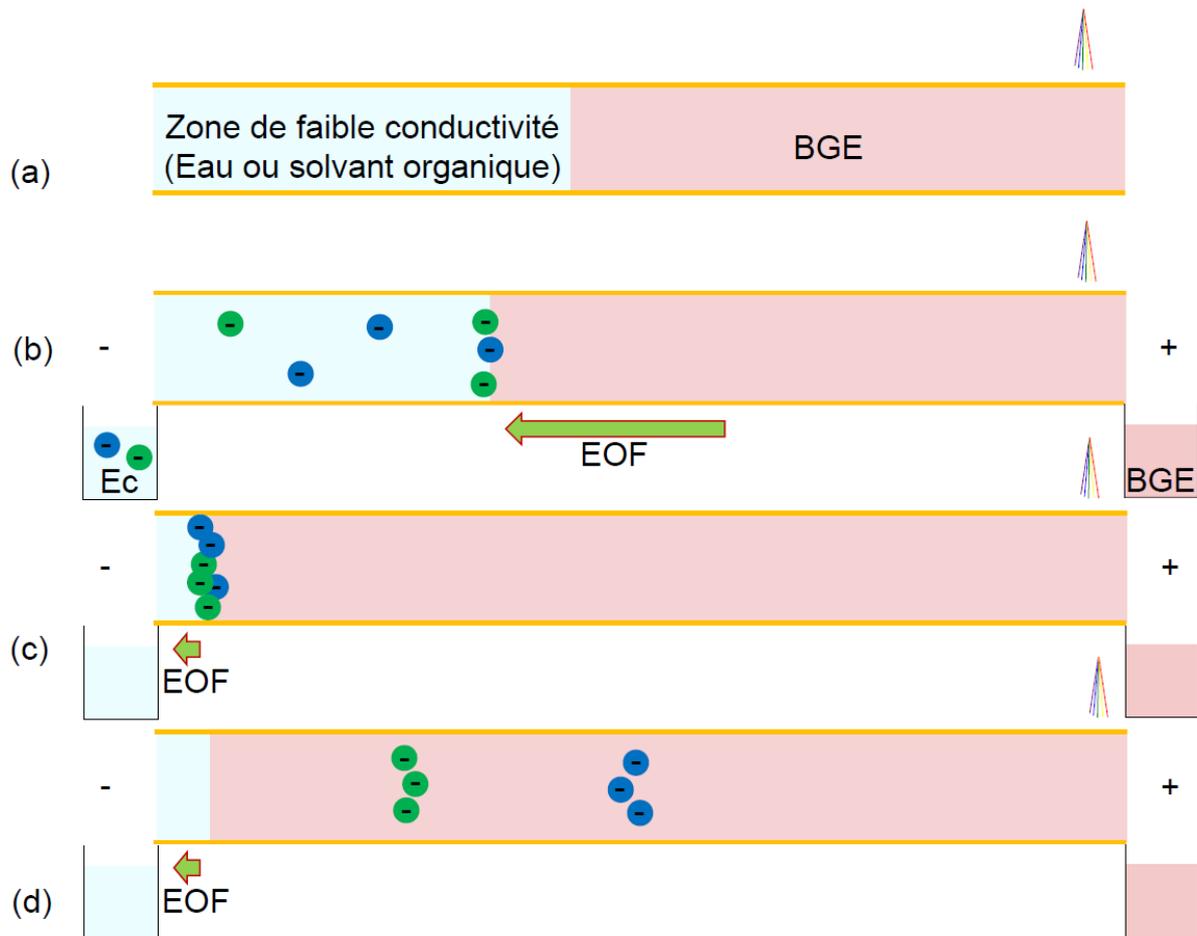


Figure I-3 : Schéma de principe de la préconcentration par « *Field amplified injection and water removal using the EOF pump* ». (a) Introduction hydrodynamique d'une large zone de faible conductivité dans le capillaire préalablement conditionné par le BGE. (b) Application de la tension : les analytes sont injectés et préconcentrés à la frontière avec le BGE. (c) Diminution progressive de l'EOF. (d) Inversion de la vitesse des analytes et la séparation a lieu. Ec : abréviation pour échantillon.

### ***1.3.3.3. Amplification du champ électrique à l'injection avec de longues injections électrocinétiques***

Bien que les gains en sensibilité puissent être très élevés en FESI, ceux-ci restent toutefois limités par les durées d'injection. En effet, lorsque les durées d'injection sont augmentées en FESI, deux problèmes principaux se posent : (i) tout d'abord, des durées trop prolongées entraînent une mobilisation des zones vers le détecteur, par l'EOF, ainsi qu'une perte de place substantielle pour la séparation ; (ii) même si les analytes sont freinés quand ils entrent dans l'électrolyte, du fait de leur propre vitesse électrophorétique, ils continuent de

migrer vers le détecteur et donc la zone d'analytes devient trop large et les performances de la séparation sont dégradées. Pour résoudre ces problèmes, deux types de stratégie ont été développées.

La première consiste à appliquer au cours de l'injection une contre-pression dirigée dans le sens opposé à l'écoulement électroosmotique, de sorte que la frontière de focalisation avec l'électrolyte reste stationnaire. Les analytes qui ont une vitesse électrophorétique opposée à l'EOF entrent dans le capillaire et sont focalisés à l'entrée du capillaire par amplification de champ [93]. Dans ce cas, des durées d'injection de 1200 s, au-delà de ce qui était anticipé, ont pu être utilisées sans perte de performance. Ceci a pu être expliqué par la formation d'une contre-couche d'ions concentrés à la frontière de focalisation. Du fait de l'attraction électrostatique, les analytes concentrés sont d'avantage ralentis [94]. L'utilisation d'une contre-pression en FESI a été appliquée pour l'analyse de nombreux composés tels que des phtalates dans l'urine [95], des phénols dans différentes eaux [96], l'albumine de sérum bovin [97] et les gains en sensibilité rapportés vont jusqu'à 15 000.

La deuxième stratégie consiste à contre-balancer l'EOF et la migration électrophorétique en un certain point du capillaire en utilisant une modification chimique (pH, force ionique, tensioactif) [98,99,100]. Une approche particulièrement intéressante est celle développée par Gong et coll. [100]. Les auteurs ont utilisé une modification dynamique avec un tensioactif cationique présent dans l'électrolyte mais non dans l'échantillon. Ainsi, lors de la mise sous tension, en un point donné du capillaire la vitesse électroosmotique est égale à la vitesse électrophorétique des micelles. Les analytes ayant de fortes affinités pour les micelles sont piégés dans les micelles rendues stationnaires à la frontière échantillon/électrolyte. L'état stationnaire est rompu lorsque le réservoir échantillon est remplacé par l'électrolyte. Cette approche permet d'injecter pendant des durées quasiment illimitées (dans ce cas 60 min), puisque la vitesse des analytes devient nulle. Les gains en sensibilité rapportés sont de 5 000 pour l'analyse d'agents fluorescents.

### ***1.3.3.4 Déplétion provoquée par les longues injections électrocinétiques***

Quand de longues injections électrocinétiques sont utilisées, les gains en sensibilité ne sont plus proportionnels aux durées d'injection. Ce comportement peut-être dû, entre autres, à la déplétion. En effet, au fur et à mesure de l'injection, il y a un appauvrissement des analytes autour de l'électrode ce qui entraîne une plus faible quantité d'analyte injectée par unité de

temps [101,102]. Comme il s'agit d'un phénomène d'appauvrissement de concentration locale, la déplétion dépend du régime hydrodynamique (diffusion pure, diffusion convective) des espèces autour de l'électrode.

Le transport des analytes vers l'électrode lors de l'injection peut être amélioré par agitation ou chauffage du réservoir échantillon [103]. Il a été montré également qu'en augmentant la distance entre l'électrode et l'entrée du capillaire ou en utilisant des électrodes circulaires, et non plus cylindriques, un facteur 10 pouvait être gagné en sensibilité [103, 104]. En combinant l'agitation et l'utilisation d'électrodes circulaires, un gain en sensibilité de 300 a été rapporté par rapport à la même méthode de préconcentration sans cette optimisation à l'injection [105]. Toutefois, ceci est valable pour des concentrations d'analytes très faibles dans l'échantillon (de l'ordre de la ppt) mais cela reste à vérifier pour des concentrations plus élevées. Bien que ces améliorations soient notables, les instruments commerciaux n'offrent pas, à ce jour, la possibilité de les mettre en œuvre.

### **I.3.4. Préconcentration par amplification du champ électrique et médiation du pH**

Comme mentionné précédemment, l'utilisation de la FASS et du FESI pour des échantillons de grande conductivité nécessite une étape de préparation d'échantillon afin d'éliminer au maximum les sels qui nuisent au mécanisme de préconcentration. Pour pallier ce problème, Lunte et coll. ont développé une méthode ingénieuse en transformant la zone échantillon de haute conductivité en une zone de faible conductivité via une réaction de neutralisation acide-base [106]. Le principe de cette approche, communément appelée « *pH-mediated FASS* » dans la littérature, est le suivant. Pour la séparation d'anions, par exemple, le capillaire est tout d'abord conditionné par l'électrolyte contenant une base faible, puis l'échantillon de nature ou pH acide est injecté hydrodynamiquement. Ensuite, une base forte, telle que de l'hydroxyde de sodium, est injectée électrocinétiquement. En conséquence, la zone d'échantillon acide est progressivement neutralisée par les ions hydroxyde, ce qui abaisse fortement sa conductivité. Ainsi, il règne un fort champ électrique dans celle-ci et les analytes ionisés sont focalisés à la frontière échantillon/électrolyte par le même mécanisme qu'en FASS. Pour des cations, une stratégie analogue est employée, mais avec un électrolyte acide et l'échantillon est préparée dans une matrice basique. Avec cette approche, des gains en sensibilité de l'ordre de 100 ont été rapportés [107-109].

Malgré le gros avantage de l'application à des échantillons de haute conductivité, les volumes d'injection restent encore une fois limités et ce principalement à cause de l'injection de la matrice qui peut entraîner des effets parasites. Pour contre-carrer ce problème, il est possible d'utiliser une contre-pression pour éliminer la matrice et permettre ainsi l'introduction de volumes d'échantillons plus élevés, sans pour autant perdre les performances de la séparation. Avec cette stratégie, des gains en sensibilité de 200 ont été rapportés [110].

Dès lors, la « *pH-mediated FASS* » a été appliquée à de nombreux échantillons de haute conductivité sans qu'un dessalement ne soit nécessaire tels que des acides aminés, de la sérotonine dans de l'urine [111,112,113], des nucléosides dans des liquides physiologiques [114].

### **I.3.5. Préconcentration par isotachophorèse capillaire**

L'isotachophorèse capillaire (ITP) est un mode de séparation dans lequel les analytes chargés sont séparés dans un gradient discontinu de champ électrique en zones successives rangées selon leurs mobilités décroissantes. Les travaux effectués au cours de cette thèse nécessitent d'en rappeler certains de ses aspects. Pour une information plus complète, le lecteur pourra se référer à différentes revues [17,18,115,116].

Dans une configuration sans EOF, l'échantillon est injecté hydrodynamiquement dans le capillaire entre un électrolyte meneur (EM), placé dans le capillaire et dans le réservoir de sortie, et un électrolyte terminal (ET), placé dans le réservoir d'entrée. L'EM et l'ET contiennent des ions de même signe que les analytes d'intérêt présents dans l'échantillon, ayant des mobilités supérieures et inférieures, respectivement, à celles des analytes. Lors de l'application d'une tension, les ions se séparent selon leur différence de mobilité entre l'EM et l'ET. Du fait de la discontinuité en mobilité et concentration des ions introduits dans le milieu de séparation, un gradient discontinu du champ électrique est créé entre ces différentes bandes, et le champ électrique régnant dans chaque bande est inversement proportionnel à la mobilité de l'analyte (condition d'isotachophorèse). Ce sont les ions de chaque bande qui assurent la conduction électrique et non un électrolyte unique comme en CZE. Ainsi, un ion rapide diffusant dans la zone d'un ion lent est soumis à un champ électrique plus élevé et est donc accéléré pour rejoindre sa propre bande où règne un champ plus faible, ce qui entraîne un contrôle de la dispersion des bandes par électromigration. Conformément à la KRF, les

## Partie I - Etude Bibliographique

---

concentrations dans chaque bande d'analyte sont ajustées à celle de l'ion mineur et dépendent aussi du contre-ion C, conformément à l'équation suivante :

$$C_A = \frac{C_M \mu_A (\mu_M + \mu_C)}{\mu_M (\mu_A + \mu_C)} \quad (10)$$

où  $C_A$  et  $C_M$  représentent les concentrations de l'analyte (A) et de l'ion mineur dans leur zone respective,  $\mu_A$ ,  $\mu_M$  et  $\mu_C$  les mobilités absolues (valeurs absolues) de l'analyte, de l'ion mineur et du contre ion C supposé le même pour A et EM [117,118].

Cette équation montre que la concentration de l'analyte A est fonction de la concentration de l'ion mineur. Ainsi, l'ITP peut être utilisée comme méthode de préconcentration. Ceci a été montré pour la première fois par Foret et coll. qui ont utilisé une approche avec deux capillaires couplés (le premier pour la préconcentration par ITP et le deuxième pour la séparation en mode zone) afin d'analyser de la thiamine dans du sang humain avec des facteurs d'enrichissement de 200 [119]. Depuis lors, cette méthode a été utilisée pour de nombreux composés dans de nombreuses matrices et les gains en sensibilité peuvent aller jusqu'à 10 000 [120]. Toutefois, l'application de cette approche demande une modification d'appareillage qui n'est pas disponible commercialement et donc nous ne nous n'attarderons pas dessus.

La deuxième possibilité développée est l'isotachophorèse capillaire en régime transitoire (t-ITP), dont le principe est représenté dans la Figure I-4 pour une configuration sans EOF et telle que le co-ion de l'électrolyte joue le rôle d'ion terminal [118,121,122]. Le capillaire est tout d'abord conditionné par l'électrolyte, puis sont introduites successivement une zone contenant l'ion mineur (IM) et l'échantillon (a). Lors de la mise sous tension un gradient de champ électrique est créé et les concentrations des analytes sont ajustées selon le principe d'ITP. De plus, une zone de transition commence à être formée à l'avant de la frontière entre l'ion mineur et l'électrolyte de séparation ; l'ion mineur pénètre l'électrolyte et son front avant s'élargit (b). Simultanément, l'électrolyte pénètre dans les différentes zones (analytes et mineur) et les conditions d'ITP sont rompues au fur et à mesure pour les différents analytes par ordre croissant de leur mobilité (c). Enfin, la séparation des analytes se poursuit en mode zone (d).

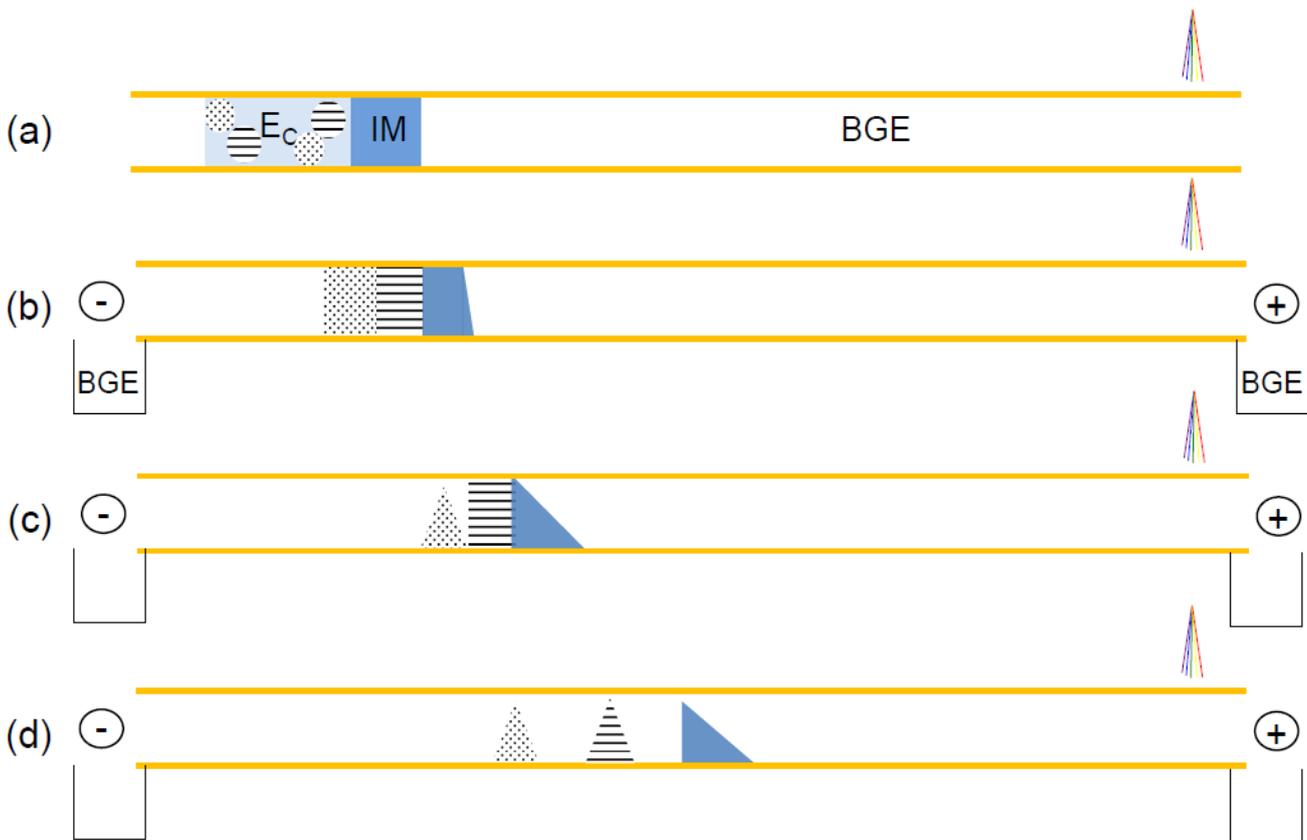


Figure I-4 : Schéma de préconcentration par t-ITP dans le cas où le co-ion du BGE joue le rôle d'ion terminal et l'EOF est nul. (a) Conditionnement du capillaire par l'électrolyte, l'ion meneur (IM) puis l'échantillon ( $E_c$ ). (b) Application de la tension et création d'un gradient de champ électrique : la concentration des analytes classés selon leur mobilité est ajustée sur celle de l'ion meneur. (c) Rupture des conditions d'ITP en commençant par l'ion avec la plus petite mobilité. (d) Ruptures des conditions d'ITP pour toutes les zones et séparation en CZE.  $E_c$  : abréviation pour échantillon.

Le mécanisme présenté laisse donc apparaître une étape d'ajustement des concentrations des analytes par ITP qui s'effectue de manière transitoire. La cinétique de ce phénomène a été bien décrite dans la littérature selon les différents cas de figures envisageables grâce à des simulations et vérifications expérimentales [123,124,125]. Enfin, comme il y a préconcentration, les volumes d'échantillon injectés sont plus élevés qu'en CE classique, ce qui augmente la sensibilité. Il est important de souligner que les mobilités et les concentrations des différents ions ainsi que les longueurs des zones de meneur et de terminal sont les facteurs prépondérants.

Le cas de t-ITP présenté ci-dessus est un exemple de configuration particulière. En effet, il en existe plusieurs, car les ions mineurs et terminaux peuvent être présents en même temps ou séparément dans l'électrolyte, en tant que zone ajoutée, ou encore dans l'échantillon [126]. Dans le cas où l'ion terminal ou mineur est présent dans l'échantillon, le terme de « *sample self stacking* » a été introduit [117,127,128]. Il faut pour cela que des conditions bien particulières de mobilité et de concentration des ions mineurs et terminaux soient respectées. Ce cas de figure est particulièrement intéressant pour la préconcentration par t-ITP d'échantillons contenant des teneurs élevées en ions très mobiles tels que les échantillons urinaires et sanguins. En effet, les ions chlorure et sodium jouent souvent le rôle d'ion mineur ; dès lors, cette méthode est applicable aux échantillons de forte conductivité, sans qu'une préparation d'échantillon (dessalage) ne soit nécessaire (à la différence de la FASS et FESI) ce qui fait que cette méthode a été très utilisée avec des gains en sensibilité allant jusqu'à plusieurs centaines [129-132].

### **I.4. Préconcentration par déplacement d'équilibres chimiques**

Toutes les méthodes de préconcentration mentionnées et présentées précédemment font appel à des variations du champ électrique pour l'accumulation des analytes avant leur séparation. Une autre manière d'induire un changement brutal de vitesse de migration est de faire varier leur mobilité électrophorétique. Les méthodes de préconcentration présentées ci-dessous s'appuient sur ce principe général.

#### **I.4.1. Préconcentration par changement du degré d'ionisation par changement de pH**

Dans cette méthode, les analytes d'intérêts sont concentrés car ils subissent un changement du degré d'ionisation quand ils entrent dans l'électrolyte entraînant une diminution de leur mobilité électrophorétique. En effet, une différence de pH est utilisée entre la zone échantillon et le BGE de même conductivité (sinon se superpose un effet d'amplification du champ). Ceci a été montré pour la première fois par Aebersold et Morrison

pour la préconcentration de peptides présents dans un échantillon de pH élevé, alors que la séparation s'effectuait dans un électrolyte à pH faible [133].

Très rapidement, le mécanisme de cette méthode a été étudié par différents groupes. Il a été montré que les espèces sont accumulées suite au changement de leur état d'ionisation, alors que la variation de pH se propage à travers l'échantillon [134-136], d'où le nom communément utilisé dans la littérature « *pH dynamic junction* ». Des études plus poussées avec des simulations ont révélé que le mécanisme est, certes, basé sur un changement du degré d'ionisation des analytes, mais aussi sur le déplacement de la frontière mobile de réaction (« *Moving Reaction Boundary* »). De plus, le sens et la vitesse de migration de cette frontière, qui dépendent très fortement des conditions opératoires (concentration en sel, pH des différentes zones, nature des espèces...), influence les temps de migration et les gains en sensibilité [137-141]. Il a même été rapporté qu'un mécanisme de t-ITP pouvait entrer en jeu [142]. Le changement du degré d'ionisation peut entraîner une réduction, une inversion voire une suppression de la migration électrophorétique (cas des protéines à leur point isoélectrique) [143,144,145].

Cette méthode de préconcentration s'adresse donc aux espèces possédant des propriétés acido-basiques présentes dans des matrices maîtrisées et connues, qui peuvent être de faible ou de grande conductivité, car, comme présenté ci-dessus, la préconcentration dépend aussi de la nature de la matrice. En conséquence, des gains en sensibilité très variables ont été rapportés, allant de quelques dizaines à plusieurs milliers [145,146,147].

### **I.4.2. Préconcentration par extraction dynamique par une phase micellaire**

L'utilisation d'un changement de mobilité électrophorétique pour la préconcentration d'espèce peut être réalisée aussi en utilisant une phase micellaire. Ce concept présenté pour la première fois en 1998 par Quirino et Terabe, puis appelé « *sweeping* » peut-être défini comme une extraction de proche en proche d'analytes par une pseudo-phase micellaire qui pénètre dans la zone échantillon et balaye les analytes [148,149].

La Figure I-5 présente les différentes étapes mises en jeu dans des conditions où il n'y a pas d'EOF. Le capillaire est tout d'abord conditionné par l'électrolyte de séparation contenant des micelles, puis une large zone d'échantillon dépourvu de micelles est injectée hydrodynamiquement (a). Lors de l'application de la tension de séparation, les micelles de l'électrolyte pénètrent dans la zone échantillon et par interactions hydrophobes et/ou

## Partie I - Etude Bibliographique

électrostatiques entraînent les analytes de proche en proche qui sont ainsi accumulés (b). L'application continue de la tension entraîne ensuite la séparation des analytes par MEKC (c).

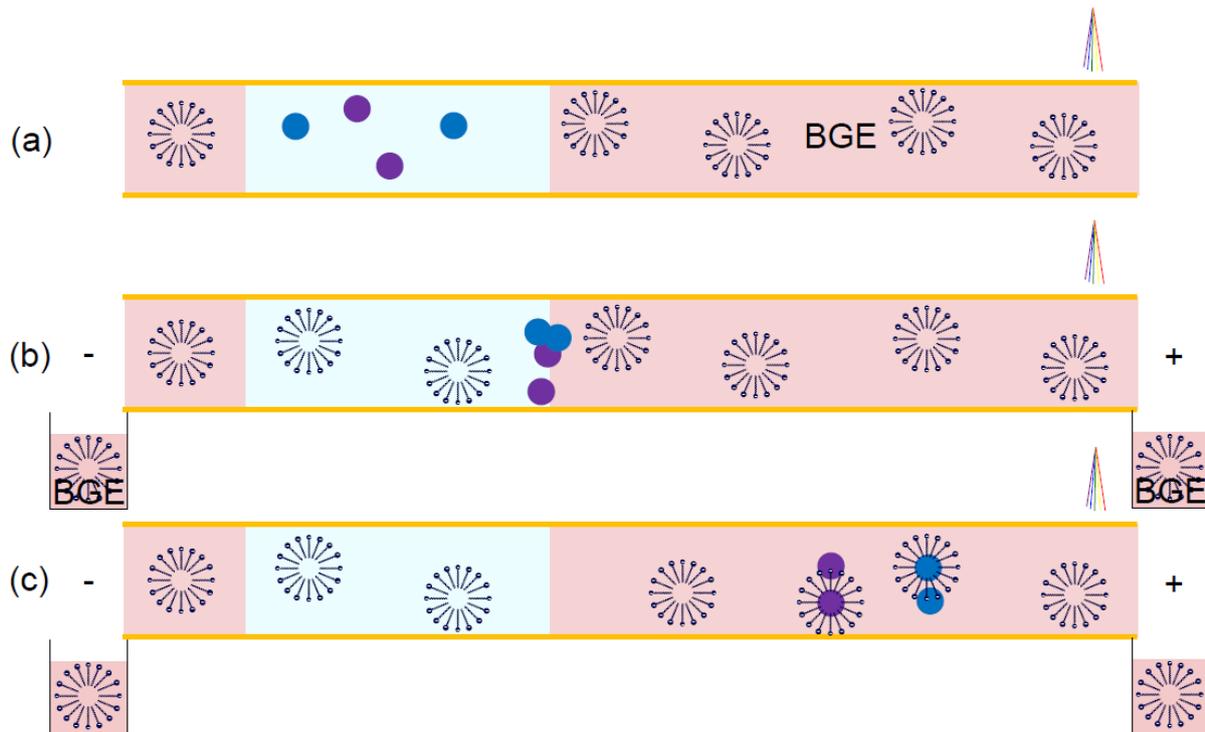


Figure I-5 : Schéma de principe de la préconcentration par *sweeping* avec des micelles anioniques. (a) Conditionnement du capillaire par le BGE contenant des micelles, puis par une grande zone d'échantillon ne contenant pas de micelle. (b) Application de la tension : les micelles migrent dans la zone échantillon et entraînent de proche en proche les analytes qui sont concentrés. (c) Séparation des analytes focalisés par MEKC.

La préconcentration des analytes est dictée par l'affinité de ceux-ci pour les micelles, ce qui est traduit par l'équation ci-dessous :

$$C_{sweep} = C_{inj}(1+k) \quad (11)$$

où,  $C_{sweep}$  correspond à la concentration des analytes concentrés par les micelles,  $C_{inj}$  la concentration initiale des analytes dans l'échantillon injecté et  $k$  le facteur de rétention [149,150]. Le volume d'injection maximal dépend alors des facteurs de rétention.

L'analyse détaillée du mécanisme de cette méthode a révélé que l'écoulement électroosmotique n'influence pas les gains en sensibilité obtenus [151]. Il est possible aussi de

## Partie I - Etude Bibliographique

---

travailler avec des matrices de conductivité inférieure, égale ou supérieure à celle de l'électrolyte [152]. Dans ce dernier cas, les micelles, qui entraînent les analytes, sont concentrées par amplification du champ, voire par un mécanisme de t-ITP, si les conditions inhérentes à ce mécanisme sont respectées [153-155]. Il a été montré qu'avec cette configuration, les analytes ayant de faibles facteurs de rétention peuvent être plus efficacement concentrés [156]. Ceci résulte de l'augmentation locale de la concentration en micelles et donc de l'augmentation du facteur de rétention (puisque celui-ci est proportionnel à la concentration en micelle). Toutefois, il y a encore de nombreux doutes quant à l'avantage réel de cette configuration pour les analytes ayant des facteurs de rétention élevés. En outre, comme mentionné auparavant pour les méthodes d'amplification du champ, la différence de conductivité entre l'échantillon et l'électrolyte ne doit pas être trop grande, sinon des effets néfastes de piston peuvent apparaître.

La nature de la pseudo-phase a une influence sur les facteurs de rétention des analytes et donc sur les gains en sensibilité. Bien que le dodécylsulfate de sodium (SDS) soit généralement utilisé, d'autres agents ont été présentés : (i) des tensioactifs anioniques tel que l'octanesulfonate de sodium [157], (ii) des tensioactifs neutres (Brij-35, Brij-38) [158] et des copolymères neutres [159], (iii) des tensioactifs cationiques tels que du bromure de dodécyltriméthylammonium [160] et des liquides ioniques (bromure de 1-cétyl-3-méthylimidazolium) [161]. Dans certains cas, l'utilisation de tels tensioactifs permet d'obtenir des gains en sensibilité plus élevés, du fait de l'augmentation des affinités des analytes pour la phase micellaire.

Plus généralement, une variation de vitesse peut-être obtenue par un phénomène de complexation dynamique, notamment entre un soluté neutre et un agent complexant chargé. Par la suite la séparation peut-être réalisée en CZE. C'est par exemple le cas avec les ions borate, l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA), l'acide 1,2-diamine tétraacétique, des cyclodextrines chargées [162-164,165]. Le même mécanisme est observé, quoique les équations dictant les concentrations des analytes soient légèrement différentes.

Ainsi, les gains en sensibilité obtenus sont très variables puisqu'ils dépendent de la nature des analytes et de la phase extractante et peuvent aller de quelques centaines à 10 000 [166-170]. Le *sweeping* est une méthode très avantageuse car (i) aussi bien les analytes chargés que les neutres sont concentrés (à la différence des méthodes par amplification de champ électrique), (ii) elle est facile à mettre en œuvre, (iii) dans la majorité des cas il n'est pas nécessaire de dessaler les échantillons et (iv) elle est applicable aux échantillons de grande conductivité (sang, urine...). Dès lors, elle est sûrement la méthode de

préconcentration la plus utilisée et les applications sont nombreuses. On peut citer par exemple la détermination de musc dans des produits cosmétiques [167], des benzodiazépines dans l'urine [168], des antibiotiques dans des perfusions [169], des flavonoïdes dans l'urine [170].

Récemment, des auteurs ont introduit une variante du *sweeping* où l'échantillon injecté et l'électrolyte ne contiennent pas de micelles, dite « *Transient trapping* » (*tr-trapping*) [171]. A la place une courte zone d'électrolyte contenant des micelles est introduite entre l'électrolyte et l'échantillon. L'étude détaillée du mécanisme par simulation et expériences a révélé qu'un gradient de concentration en micelles est créé dans cette courte zone parce que la mobilité électrophorétique des micelles est plus faible que celle du co-ion de l'électrolyte. En conséquence, les analytes qui entrent dans cette zone sont piégés, donc concentrés, pendant un certain temps avant d'être ensuite relâchés et la séparation se poursuit. La durée pendant laquelle les analytes sont piégés dépend des conditions opératoires (concentration en micelles, conductivité de l'électrolyte et de l'échantillon, mobilité électrophorétique du co-ion de l'électrolyte), mais aussi de la nature des analytes, c'est-à-dire de l'affinité que ceux-ci ont pour la phase micellaire [172]. Le mécanisme se rapproche donc très fortement du *sweeping* et des gains en sensibilité de l'ordre de 400 ont été rapportés pour l'analyse de pigments dans des eaux ultra-pures [171]. Cette configuration est sûrement une nouvelle voie très intéressante pour l'avenir, car, comme les micelles ne sont pas présentes dans l'électrolyte, le couplage avec la spectrométrie de masse semble tout à fait envisageable.

### **I.4.3. Préconcentration par déplacement d'un équilibre de distribution micellaire par un changement de composition hydroorganique**

Cette méthode, récemment présentée par Quirino, met en jeu un changement de signe de la mobilité effective des analytes. Lors de leur transport par une phase micellaire, leurs interactions avec celle-ci chutent fortement quand ils rencontrent l'électrolyte contenant un solvant organique. Cette méthode est dénommée dans la littérature « *Micelle to Solvent Stacking* » (MSS) [173].

Le schéma de principe est représenté en Figure I-6. Le capillaire est tout d'abord conditionné par l'électrolyte contenant un solvant organique mais pas de micelles. Ensuite une zone échantillon contenant des micelles, mais pas de solvant organique, est injectée (a). Noter que les analytes sont chargés positivement, c'est-à-dire de signe opposé à la charge des

## Partie I - Etude Bibliographique

micelles, ici chargées négativement, que l'EOF est dirigé vers le détecteur (polarité négative) et que la mobilité électroosmotique est plus élevée en valeur absolue que la mobilité effective des analytes dans l'échantillon ; ainsi l'ensemble des zones est entraîné vers le détecteur. De plus, du fait des interactions avec les micelles, la mobilité effective des analytes dans la zone échantillon est dirigée vers l'entrée du capillaire (polarité positive). Lors de l'application de la tension, les analytes cationiques, retardés par les micelles, migrent électrophorétiquement vers la frontière entre l'électrolyte et la zone échantillon (mobilité électrophorétique négative). A cette frontière, l'affinité des analytes pour les micelles chute fortement à cause de la présence de solvant organique de sorte que les micelles ne participent plus à leur transport. En conséquence, la mobilité électrophorétique des analytes change de signe dans l'électrolyte et devient positive (b). Les analytes sont ainsi préconcentrés (c). Enfin, les analytes sont séparés entre eux par CZE classique (d).

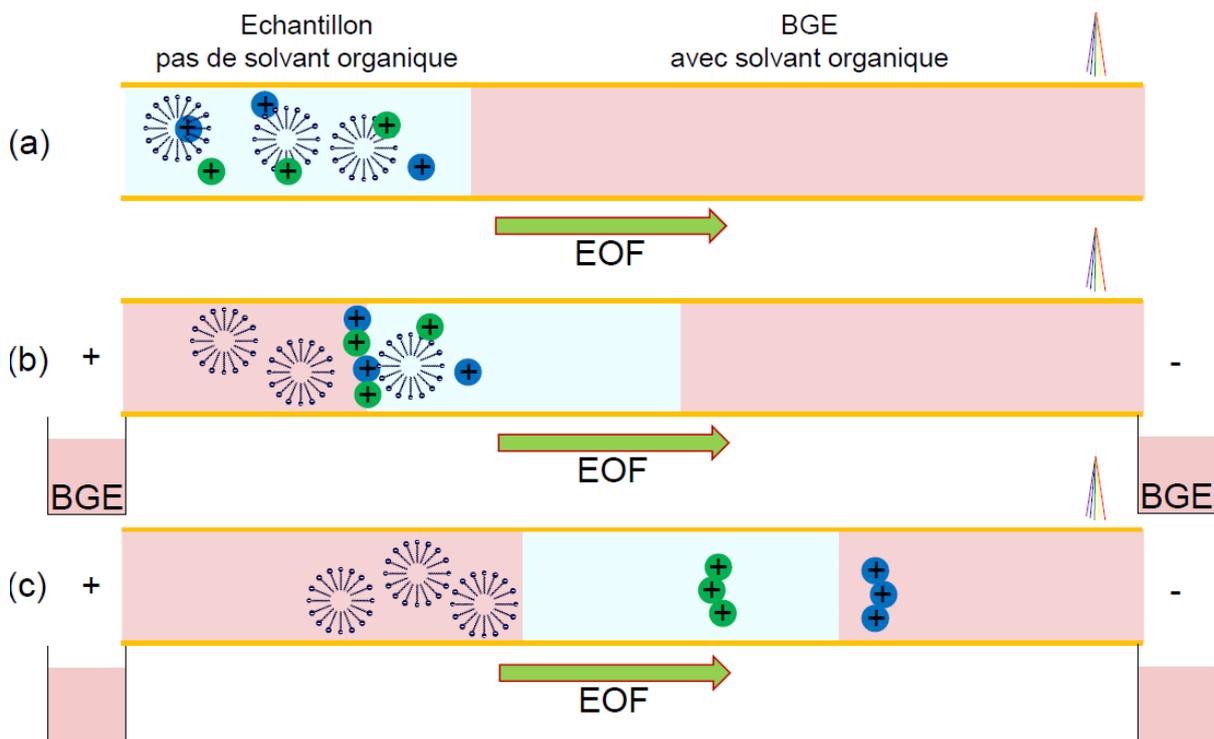


Figure I-6 : Schéma de principe de la préconcentration par « *Micelle to Solvent Stacking* ». (a) Conditionnement du capillaire par un BGE ne contenant pas de micelles mais un solvant organique et injection hydrodynamique d'une longue zone d'échantillon contenant des micelles mais pas de solvant organique. (b) Application de la tension : migration des analytes vers la frontière de focalisation où leur mobilité électrophorétique est inversée. (c) Séparation des analytes par CZE.

## Partie I - Etude Bibliographique

---

La MSS est donc dictée par un changement de signe de la mobilité électrophorétique des analytes entre la zone échantillon et le BGE. Le processus d'inversion du signe de la mobilité électrophorétique des analytes à la frontière de préconcentration intervient lorsque l'affinité pour les micelles chute et qu'ainsi la contribution du transport par les micelles devient plus petite que celle des analytes dans le BGE. Ceci est traduit par l'équation suivante :

$$\mu_{\text{effa, FF}} = \frac{1}{1+k} \mu_{\text{effa}} + \frac{k}{1+k} \mu_{\text{eff, mc}} \quad (12)$$

où  $\mu_{\text{effa, FF}}$  représente la mobilité effective d'un analyte à la frontière électrolyte/échantillon,  $\mu_{\text{effa}}$  celle d'un analyte et  $\mu_{\text{eff, mc}}$  celle des micelles dans la zone échantillon [174]. L'inversion du signe de la mobilité électrophorétique se produit donc lorsque le facteur de rétention  $k$  devient suffisamment faible. S'il y a destruction des micelles par le solvant, il peut même devenir égal à zéro [175-177].

Ce phénomène est donc influencé par (i) la quantité de solvant organique dans l'électrolyte, (ii) la concentration en tensioactif qui doit être supérieure à la cmc sans trop s'en éloigner et (iii) l'affinité des composés pour les micelles [173]. Contrairement au *sweeping*, l'écoulement électroosmotique a une importance capitale puisqu'il a été montré que pour éviter tout effet piston, comme dans les méthodes de préconcentration par amplification du champ, la différence des conductivités ne doit pas excéder un rapport de 10 [174,175]. Enfin, au niveau des matrices analysables, il n'y a pas encore suffisamment d'études pour conclure de manière définitive, mais il semble qu'à cause du rapport limité des conductivités entre l'échantillon et l'électrolyte, les matrices de grande conductivité ne soient pas directement analysables et qu'une étape de dessalement soit nécessaire.

L'exemple montré ci-dessus correspond à la préconcentration de cations en utilisant un tensioactif anionique. Ce concept a aussi été appliqué à l'analyse d'anions avec un tensioactif cationique [173]. Une variante de la MSS a été introduite, permettant le couplage avec une séparation en MEKC. Pour cela, une zone de piégeage (l'électrolyte avec une grande quantité de solvant) est introduite après l'injection de l'échantillon. Ainsi, lors de l'application de la tension, les analytes sont préconcentrés dans cette zone piège. Ensuite ils rencontrent l'électrolyte qui contient un tensioactif neutre et sont séparés par MEKC [178]. Même si les applications sont encore peu nombreuses, la MSS a été appliquée à quelques échantillons

comme des alcaloïdes dans les urines et des médicaments [179,180], des herbicides dans les urines [181] et les gains en sensibilité vont de quelques dizaines à 1000.

### **I.5. Conclusions sur l'application des méthodes de préconcentration**

Comme les méthodes présentées précédemment mettent en jeu des mécanismes de préconcentration différents, leur application à des échantillons réels dépend de la nature des composés (ionisés et ionisables, neutres, propriétés acido-basiques), mais aussi des matrices dans lesquelles ceux-ci se trouvent (conductivité, nature des ions en présence, pH). Ainsi, il est difficile de dire que telle ou telle méthode procure systématiquement des gains en sensibilité plus élevés qu'une autre. Ce dernier propos est confirmé lorsque l'on essaye de tirer des tendances générales à partir des quelques articles dans lesquels les auteurs se sont attachés à comparer différentes méthodes de préconcentration [182-191]. Dès lors, avant d'utiliser une méthode de préconcentration, il est important de considérer le cas de figure auquel l'expérimentateur se trouve confronté.

Les méthodes d'amplification du champ électrique (sauf la t-ITP) s'adressent plus particulièrement aux espèces chargées présentes dans des matrices faiblement conductrices et dont la conductivité est maîtrisée. Il est possible de les appliquer à des échantillons conducteurs, mais dans ces cas là, une préparation d'échantillon (dessalement) est indispensable. Les gains en sensibilité sont très variables car ils dépendent de la nature des composés et des matrices, mais il est à noter, cependant, que des limites de détection très faibles peuvent être obtenues ; à titre d'exemple, des auteurs ont rapporté des LOD de 9 ppt pour l'analyse de l'arsenic dans des eaux potables en utilisant le FESI avec une contre-pression [94].

La méthode *pH-dynamic junction* est applicable aux espèces présentant des propriétés acido-basiques présentes aussi bien dans des matrices de faible que de forte conductivité. A cause des problèmes liés à la frontière mobile de réaction, mentionnés préalablement, les gains en sensibilité et les LOD associées sont aussi très variables. Toutefois, de faibles limites de détection peuvent être obtenues ; ainsi pour l'analyse de phénol dans des eaux potables, une limite de détection de 4 ppb a été rapportée [192].

La t-ITP est envisageable uniquement pour les composés chargés, mais présente l'avantage d'être directement applicable aux échantillons de haute conductivité, même si celle-ci doit être maîtrisée pour que les résultats obtenus ne varient pas d'une matrice à une autre. Par exemple, une LOD de 3 ppb pour l'iodate dans du sel de table sans qu'une préparation d'échantillon ne soit nécessaire a été rapportée [193].

Enfin, le *sweeping* est sûrement la méthode la plus universelle, puisqu'elle s'applique aussi bien aux composés chargés qu'à ceux qui sont neutres, à condition qu'ils soient hydrophobes, ainsi qu'aux matrices de faible et forte conductivité. C'est bien grâce à ces propriétés qu'elle est à ce jour la méthode de préconcentration la plus utilisée en CE. Les LOD sont très variables en fonction des cas de figure, mais surtout en fonction de la nature des composés puisque les gains en sensibilité sont pratiquement proportionnels aux affinités des analytes pour la pseudo-phase. On peut quand même citer à titre d'exemple l'analyse d'oxazolidinone dans l'eau qui a permis d'atteindre une LOD de 50 ppt [194].

Les exemples pour lesquels des LOD très basses ont été rapportées, sont des cas rares puisque dans la majorité des situations les résultats obtenus ne permettent pas d'obtenir de si faibles LOD. Pour résoudre ce problème et descendre encore plus bas dans les limites de détection, il est possible de coupler deux méthodes de préconcentration électrocinétique.

### **I.6. Couplage des méthodes de préconcentration**

Le couplage des méthodes de préconcentration en CE est possible parce que les mécanismes mis en jeu sont basés sur des principes différents. A titre d'exemple, les méthodes de préconcentration par amplification du champ électrique peuvent être couplées avec le *sweeping*. La complémentarité de ces deux méthodes vaut à ce couplage d'être le plus employé, mais d'autres ont aussi été étudiés et utilisés comme le *pH-dynamic junction* avec le *sweeping* [195-198] et plus récemment la MSS avec le *sweeping* [199,200]. Dans ce paragraphe sont présentés les deux couplages qui ont montré les meilleurs résultats en termes de gain en sensibilité ; il s'agit du couplage entre le FESI avec la t-ITP et le FESI avec le *sweeping*.

### I.6.1 Couplage du FESI avec la t-ITP

A cause des critères de séparation, les durées d'injection sont limitées avec la configuration classique du FESI et donc les gains en sensibilité qui en résultent. En 2003, Hirokawa et coll. ont introduit le couplage du FESI avec la t-ITP, permettant ainsi la possibilité d'injecter plus d'analytes qu'en FESI seul, puisqu'ils subissent une deuxième préconcentration par t-ITP [201]. Ce couplage est répertorié dans la littérature sous le nom de *ElectroKinetic Supercharging* (EKS).

Les étapes mises en jeu dans cette méthode sont représentées dans la Figure I-7, avec des conditions sans EOF. Tout d'abord, le capillaire est conditionné par l'électrolyte de séparation, puis est introduite une courte zone d'ion meneur concentrée et donc de forte conductivité. Ensuite, la tension est appliquée (positive pour des analytes cationiques) avec à l'entrée du capillaire l'échantillon de faible conductivité et à la sortie le BGE. Du fait de la différence de conductivité, les analytes sont préconcentrés en tête de capillaire par FESI. Après l'injection des analytes, une zone contenant un ion terminal est introduite avant que la tension de séparation ne soit appliquée avec le BGE à l'entrée et à la sortie du capillaire. Ainsi, une configuration de t-ITP est créée pour les analytes (préalablement concentrés par FESI), qui ont leur mobilité comprise entre celles de l'ion meneur et de l'ion terminal. Dès lors, un gradient de champ électrique se met en place et les concentrations des ions, classés selon leur mobilité électrophorétique, s'ajustent sur celle de l'ion meneur. Enfin, les analytes sont séparés par CZE.

Comme les analytes sont concentrés une deuxième fois par t-ITP, les durées d'injection lors de l'étape de FESI peuvent être plus longues (des durées de 200 s ont été rapportées) que classiquement, ce qui permet de gagner en sensibilité [202]. Aussi, la dispersion entraînée par l'écoulement électroosmotique ne pose pas de problème puisque la t-ITP concentre à nouveau les analytes [201,202]. Enfin, la mise en place de cette méthode n'est pas des plus simples puisque les paramètres du FESI et de la t-ITP sont à optimiser.

Cette méthode a été appliquée à de nombreux composés présents dans différentes matrices comme des flavonoïdes dans des herbes [203], l'erbium (III) dans des eaux [204], des anti-inflammatoires dans le sang [205], des protéines digérées [206], des cations inorganiques dans des milieux primaires de centrale nucléaire [207]. Toutefois, il est à noter que pour ces applications à des cas réels, un dessalement de l'échantillon est nécessaire puisque la première étape est le FESI qui est, comme expliqué précédemment, sensible à la concentration en sel.

## Partie I - Etude Bibliographique

Les gains en EKS peuvent être accrus en augmentant les durées d'injection grâce à l'utilisation d'une contre-pression [208,209]. Ceci a été montré par Dawod et coll. qui ont comparé dans les conditions optimales l'EKS sans et avec contre-pression grâce à une approche multivariée [208,209]. L'utilisation de ce dernier dispositif permet d'injecter pendant des durées légèrement plus élevées, mais surtout d'empêcher l'introduction de la matrice. Pour l'analyse d'anti-inflammatoires dans des eaux, des gains en sensibilité de l'ordre de 10 000 ont été rapportés, soit une amélioration d'environ un facteur 5 par rapport à la méthode développée sans contre-pression.

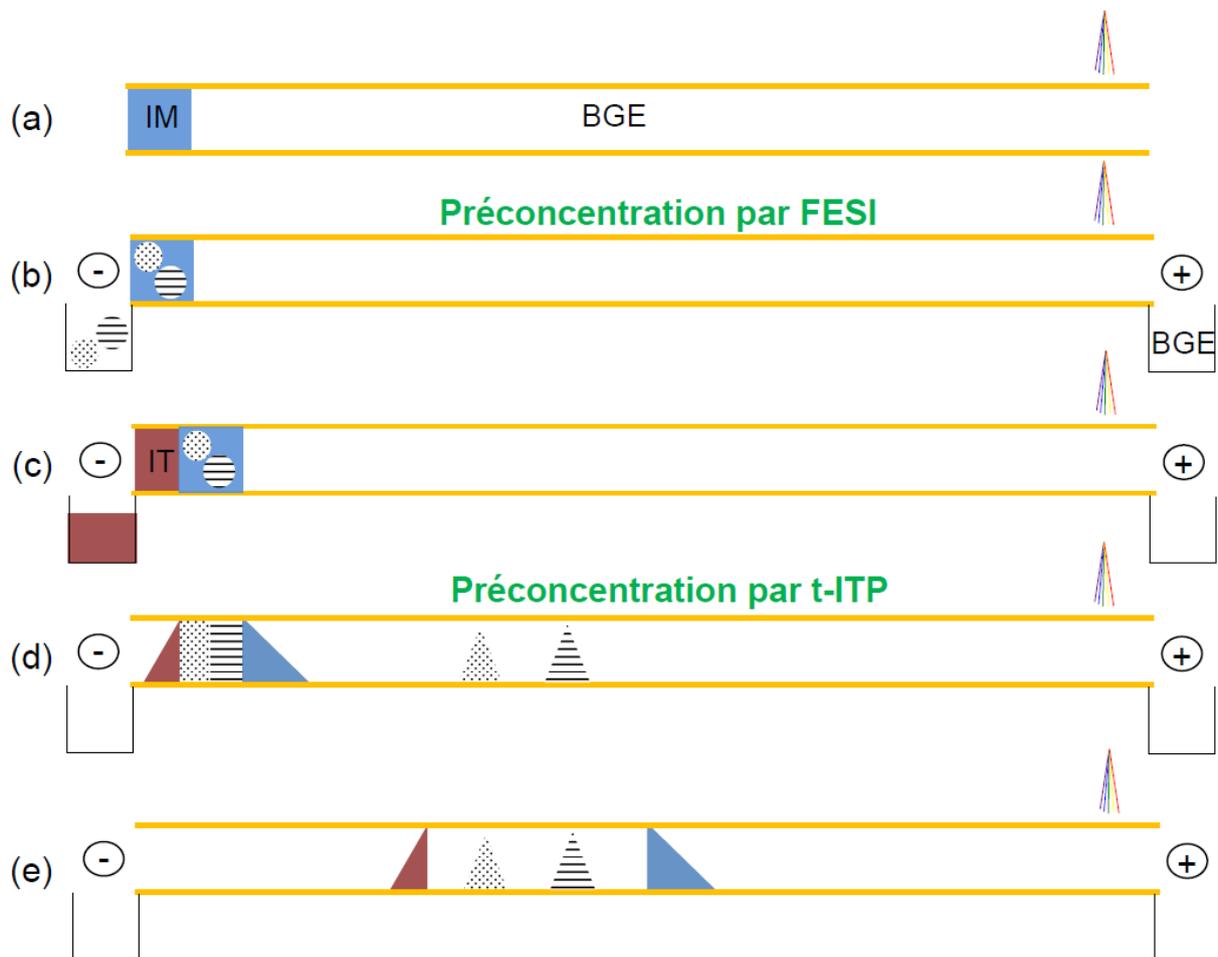


Figure I-7 : Schéma de principe de la préconcentration par *Electrokinetic Supercharging*. (a) Conditionnement du capillaire par l'électrolyte et une courte zone d'ion mineur. (b) Préconcentration par FESI des analytes. (c) Introduction hydrodynamique d'une courte zone d'ion terminal. (d) Application de la tension de séparation entraînant la préconcentration des analytes par t-ITP. (e) Séparation des analytes en mode zone.

Enfin, une variante du couplage du FESI avec la t-ITP a été présentée récemment. Le principe est différent de l'EKS, puisque ces deux étapes s'effectuent de manière concomitante. En effet, les analytes sont injectés de manière électrocinétique dans le capillaire contenant l'électrolyte et l'ion meneur, tandis que l'ion terminal est contenu dans l'échantillon [211]. En se mettant dans des conditions particulières de concentration de l'ion terminal, un état stationnaire est créé de telle sorte que la migration électrophorétique des analytes est contre-balançée par l'écoulement électroosmotique. Ainsi, une durée d'injection de 20 min a été rapportée avec des gains en sensibilité de 100 000, ce qui a permis l'analyse de deux antidépresseurs dans des eaux usées, sans étape de dessalement et d'extraction de l'échantillon.

### **I.6.2. Couplage du FESI avec le *sweeping***

Le couplage du FESI avec le *sweeping* a été montré pour la première fois en 2000 par Quirino et coll. pour l'analyse de cations dans des eaux et introduit sous le nom de *Cation Selective Exhaustive Injection-Sweeping-Micellar ElectroKinetic Chromatography* (CSEI-Sweep-MEKC) [212]. Les gains en sensibilité obtenus avec cette méthode sont à ce jour les plus élevés rapportés, à savoir 900 000. Ces résultats impressionnants résultent de la combinaison du *sweeping* et du FESI avec une longue injection électrocinétique de l'échantillon (jusqu'à 1000 s). Plus tard, cette même méthode a été introduite pour l'analyse d'anions [213]. Le terme général de *Field Enhanced Selective Injection-Sweeping-Micellar ElectroKinetic Chromatography* (FESI-Sweep-MEKC) sera alors utilisé dans ce manuscrit.

#### ***I.6.2.1. Mécanisme du FESI-Sweep-MEKC***

Le principe de cette technique est présenté en Figure I-8. Le capillaire est tout d'abord conditionné par l'électrolyte de séparation ne contenant pas de micelles, puis est introduite une large zone de haute conductivité ne contenant ni solvant organique ni micelles (*High Conductivity Buffer*, HCB) et enfin une petite zone d'eau (a). Les analytes sont ensuite injectés grâce à l'application d'une tension (négative dans le cas de cations) en plaçant respectivement l'échantillon présent dans une matrice de faible conductivité et l'électrolyte sans micelles à l'entrée et à la sortie du capillaire (b). Du fait de la différence de conductivité entre l'échantillon et le HCB, les analytes sont concentrés dans le HCB par le phénomène

## Partie I - Etude Bibliographique

d'amplification du champ. A la fin de l'injection électrocinétique, les analytes, bien que concentrés dans le HCB, occupent une place trop importante pour satisfaire aux critères de séparation puisque les durées d'injection peuvent être très longues. C'est pourquoi une deuxième étape de concentration par *sweeping* est mise en jeu en plaçant à l'entrée et à la sortie du capillaire l'électrolyte contenant les micelles et en inversant la polarité. Les micelles entrent dans le capillaire et entraînent de proche en proche les analytes présents dans le HCB qui sont ainsi focalisés, ce qui est favorisé par l'absence de solvant organique dans le HCB (c). Ils sont ensuite séparés par MEKC (d).

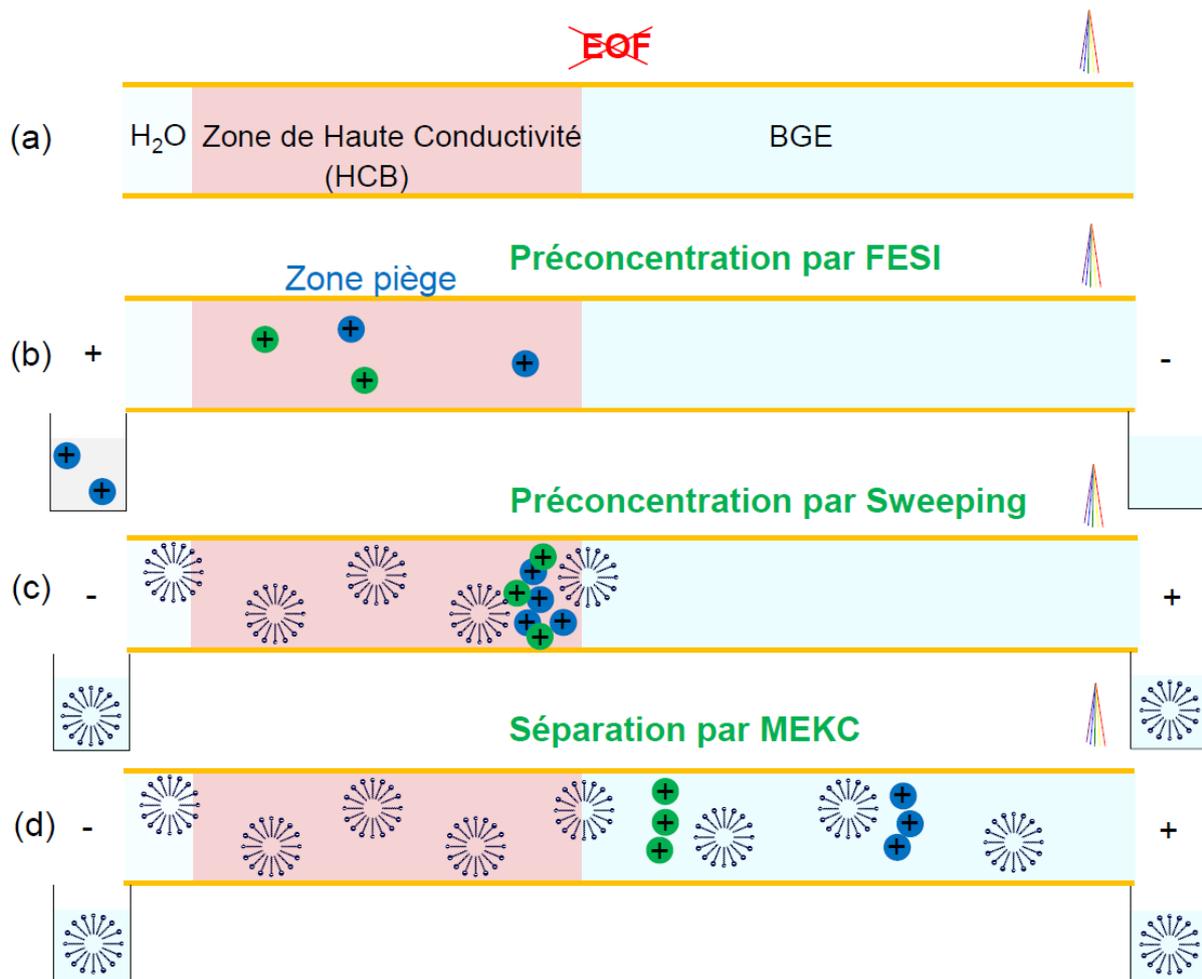


Figure I-8 : Schéma de principe de la préconcentration par *FESI-Sweep-MEKC*. (a) Conditionnement du capillaire par le BGE (ne contenant pas de micelles, mais un solvant organique), puis par le HCB (contenant ni micelles, ni solvant organique) et enfin une courte zone d'eau. (b) Application d'une tension positive : les cations présents dans l'échantillon de faible conductivité sont concentrés par FESI dans le HCB. (c) Inversion de la tension (BGE avec micelles placé dans les réservoirs d'entrée et de sortie) : les analytes sont concentrés à nouveau par *sweeping* grâce aux micelles qui entrent dans le capillaire. (d) Séparation par MEKC.

## Partie I - Etude Bibliographique

Les grands facteurs de préconcentration obtenus avec cette méthode résultent de la possibilité d'utiliser des durées d'injection très longues allant jusqu'à 1000 s par exemple [214]. Ceci est possible grâce à l'utilisation du HCB qui sert de « piège » pour les analytes. Zhang et Thormann avaient déjà envisagé (en 1998) l'utilisation d'une telle zone pour favoriser la préconcentration par amplification du champ mais sans exploiter son potentiel pour de longues injections électrocinétiques [67]. Ce potentiel a été très bien montré par Quirino et Terabe (Figure I-9) [212].

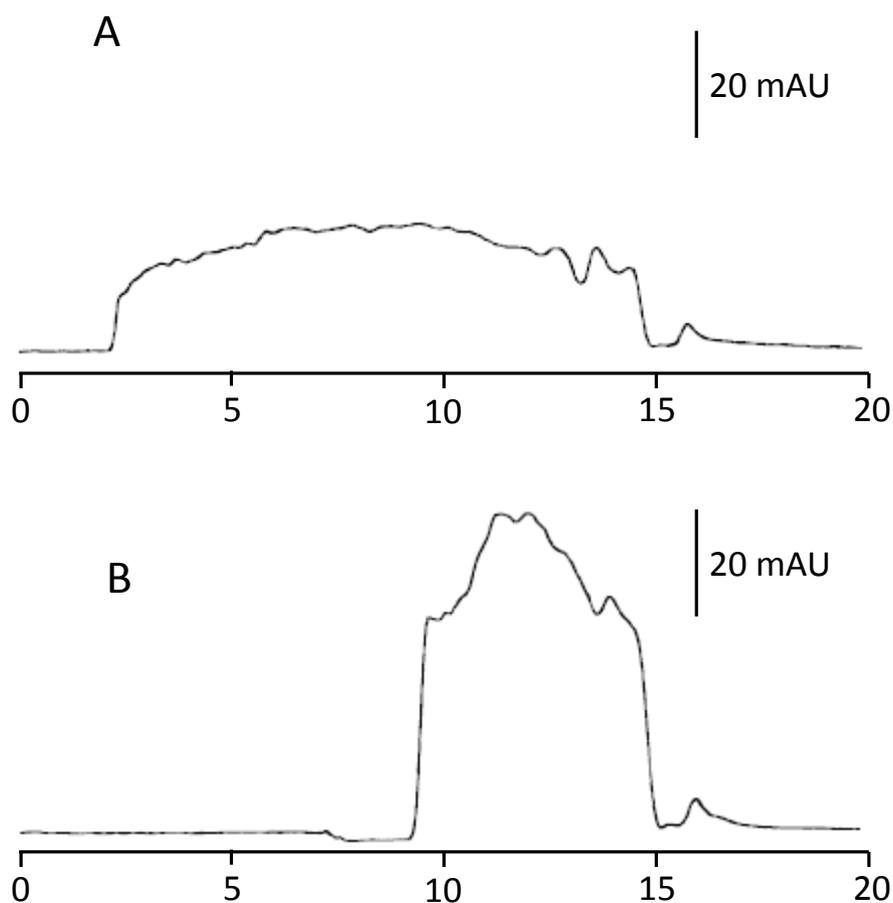


Figure I-9 : Effet de la présence du HCB sur l'étape de FESI observé après une mobilisation par pression (50 mbars). BGE : acide phosphorique 50 mM/acétonitrile (8:2, v/v). Echantillon : 291 ppb de 1-naphtylamine dans de l'eau ultra-pure. HCB : acide phosphorique 100 mM. Procédure d'injection : 3 mm d'eau ultra-pure suivi de l'injection électrocinétique (+ 25 kV pendant 500 s) de l'échantillon (A), 26,4 cm de HCB et 3 mm d'eau ultra-pure suivi de l'injection électrocinétique (+ 25 kV pendant 500 s) de l'échantillon (B) [212].

Dans cette figure sont comparés les résultats obtenus (hauteurs et largeurs de pic) suite à l'injection électrocinétique de la 1-naphtylamine en absence (A) et en présence (B) d'une

## Partie I - Etude Bibliographique

---

zone de HCB. Pour bien visualiser l'état du système après l'injection, une pression a été appliquée jusqu'à ce que la zone occupée par l'analyte passe devant le détecteur. En comparant les Figures 9 A et B, on remarque très clairement qu'en présence du HCB, la trace UV de l'analyte est trois fois plus haute et deux fois moins large que sans HCB. Ainsi, des durées d'injection élevées peuvent être utilisées, sans qu'après cette étape les analytes occupent une bande trop longue dans le capillaire, ce qui serait préjudiciable pour les performances de séparation, malgré l'étape de *sweeping* qui focalise à nouveau. Enfin, du fait des grandes différences de conductivité des différentes zones présentes dans le capillaire, il est indispensable de travailler dans des conditions où il n'y a pas d'EOF, soit en travaillant à pH très bas, soit en utilisant des capillaires greffés neutres.

Dès lors, cette méthode a été appliquée à différents composés dans différentes matrices et ses applications sont présentées plus en détail dans le paragraphe suivant.

### ***1.6.2.2. Applications du FESI-Sweep-MEKC***

Les différentes applications du *FESI-Sweep-MEKC* recensées dans la littérature figurent dans le Tableau I-1. Quelques auteurs ont présenté des variantes de cette méthode en introduisant une étape de changement de pH quand les analytes entrent dans le HCB, mais les résultats obtenus ne présentent pas d'amélioration par rapport à la configuration originale [238-240]. Nous nous sommes donc attachés à présenter dans ce paragraphe les applications du *FESI-Sweep-MEKC* résultant du mécanisme exposé précédemment.

Les informations relevées pour chaque application et classées dans le Tableau I-1 sont celles qui concernent la nature des composés et les matrices analysées, l'utilisation préalable d'une étape de préparation d'échantillons ou non, les SEF, les limites de détection obtenues pour des standards ou dans les cas réels, la nature du HCB et enfin si une zone d'eau a été introduite ou non. Outre les applications variées, tant au niveau de la nature des composés que celle des matrices, il est intéressant de remarquer que les SEF sont, dans la grande majorité des cas, élevés et que, combiner avec une étape de préparation d'échantillons, les LOD rapportées sont toutes dans la gamme des ppb, voir des ppt. Toutefois, comme cela a bien été souligné dans l'article de Terabe et coll., du fait de l'étape d'injection en FESI, les LOD dépendent très fortement de la conductivité de la matrice [236]. En effet, alors que dans des eaux ultra-pures très faiblement conductrices les LOD obtenues sont comprises entre 75 ppt et 1 ppb pour l'analyse d'herbicides, celles dans des eaux potables (contenant donc plus de sels)

## Partie I - Etude Bibliographique

---

ne sont plus que de 0,5 à 3,3 ppb. Ce propos est corroboré par les résultats présentés par Cheng et coll. qui ont obtenu des SEF de 40 uniquement lors de l'analyse de méthamphétamine et ses métabolites dans l'urine, sans que l'échantillon n'ait été dessalé [228]. Cet exemple montre bien la nécessité de maîtriser la conductivité de la matrice, tant pour la répétabilité des résultats que pour les niveaux de LOD atteints. Ainsi, sauf pour des eaux faiblement conductrices, il est nécessaire d'effectuer une étape de préparation d'échantillons (dessalement). Dès lors, les LOD rapportées par Quirino dans les deux articles fondateurs de cette méthode où les échantillons étaient des solutions d'eau ultra-pure dopées [212,235] ne représentent pas la réalité des choses et les facteurs d'enrichissement rapportés comme étant ceux les plus élevés dans la littérature ne sont pas réalistes, bien que le *FESI-Sweep-MEKC* reste une méthode extrêmement sensible pour l'analyse de traces.

De prime abord, la mise en place de cette méthode peut s'avérer difficile puisqu'un certain nombre de paramètres sont potentiellement influents, à savoir la concentration en SDS (responsable de l'étape du *sweeping*), la durée d'injection, la conductivité de la matrice, la longueur, la conductivité et la nature du HCB et enfin la présence d'une zone d'eau. Tous ces paramètres listés résultent de l'analyse du mécanisme de la méthode. A ce jour, les différents auteurs ne sont pas d'accord sur l'influence des paramètres énumérés ci-dessus. En effet, certains auteurs ont optimisé la conductivité du HCB [219,222,235] alors que d'autres ne le font pas [215,218,223], quelques-uns ont étudié l'influence de la concentration en SDS [215,220,224] et d'autres non [219,229,235]. Ce propos est illustré dans le Tableau I-1 quand a été rapportée la nature du HCB utilisé ainsi que la présence ou non d'une zone d'eau. On remarque qu'il n'y a pas de consensus sur la nature du HCB qui doit être employé, alors que d'après la KRF ce paramètre devrait avoir une influence. Aussi, la polémique sur la nécessité de la présence d'une zone d'eau quand des injections électrocinétiques sont utilisées est bien reflétée dans le tableau puisque certains auteurs en utilisent une alors que d'autres ne le font pas et il n'y a pas de justification claire à ce jour.

En conclusion, alors que le couplage du FESI et du *sweeping* présenté par Quirino et Terabe en 2000 présente un potentiel certain, de nombreuses zones d'ombre sont encore à éclaircir sur le mécanisme de cette méthode.

## Partie I - Etude Bibliographique

Composés	Matrice	Préparation d'échantillon <sup>a</sup>	SEF (FESI-Sweep-MEKC)	LOD (ppb)		Nature du HCB	Zone d'eau	Réf
				Standard	Matrice			
Cypromazine, Mélamine	Lait	Oui (SPE)	6200-9200	0,0437; 0,0234	N. S	Phosphate de sodium (pH 2,0)	Non	[215]
Méthadone, EDDP, EMPD	Serum	Oui (LLE)	1800-2400	N. S	0,200; 0,400; 0,200	Phosphate de sodium (pH 4,0)	Non	[216]
Isoniazide	Plasma humain	Oui (LLE)	N.S	N. S	9	Acide phosphorique <sup>b</sup>	Oui	[217]
Mélamine, Amméline	Lait	Oui (LLE)	8000-9200	0,01; 0,01	N. S	Acide phosphorique <sup>b</sup>	Oui	[228]
NAB, NNK, NNAL, iso-NNAL	Urine	Oui (SPE)	2400-6800	4; 16; 4; 4	N. S	Acide phosphorique (pH 2,5)	Oui	[219]
Vert de malachite	Eau d'élevage	Oui (CPE)	2500	0,0696	N. S	Acide citrique (pH 2,0)	Non	[220]
DBT, DPT, DiPT, 5MeO-DiPT, DET, AMT, 5-MeO-AMT, DMT, 5-MeO-DMT	Urine humaine	Oui (LLE)	400-1200	1,6; 2,4; 1,9; 2,7 2,0; 1,5; 1,4; 1,3	N. S	Phosphate de sodium <sup>b</sup>	Non	[221]
Héroïne, 6-AM, Codéine, Morphine	Urine humaine	Oui (LLE)	N.S	N. S	10; 10; 10; 10	Phosphate de sodium <sup>b</sup>	Non	[222]
Sertraline, Fluoxétine, Paroxétine Fluoxamine, Citaloprame	Plasma humain	Oui (SPE)	57000-12000	0,10; 0,10; 0,12 0,22; 0,056	N. S	Acide citrique/phosphate de sodium <sup>b</sup>	Non	[223]
Cocaïne, Norcocaïne, Cocaéthylène Benzoylécgonine	Urine humaine	Oui (SPE)	20600-39600	N. S	0,18; 0,13; 0,16 2,1	Acide phosphorique (pH 1,8)	Non	[224]
Morphine, Codéine, NM, M6G, M3G	Urine humaine	Oui (SPE)	2000-2500	N. S	10; 10; 10; 35; 25	Phosphate de sodium <sup>b</sup>	Non	[225]
Méthamphétamine, Kétamine Codéine, Morphine	Cheveux	Oui (LLE)	3000-4000	N. S	0,050; 0,050 0,1; 0,2	Phosphate de sodium <sup>b</sup>	Non	[226]
Méthamphétamine, Kétamine Codéine, Morphine	Urine humaine	Non	N.S	N. S	5; 5 15; 15	Phosphate de sodium <sup>b</sup>	Non	[227]
Méthamphétamine, Amphétamine p-hydroxyméthamphétamine	Urine humaine	Non	40	N. S	20; 15 15	Phosphate de sodium (pH 3)	Non	[228]
MDMA, Mam, Am	Cheveux	Oui (LLE)	1000-1500	0,04; 0,05; 0,04	N. S	Phosphate de sodium (pH 2,9)	Oui	[229]
MDMA, Méthamphétamine, Amphétamine	Eau ultra pure	Non	2500-10000	0,006; 0,008; 0,007	N. S	Phosphate de sodium <sup>b</sup>	Non	[230]
Ephédrine, Pseudoéphédrine, Méthyléphédrine Méthylpseudoéphédrine Noréphédrine, Norpseudoéphédrine	Sang de souris	Oui (LLE)	8000-10000	30,8; 32,5; 3,21 3,28 3,04; 6,24	N. S	Acide phosphorique <sup>b</sup>	Oui	[231]
Corticostérone, 17-Hydroxycostérone	Urine humaine	Oui (LLE)	1400-2300	5; 4	N. S	Acide phosphorique <sup>b</sup>	Oui	[232]
LAMPA, LSD	Sang de souris	Oui (LLE)	8800-13000	N. S	0,6	Acide phosphorique <sup>b</sup>	Oui	[233]
LAMPA, LSD	Sang de souris	Oui (LLE et SPE)	N.S	N. S	0,6	Acide phosphorique <sup>b</sup>	Oui	[234]
Paraquate, Diquate, Difenzoquate	Eaux potable	Non	1000-5200	0,075; 0,1; 1,0	0,5; 1,0; 3,3	Phosphate de sodium (pH 2,5)	Oui	[235]
N-1-naphthyléthylènediamine, 3,5-diméthylalanine 3-chloroaniline, 1-phényléthylamine, N-éthylaniline 2-méthylalanine, 4-méthoxyaniline	Eau ultra pure	Non	10000-100000	0,1; 0,1 0,1; 0,1 0,1; 0,1	N. S	Acide phosphorique <sup>b</sup>	Oui	[236]
Laudanosine, 1-Naphthylamine	Eau ultra pure	Non	700000-900000	0,0041; 0,008	N. S	Acide phosphorique <sup>b</sup>	Oui	[212]
Ammélide, Acide cyanurique	Lait	Oui (LLE)	5000-3000	0,05; 0,02	N. S	Borate de sodium <sup>b</sup>	Oui	[218]
Dansyle-Leucine, Dansyle-Valine, Dansyle-Sérine	Eau ultra pure	Non	1000-6000	1,2; 0,9; 0,8	N. S	Tampon Tris-HCl <sup>b</sup>	Oui	[237]

<sup>a</sup> : la préparation d'échantillon ne tient pas compte des filtrations, homogénéisation, solubilisation et dégazage aux ultra-sons

<sup>b</sup> : les valeurs de pH ne sont pas indiquées par les auteurs

N.S : Non Spécifié

## Partie I - Etude Bibliographique

---

Tableau I-1 : Applications du *FESI-Sweep-MEKC*. Sont mentionnés les résultats en termes de LOD, SEF et les deux paramètres critiques nature du HCB et présence d'une zone d'eau. Abréviations : EDDP (2-éthylidène-1,5-diméthyl-3,3-diphénylpyrrolidine), EMDP (2-éthyl-5-méthyl-3,3-diphényl-1-pyrroline), NAB (N'-nitrosoanabasine), NNK (4-(méthylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol), NNAL (4-(méthylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol), iso-NNAL (4-(méthylnitrosamino)-4-(3-pyridyl)-1-butanol), DBT (N,N-dibutyltryptamine), DPT (N,N-dipropyltryptamine), DiPT (N,N-diisopropyltryptamine), 5MeO-DiPT (5-méthoxy- N,N-diisopropyltryptamine), DET (N,N-diéthyltryptamine), AMT ( $\alpha$ -méthyltryptamine), 5-MeO-AMT (5-méthoxy- $\alpha$ -méthyltryptamine), DMT (N,N-diméthyltryptamine), 5-MeO-DMT (5-méthoxy-N,N-diméthyltryptamine), 6-AM (6-acétylmorphine), NM (normorphine), M6G (morphine-6-glucuronide), M3G (morphine-3-glucuronide), MDMA (méthylènedioxy-méthamphétamine), Mam (méthamphétamine), Am (amphétamine), LAMPA (acide lysergique N,N-méthylpropamide), LSD (acide lysergique diéthylamide).

### I.7. Conclusion générale sur la bibliographie

Du fait de ses dimensions miniaturisées, la sensibilité en CE est faible quand des détecteurs spectrophotométriques sont utilisés. Pour pallier cette limitation, depuis les années 90 et l'introduction de l'amplification du champ électrique comme méthode de préconcentration, de nombreux efforts ont été réalisés dans ce sens, car les stratégies de préconcentration *in-situ* offrent l'opportunité d'améliorer de manière notable les sensibilités sans modification d'appareillage ni utilisation de détecteurs sensibles coûteux.

Ainsi de nombreuses variantes de l'amplification du champ électrique sont apparues avec toujours pour objectif d'améliorer les gains en sensibilité en augmentant au maximum les quantités injectées sans perdre les qualités de la séparation. C'est ainsi qu'est apparue le FESI qui utilise une injection électrocinétique avec le phénomène d'amplification du champ électrique. Cette méthode a montré d'incroyables résultats en terme de limite de détection, malgré une limitation résultant de son mode de fonctionnement propre, à savoir qu'elle ne s'adresse qu'aux espèces chargées et que la conductivité de l'échantillon doit être la plus faible possible, mais surtout maîtrisée pour obtenir des résultats répétables. Ainsi, une préparation d'échantillons est dans la majorité des cas indispensable.

Les études de mécanisme ont révélé que pour l'amplification du champ électrique il est généralement préférable de travailler dans des conditions où l'EOF est minimisé le plus possible. Pour cela, il est conseillé d'utiliser soit des capillaires greffés avec un polymère neutre, soit de travailler dans des conditions acides où l'EOF est connu pour être réduit. Toutefois, même dans ces dernières conditions, l'EOF n'est pas nul. Nous avons donc regardé au cours de ces travaux de recherche, s'il était possible d'obtenir des EOF encore plus faibles en utilisant un greffage avec un polymère neutre (du polyacrylamide) dans des conditions acides.

Une façon d'améliorer les gains en sensibilité est de coupler deux méthodes de préconcentration entre elles, ce qui est possible de par la diversité des mécanismes mis en jeu. C'est ainsi qu'a été introduit en 2000 le couplage du FESI (avec de longues injections électrocinétiques) et du *sweeping*. Bien que cette technique (le FESI-Sweep-MEKC) permette d'atteindre des limites de détection très basses, peu d'articles ont été publiés à ce jour. Ceci résulte peut-être de la complexité de sa mise en place, d'autant que l'influence de chaque paramètre n'est à ce jour pas très claire. Dès lors, au cours de cette thèse nous nous sommes attachés à comprendre l'influence des différents paramètres pouvant avoir une influence, afin d'expliquer les phénomènes mis en jeu (nous avons pour cela utilisé des composés modèles cationiques : des alcaloïdes) et ainsi exploiter au mieux cette méthode (ce que nous avons fait en analysant des herbicides dans des eaux potables).

## Partie I - Etude Bibliographique

---

Pour les techniques de préconcentration telles que la MSS ou le *sweeping*, qui font appel à des agents micellaires ou complexants, les gains en sensibilité peuvent être améliorés en utilisant des agents qui développent des affinités plus fortes et/ou plus sélectives. En 2009, Quirino a présenté la MSS. Elle se rapproche fortement du *sweeping* puisqu'une phase micellaire est utilisée, mais à la différence qu'elle est cette fois-ci présente dans l'échantillon. Bien que les résultats en termes de gain en sensibilité rapportés soient plus faibles qu'avec le *sweeping*, elle présente l'avantage de pouvoir être plus facilement couplée à un spectromètre de masse puisque les concentrations en tensioactif (souvent gênant lors de l'ionisation) sont beaucoup plus faibles. Comme pour le *sweeping*, la nature de la phase micellaire a une importance capitale pour les interactions développées avec les analytes. Ainsi, nous nous sommes attachés au cours de ces travaux à évaluer l'influence de nouvelles phases stationnaires que sont les liquides ioniques à longues chaînes (des composés considérés à ce jour comme des composés verts).

Le *sweeping* présenté en 1998 par Quirino et coll. s'est avéré être une approche particulièrement intéressante puisque les gains en sensibilité peuvent être élevés, mais aussi parce qu'elle s'adresse aussi bien aux espèces chargées qu'à celles qui sont neutres et enfin parce que la conductivité de l'échantillon ne semble pas influencer les résultats finaux. Elle est d'ailleurs à ce jour la méthode de préconcentration la plus utilisée, comme en témoigne le nombre d'articles qui la relate chaque année. Il a été montré que pour le *sweeping* la nature de la phase micellaire, ou pseudo-phase, a une importance capitale puisque les gains en sensibilité sont principalement guidés par l'affinité des analytes pour cette dernière et plusieurs auteurs se sont attachés à regarder ceci en utilisant différents agents de *sweeping*. Toutefois, peu d'études, voire aucune n'ont été faites sur l'utilisation d'un agent de *sweeping* sélectif, voire spécifique, à une molécule donnée. Au cours de ces travaux de thèse, nous nous sommes donc attachés à regarder le potentiel d'une telle approche en utilisant un aptamère (les aptamères sont des oligonucléotides composés de 20 à 60 bases, présentant des affinités particulièrement fortes pour une cible donnée) anti-Ochratoxine A, une toxine très recherchée dans les produits alimentaires tel que les vins.

### I.8. Références

- [1] A. K. Altria, *LC-GC Int.*, 1999, 12, 24-29
- [2] S. Kim, W. Kim, J. H. Hann, *J. Chromatogr. A*, 1994, 680, 109-116
- [3] J. A. Olivares, N. T. Nguyen, C. R. Yonker, R. D. Smith, *Anal. Chem.*, 1987, 59, 1230-1232
- [4] P. Pantůčková, P. Gebauer, P. Boček, L. Křivánková, *Electrophoresis*, 2009, 30, 203-214
- [5] L. Rivera, M. Puyol, F. Villuendas, J. Alonso, *Sens. Actuat. B*, 2008, 134, 863-868
- [6] K. Swinney, D. J. Bornhop, *Electrophoresis*, 2000, 21, 1239-1250
- [7] J. H. C. Eriksson, R. Mol, G. W. Somsen, W. L. J. Hinrichs, H. W. Frijlink, G. J. De Jong, *Electrophoresis*, 2004, 25, 43-49
- [8] A. M. Van Wijk, P. G. Muijselaar, K. Stegman, G.J. De Jong, 2007, *J. Chromatogr. A*, 1159, 175-184
- [9] P. Hommerson, A. M. Khan, G. J. de Jong, G. W. Somsen, *Mass Spectrom. Rev.*, 2011, 30, 1096-1120
- [10] P. Pantůčková, P. Gebauer, P. Boček, L. Křivánková, *Electrophoresis*, 2011, 32, 43-51
- [11] S. Götz, U. Karst, *Sens. Actuat. B*, 2007, 123, 622-627
- [12] J. L. Felhofer, L. Blanes, C. D. Garcia, *Electrophoresis*, 2010, 31, 2469-2486
- [13] H. Kataoka, A. Ishizaki, Y. Nonaka, K. Saito, *Anal. Chim. Acta*, 2009, 655, 8-29
- [14] S. Pedersen-Bjergaard, K. Rasmussen, *J. Chromatogr. B*, 2005, 817, 3-12
- [15] J. P. Quirino, S. Terabe, *J. Chromatogr. A*, 2000, 902, 119-135
- [16] J. F. Beckers, P. Boček, *Electrophoresis*, 2000, 21, 2747-2767
- [17] M. C. Breadmore, P. R. Haddad, *Electrophoresis*, 2001, 22, 2464-2489
- [18] M. Urbánek, L. Křivánková, P. Boček, *Electrophoresis*, 2003, 24, 466-485
- [19] P. Gebauer, Z. Malá, P. Boček, *Electrophoresis*, 2011, 32, 83-89
- [20] M. C. Breadmore, M. Dawod, J. P. Quirino, *Electrophoresis*, 2011, 32, 127-148
- [21] Z. Malá, P. Gebauer, P. Boček, *Electrophoresis*, 2011, 32, 116-126
- [22] A. T. Aranas, A. M. Guidote, J. P. Quirino, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, 394, 175-185
- [23] P. D. Grossman, J. C. Colburn, *Capillary Electrophoresis : theory and practice*, Academic Press, San Diego, 1992
- [24] S. F. Y. Li, *J. Chromatogr. Lib.*, vol. 52, Elsevier, Amsterdam, 1992
- [25] G. Bonn, P. Jandick, *Capillary electrophoresis of small molecules and ions*, VCH, Weinheim, 1993

## Partie I - Etude Bibliographique

---

- [26] D. S. Burgi, R-L. Chien, *Anal. Chem.*, 1991, 63, 2042-2047
- [27] R-L. Chien, J. C. Helmer, *Anal. Chem.*, 1991, 63, 1354-1361
- [28] W. Friedl, J. C. Reijenga, E. Kenndler, *J. Chromatogr. A*, 1995, 709, 163-170
- [29] S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, *Anal. Chem.*, 1984, 56, 111-113
- [30] S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, T. Ando, *Anal. Chem.*, 1985, 57, 834-841
- [31] F. Kohlraush, *Ann. Physik.*, 1897, 62, 209-239
- [32] V. Hruška, B. Gaš, *Electrophoresis*, 2007, 28, 3-14
- [33] F. E. P. Mikkers, F. M. Everaerts, T. P. T. M. Verheggen, *J. Chromatogr.*, 1979, 169, 1-10.
- [34] G. M. McLaughlin, J. A. Nolan, R. H. Palmieri, K. W. Anderson, S. C. Morris, J. A. Morrison, T. J. Bronzert, *J. Liquid Chromatogr.*, 1992, 15, 961-1021
- [35] R. L. Chien, D. S. Burgi, *Anal. Chem.*, 1992, 64, 1046-1050
- [36] C. Huhn, U. Pyell, *J. Chromatogr. A.*, 2010, 1217, 4476-4486
- [37] P. Rantakokko, T. Nissinen, T. Vartiainen, *J. Chromatogr. A*, 1999, 839, 217-225
- [38] T. Soga, Y. Inoue, G. A. Ross, *J. Chromatogr. A*, 1995, 718, 421-428
- [39] Y. Xu, Y. Gao, H. Wei, Y. Du, E. Wang, *J. Chromatogr. A*, 2006, 1115, 260-266
- [40] M. Katarzyna, P. Genowefa, T. Stefan, *J. Sep. Sci.*, 2011, 34, 475-480
- [41] R. S. Foote, J. Khandurina, S. C. Jacobson, J. M. Ramsey, *Anal. Chem.*, 2005, 77, 57-63
- [42] L. Ting, Z. G. Z. Ming-Ming, F. Yu-Qi, *J. Chromatogr. A*, 2008, 1205, 163-170
- [43] Z. Hua-Dong, L. Wenjuan, L. Hong-Hong, M. Yan-Hua, H. Shao-Qiang, C. Hong-Li, C. Xing-Guo, *Analyst*, 2011, 136, 1322-1328
- [44] H. Hai-Bo, L. Xiao-Xia, Y. Qiong-Wei, F. Yu-Qi, *Talanta*, 2010, 82, 1562-1570
- [45] W. S. Law, P. Kuban, L. L. Yuan, J. H. Zhao, S. F. Y. Li, P. C. Hauser, *Electrophoresis*, 2006, 27, 1932-1938
- [46] N. Garcia-Villar, J. Saurina, S. Hernandez-Cassou, *Electrophoresis*, 2006, 27, 474-483
- [47] M. Lagarrigue, A. Bossée, A. Bégos, N. Delaunay, A. Varenne, P. Gareil, B. Bellier, *J. Chromatogr. A*, 2008, 1178, 239-247
- [48] W-L. Tseng, H-T. Chang, *Electrophoresis*, 2001, 22, 763-770
- [49] M-M. Hsieh, C-E. Hsu, W-L. Tseng, H-T. Chang, *Electrophoresis*, 2002, 23, 1633-1641
- [50] P-L. Chang, T-C. Chiu, H-T. Chang, *Electrophoresis*, 2006, 27, 1922-1931
- [51] R-L. Chien, D. S. Burgi, *Anal. Chem.*, 1992, 64, 1046-1050
- [52] D. S. Burgi, R-L. Chien, *Anal. Biochem.*, 1992, 202, 306-309
- [53] A. V. Herrera-Herrera, L. M. Ravelo-Perez, J. Hernandez-Borges, M. M. Afonso, J. A. Palenzuela, M. A. Rodriguez-Delgado, *J. Chromatogr. A*, 2011, 1218, 5352-5361

## Partie I - Etude Bibliographique

---

- [54] S. Almeda, L. Arce, M. Valcarcel, *Electrophoresis*, 2008, 29, 3074-3080
- [55] P. Li, J. Duan, B. Hu, *Electrophoresis*, 2008, 29, 3081-3089
- [56] Y. Chen, L. Xu, J. Lin, G. Chen, *Electrophoresis*, 2008, 29, 1302-1307
- [57] D. S. Burgi, *Anal. Chem.*, 1993, 65, 3726-3729
- [58] N. E. Baryla, C. A. Lucy, *Electrophoresis*, 2001, 22, 52-58
- [59] M. Albert, L. Debusschere, C. Demesmay, J.L. Rocca, *J. Chromatogr. A*, 1997, 757, 291-296
- [60] C. Kihwan, J. Y. Gon, C. D. Soo, *J. Chromatogr. A*, 2009, 1216, 6466-6470
- [61] B. Kim, D.S. Chung, *Electrophoresis*, 2002, 23, 49-55
- [62] M. S. Chun, D. S. Chung, *Anal. Chim. Acta*, 2003, 491, 173-179
- [63] M.S Chun, D. Kang, Y. Kim, D. Chung, *Microchem. J.*, 2001, 70, 247-253
- [64] J. H. Han, M. S. Chun, A. Riaz, D. S. Chung, *Electrophoresis*, 2005, 26, 480-486
- [65] R. L. Chien, D. S. Burgi, *J. Chromatogr. A*, 1991, 559, 141-152
- [66] C-X. Zhang, W. Thormann, *Anal. Chem.*, 1996, 68, 2523-2532
- [67] C-X. Zhang, W. Thormann, *Anal. Chem.*, 1998, 70, 540-548
- [68] S. H., Liu, Q. F. Li, X. G. Chen, Z. D. Hu, *Electrophoresis*, 2002, 23, 3392-3397
- [69] C. Sarazin, N. Delaunay, A. Varenne, J. Vial, C. Costanza, V. Eudes, J-J. Minet, P. Gareil, *J. Chromatogr. A*, 2010, 1217, 6971-6978
- [70] B. Claude, R. Nehmé, P. Morin, *Anal. Chim. Acta*, 2011, 699, 242-248
- [71] Z. K. Shibabi, *J. Chromatogr. A*, 2005, 1066, 205-210
- [72] Z. K. Shibabi, *Electrophoresis*, 2002, 23, 1628-1632
- [73] Z. K. Shibabi, *Electrophoresis*, 2002, 23, 1612-1617
- [74] Z. K. Shibabi, *Electrophoresis*, 2006, 29, 175-183
- [75] F. Cañada, A. Kasselouri, P. Prognon, P. Maillard, D. S. Grierson, S. Descroix, M. Taverna, *J. Chromatogr. A*, 2005, 1068, 123-130
- [76] T. Galeano-Diaz, M. Acedo-Valenzuela, N. Mora-Díez, A. Silva-Rodríguez, *Electrophoresis*, 2005, 26, 3518-3527
- [77] T. M. H. Choy, W. H. Chan, A. W. M. Lee, C. W. Huie, *Electrophoresis*, 2003, 24, 3116-3123
- [78] R. Theurillat, M. Kuhn, W. Thormann, *J. Chromatogr. A*, 2002, 979, 353-368
- [79] A. Zinellu, S. Sotgia, M. F. Usai, G. Pintus, L. Deiana, C. Carru, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, 399, 1815-1821
- [80] E. Dabek-Zlotorzynska, M. Piechowski, *Electrophoresis*, 2009, 28, 3526-3534
- [81] E. Bermudo, O. Nunez, E. Moyano, L. Puignou, M. T. Galceran, *J. Chromatogr. A*, 2007, 1159, 225-232

## Partie I - Etude Bibliographique

---

- [82] H. H. See, P. C. Hauser, W. A. W. Ibrahim, M. M. Sanagi, *Electrophoresis* 2010, 31, 575–582
- [83] J. P. Quirino, S. Terabe, *Anal. Chem.*, 1998, 70, 1893-1901
- [84] T. F. Jiang, Z-H. Lv, Y-H. Wang, M-E. Yue, J-H. Peng, *J. Anal. Chem.*, 2010, 65, 945-950
- [85] T-F. Jiang, Z-H. Lv, Zhi-Hua, Y-H. Wang, M-E. Yue, *Biomed. Chromatogr.*, 2010, 24, 581-587
- [86] J-H. Zhang, H. Cui, L. J. Xu, L. Zhang, G. N. Chen, *Electrophoresis*, 2009, 30, 674-681
- [87] S.F. Wang, S. Ye, Y. Y. Cheng, *J. Chromatogr. A*, 2006, 1109, 279-284
- [88] L. Zhu, H. K. Lee, *Anal. Chem.*, 2001, 73, 3065-3072
- [89] X. Li, B. Chanbasha, L. H. Kee, *J. Chromatogr. A*, 2010, 1217, 6036-6043
- [90] X. Li, H. Peter C., L. H. Kee, *J. Chromatogr. A*, 2009, 1216, 5911-5916
- [91] Y. L. Chen, Y. J. Jong, S. M. Wu, *J. Chromatogr. A*, 2006, 1119, 176-182
- [92] H. Xiaoling, D. Deng, X. Wu, Y. Lv, J. Y. Zhang, *J. Chromatogr. A*, 2010, 1217, 5622-5627
- [93] Y-L. Feng, J. Zhu, *Anal. Chem.*, 2006, 78, 6608-6613
- [94] H. Zhang, J. Gavina, Y-L. Feng, *J. Chromatogr. A*, 2011, 1218, 3095-3104
- [95] Y-L. Feng, J. Zhu, *Electrophoresis*, 2008, 29, 1965-1973
- [96] H. Zhang, J. Zhu, Y-L. Feng, *Anal. Sci.*, 2010, 26, 1157-1162
- [97] S-L. Lin, H. D. Tolley, M. L. Lee, *Chromatographia*, 2005, 62, 277-281
- [98] Q. Wang, S-L. Lin, K. F. Warnick, H. D. Tolley, M. L. Lee, *J. Chromatogr. A*, 2003, 985, 455-462
- [99] Q. Wang, B. Yue, M. L. Lee, *J. Chromatogr. A*, 2004, 1025, 139-146
- [100] M. Gong, K. R. Wehmeyer, P. A. Limbach, W. R. Heineman, *Anal. Chem.*, 2006, 78, 6035-6042
- [101] P. K. Dasgupta, K. Surowicc, *Anal. Chem.*, 1996, 68, 4291-4299
- [102] Z. Krivácsy, A. Gelencsér, J. Hlavay, G. Kiss, Z. Sárvári, *J. Chromatogr. A*, 1999, 834, 21-44
- [103] T. Hirokawa, E. Koshimidzu, Z. Q. Xu, *Electrophoresis*, 2008, 29, 3786-3793
- [104] T. D. Boer, K. J. Ensing, *J. Chromatogr., A*, 1997, 788, 212–217
- [105] Z. Xu, K. Nakamura, A. R. Timerbaev, T. Hirokawa, *Anal. Chem.*, 2011, 83, 398–401
- [106] Y. P. Zhao, C. E. Lunte, *Anal. Chem.*, 1999, 71, 3985-3991
- [107] S. Park, C. E. Lunte, *J. Microcol. Sep.*, 1998, 10, 511-517
- [108] D. M. Osbourn, D. J. Weiss, C. E. Lunte, *Electrophoresis*, 2000, 21, 2768-2779

## Partie I - Etude Bibliographique

---

- [109] Y. Xiong, S. R. Park, H. Swerdlow, *Anal. Chem.*, 1998, 70, 3605-3611
- [110] D. K. Kim, S. H. Kang, *J. Chromatogr. A.*, 2005, 1064, 121-127
- [111] Y. H. Tak, G. W. Somsen, G. J. De Jong, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, 401, 3275-3281
- [112] O. A. Mayboroda, C. Neususs, M. Pelzing, G. Zurek, R. Derks, I. Meulenbelt, M. Kloppenburg, E. P. Slagboom, A. M. Deelder, *J. Chromatogr. A.*, 2007, 1159, 149-153
- [113] M-M. Hsieh, H-T. Chang, *Electrophoresis*, 2005, 26, 187-195
- [114] S. D. Arnett, C. E. Lunte, *Electrophoresis*, 2007, 28, 3786-3793
- [115] A. R. Timerbaev, T. Hirokawa, *Electrophoresis*, 2006, 27, 323-340
- [116] P. Mikus, K. Marakova, J. Marak, I. Nemeč, I. Valaskova, E. Havranek, *Curr. Pharmaceut. Anal.*, 2009, 5, 171-178
- [117] J. L. Beckers, F. M. Everaerts, *J. Chromatogr.*, 1990, 508, 19-26
- [118] B. Gaš, J. Vacík, I. Zelenský, *J. Chromatogr. A.*, 1991, 545, 225-237
- [119] F. Foret, V. Sustanek, P. Boček, *J. Microcol. Sep.*, 1990, 2, 229-233
- [120] T. Hirokawa, A. Ohmori, Y. Kiso, *J. Chromatogr. A.*, 1993, 634, 101-106
- [121] J. L. Beckers, F. M. Everaerts, *J. Chromatogr.*, 1990, 508, 3-17
- [122] P. Gebauer, W. Thormann, P. Boček, *J. Chromatogr.*, 1992, 608, 47-57
- [123] P. Gebauer, W. Thormann, P. Boček, *Electrophoresis*, 1995, 16, 2039-2050
- [124] L. Křivánková, P. Pantůčková, P. Boček, *J. Chromatogr. A.*, 1999, 55-70
- [125] L. Křivánková, P. Gebauer, P. Boček, *J. Chromatogr. A.*, 1995, 716, 35-48
- [126] L. Křivánková, P. Gebauer, *J. Chromatogr. A.*, 1993, 638, 119-135
- [127] Th. P. E. M. Verheggen, A. C. Schoots, F. M. Everaerts, *J. Chromatogr.*, 503, 1990, 245-255
- [128] A. C. Schoots, Th. P. E. M. Verheggen, P. M. J. M. De Vries, F. M. Everaerts, *Clin. Chem.*, 36, 1990, 435-440
- [129] Z. Xu, J. Okada, A. R. Timerbaev, T. Hirokawa, *J. Sep. Sci.*, 32, 2009, 4143-4147
- [130] J. P. Quirino, *J. Sep. Sci.*, 2011, 34, 1020-1026
- [131] I. Botello, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, 400, 527-534
- [132] M. Lagarrigue, A. Bossée, A. Bégos, N. Delaunay, A. Varenne, P. Gareil, B. Bellier, *Electrophoresis*, 2009, 30, 1522-1530
- [133] R. Aebbersold, H. D. Morrison, *J. Chromatogr.*, 1990, 516, 79-88
- [132] M. C. Breadmore, R. A. Mosher, W. Thormann, *Anal. Chem.*, 2006, 78, 538-546
- [133] K. Vítková, J. Petr, V. Maier, J. Znaležiona, J. Sevcík, *Electrophoresis*, 2010, 31, 2771-2777

## Partie I - Etude Bibliographique

---

- [134] J. B. Kim, P. Britz-McKibbin, T. Hirokawa, S. Terabe, *Anal. Chem.*, 2003, 75, 3986-3993
- [135] R. Lee, A. S. Ptolemy, L. Niewczas, P. Britz-McKibbin, *Anal. Chem.*, 2007, 79, 403-415
- [136] C. X. Cao, *J. Chromatogr. A*, 1998, 813, 153-171
- [137] C. X. Cao, *J. Chromatogr. A*, 1998, 813, 173-177
- [138] C. X. Cao, S. L. Zhou, Y. Z. He, Y. T. Qian, L. Yang, Q. S. Qu, W. E. Gan, L. Dong, Y. Q. Zhao, W. K. Chen, *J. Chromatogr. A*, 2001, 907, 347-352
- [139] C. X. Cao, S. L. Zhou, X. Y. Zhen, W. K. Chen, Y. T. Qian, *J. Chromatogr. A*, 2000, 891, 337-347
- [140] C. X. Cao, S. L. Zhou, Y. T. Qian, Y. Z. He, C. R. Wang, X. Y. Zheng, W. K. Chen, *J. Chromatogr. A*, 2002, 952, 29-38
- [141] R. Lee, A. S. Ptolemy, L. Niewczas, P. Britz-McKibbin, *Anal. Chem.*, 2007, 79, 403-415
- [142] C. Smadja, I. Le Potier, P. Chaminade, C. Jacquot, J. H. Trouvin, M. Taverna, *Chromatographia*, 2003, 58, 79-85
- [143] C. J. Booker, K. K. C. Yeung, *Anal. Chem.*, 2008, 80, 8598-8604
- [144] M. R. N. Monton, K. Imami, M. Nakanishi, J. B. Kim, S. Terabe, *J. Chromatogr. A*, 2005, 1079, 266-273
- [145] Y. H. Tak, G. W. Somsen, G. J. De Jong, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, 401, 3275-3281
- [146] J. Petr, K. Vítková, V. Ranc, J. Znaleziona, V. Maier, R. Knob, J. Sevcík, *J. Agric. Food Chem.*, 2008, 56, 3940-3944
- [147] J. Petr, V. Maier, J. Znaleziona, K. Vítková, V. Ranc, J. Sevcík, *Chem. Listy*, 2009, 103, 661-666
- [148] J. P. Quirino, S. Terabe, *Anal. Chem.*, 1998, 70, 149-157
- [149] J. P. Quirino, S. Terabe, *Science*, 1998, 282, 465-468
- [150] J. P. Quirino, S. Terabe, *Anal. Chem.*, 1999, 71, 1638-1644
- [151] M. C. Breadmore, J. P. Quirino, W. Thormann, *Electrophoresis*, 2009, 30, 570-578
- [152] J. Palmer, N. J. Munro, J. P. Landers, *Anal. Chem.*, 1999, 71, 1679-1687
- [153] J. Palmer, J. P. Landers, *Anal. Chem.*, 2000, 72, 1941-1943
- [154] J. Palmer, D. S. Burgi, N. J. Munro, J. P. Landers, *Anal. Chem.*, 2001, 73, 725-731
- [155] T. G. Strein, D. Morris, J. Palmer, J. P. Landers, *J. Chromatogr. B*, 2001, 763, 71-78
- [156] J. Palmer, D. S. Burgi, J. P. Landers, *Anal. Chem.*, 2002, 74, 632-638
- [157] C-Y. Lin, W-L. Tseng, *Electrophoresis*, 2009, 30, 532-539

## Partie I - Etude Bibliographique

---

- [158] M. Rowena, N. Monton, J. P. Quirino, K. Otsuka, S. Terabe, *J. Chromatogr. A*, 2001, 939, 99-108
- [159] W. Shi, C. P. Palmer, *J. Sep. Sci.*, 2002, 25, 215-221
- [160] M. Gong, K. R. Wehmeyer, A. Limbach, W. R. Heineman, *J. Chromatogr. A*, 2006, 1125, 263-269
- [161] H-L. Su, M-T. Lan, Y-Z. Hsieh, *J. Chromatogr. A*, 2009, 1216, 5313-5319
- [162] J. P. Quirino, S. Terabe, *Chromatographia*, 2001, 53, 285-289
- [163] J. P. Quirino, P. R. Haddad, *J. Sep. Sci.*, 2011, 34, 2872-2878
- [164] K. Isoo, S. Terabe, *Anal. Sci.*, 2005, 21, 43-47
- [165] W. A. W. Ibrahim, D. Hermawan, M. M. Sanagi, H. Y. Aboul-Enein, *Chromatographia*, 2010, 71, 305-309
- [166] J. P. Quirino, *Electrophoresis*, 2011, 32, 665-668
- [167] A. B. Martinez-Giron, A. L. Crego, M. J. Gonzalez, M. L. Marina, *J. Chromatogr. A*, 2010, 1217, 1157-1165
- [168] J-F. Chiang, Y-T. Hsiao, W-K. Ko, S-M. Wu, *Electrophoresis*, 2009, 30, 2583-2589
- [169] M. Katarzyna, P. Genowefa, T. Stefan, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 2009, 48, 321-330
- [170] W. Zhang, Z. Zhang, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, 2011, 56, 330-335
- [171] K. Sueyoshi, F. Kitagawa, K. Otsuka, *Anal. Chem.*, 2008, 80, 1255-1262
- [172] M. C. Breadmore, J. P. Quirino, W. Thormann, *Electrophoresis*, 2011, 32, 542-549
- [173] J. P. Quirino, *J. Chromatogr. A*, 2009, 1216, 294-299
- [174] A. M. Guidote, J. P. Quirino, *J. Chromatogr. A*, 2010, 1217, 6290-6295
- [175] J. P. Quirino, *J. Chromatogr. A*, 2008, 1214, 171-177
- [176] J. P. Quirino, *Electrophoresis*, 2009, 30, 875-882
- [177] J. P. Quirino, P. R. Haddad, *Anal. Chem.*, 2008, 80, 6824-6829
- [178] L. Liu, X. Deng, X. Chen, *J. Chromatogr. A*, 2010, 1217, 175-178
- [179] H-D. Zhu, C-L. Ren, S-Q. Hu, X-M. Zhou, H-L. Chen, X-G. Chen, *J. Chromatogr. A*, 2011, 1218, 733-738
- [180] X. F. Yin, Z. Li, S. H. Zhang, C. X. Wu, C. Wang, Z. Wang, *Chinese. Chem. Lett.*, 2011, 22, 330-333
- [181] J. P. Quirino, A. T. Aranas, *J. Chromatogr. A*, 2011, 1218, 7377-7383
- [182] M. Dawod, M. C. Breadmore, R. M. Guijt, P. R. Haddad, *J. Chromatogr. A*, 2010, 1217, 386-393

## Partie I - Etude Bibliographique

---

- [183] H. H. See, P. C. Hauser, W. A. W. Ibrahim, M. M. Sanagi, *Electrophoresis*, 2010, 31, 575-582
- [184] G. Danger, R. Pascal, H. Cottet, *J. Chromatogr. A*, 2009, 1216, 5748-5754
- [185] I-L. Tsai, S-W. Sun, H-W. Liao, S-C. Lin, C-H. Kuo, *J. Chromatogr. A*, 2009, 1216, 8296-8303
- [186] X. Li, J. Hu, H. Han, *J. Sep. Sci.*, 2011, 34, 323-330
- [187] Q. Liu, L. Jia, C. Hu, *Chromatographia*, 2010, 72, 95-100
- [188] K. Michalska, G. Pajchel, S. Tyski, *J. Chromatogr. A*, 1216, 2934-2942
- [189] D. L. Kirschner, M. Jaramillo, T. K. Green, *Anal. Chem.*, 2007, 79, 736-743
- [190] Y. Jin, L. Meng, M. Li, Z. Zhu, *Electrophoresis*, 2010, 31, 3913-3920
- [191] E. A. Bessonova, L. A. Kartsova, A. U. Shmukov, *J. Chromatogr. A*, 2007, 1150, 332-338
- [192] P. Britz-McKibbin, D. D. Y. Chen, *Anal. Chem.*, 2000, 72, 1242-1252
- [193] T. L. Wang, S. Z. Zhao, C. H. Shen, J. Tang, D. Wang, *Food. Chem.*, 2009, 112, 215-220
- [194] K. Michalska, G. Pajchel, S. J. Tyski, *J. Pharma. Biomed. Anal.*, 2008, 48, 321-330
- [195] Y. Chen, L. Zhang, Z. Cai, G. Chen, *Analyst*, 2011, 136, 1852-1858
- [196] H-L. Cheng, S-S. Chiou, Y-M. Liao, C-Y. Lu, Y-L. Chen, S-M. Wu, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, 398, 2183-2190
- [197] P. Britz-McKibbin, K. Otsuka, S. Terabe, *Anal. Chem.*, 2002, 74, 3736-3743
- [198] J. Liu, Z. Liu, M. C. Kang, S. C. Liu, H. Y. Chen, *J. Sep. Sci.*, 2009, 32, 422-429
- [199] J. P. Quirino, A. M. Guidote, *J. Chromatogr. A*, 2011, 1218, 1004-1010
- [200] J. P. Quirino, *J. Chromatogr. A*, 2010, 1217, 7776-7780
- [201] T. Hirokawa, H. Okamoto, B. Gaš, *Electrophoresis*, 2003, 24, 498-504
- [202] H. Okamoto, T. Hirokawa, *J. Chromatogr. A*, 2003, 990, 335-341
- [203] Z. Hao, Q. Q. Yao, M. C. Breadmore, Y. M. Li, Y. Q. Lu, *Analyst*, 2011, 136, 4486-4491
- [204] Z. Q. Xu, K. Kawahito, X. X. Ye, A. R. Timerbaev, T. Hirokawa, *Electrophoresis*, 2011, 32, 1195-1200
- [205] I. Botello, F. Borrull, C. Aguilar, M. Calull, *Electrophoresis*, 2010, 31, 2964-2973
- [206] J-M. Busnel, N. Lion, H. H. Girault, *Electrophoresis*, 2008, 29, 1565-1572
- [207] M. Urbanek, N. Delaunay, R. Michel, A. Varenne, P. Gareil, *Electrophoresis*, 2007, 28, 3767-3776

## Partie I - Etude Bibliographique

---

- [208] M. Dawod, M. C. Breadmore, R. M. Guijt, P. R. Haddad, *J. Chromatogr. A*, 2009, 1216, 3380-3386
- [209] M. M. Meighan, M. Dawod, R. M. Guijt, M. A. Hayes, M. C. Breadmore, *J. Chromatogr. A*, 2011, 1218, 38, 6750-6755
- [210] M. Dawod, M. C. Breadmore, R. M. Guijt, P. R. Haddad, *J. Chromatogr. A*, 2008, 1189, 278-284
- [211] M. C. Breadmore, J. P. Quirino, *Anal. Chem.*, 2008, 80, 6373-6381
- [212] J. P. Quirino, S. Terabe, *Anal. Chem.*, 2000, 72, 1023-1030
- [213] J-B. Kim, K. Otsuka, S. Terabe, *J. Chrom. A*, 2001, 932, 129-137
- [214] X. Luo, X. Jiang, X. Tu, S. Luo, L. Yan, B. Chen, *Electrophoresis*, 2010, 31, 688-694
- [215] X. Li, J. Hu, H. Han, *J. Sep. Sci.*, 2011, 34, 323-330
- [216] C-H. Wang, C-C. Chen, S-J. Wang, S-M. Wu, *J. Chromatogr. A*, 2011, 1218, 6832-6837
- [217] I-L. Tsai, H-Y. Liu, P-H. Kuo, J-Y. Wang, L-J. Shen, C-H. Kuo, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, 401, 2205-2214
- [218] Y. Jin, L. Meng, M. Li, Z. Zhu, *Electrophoresis*, 2010, 31, 3913-3920
- [219] Y. Yang, H. Nie, C. Li, Y. Bai, N. Li, J. Liao, H. Liu, *Talanta*, 2010, 82, 1797-1801
- [220] X. Luo, X. Jiang, X. Tu, S. Luo, L. Yan, B. Chen, *Electrophoresis*, 2010, 31, 688-694
- [221] M-J. Wang, C-H. Tsai, W-Y. Hsu, J-T. Liu, C-H. Lin, *J. Sep. Sci.*, 2009, 32, 441-4445
- [222] Y-J. Jong, Y-H. Ho, W-K. Ko, S-M. Wu, *J. Chromatogr. A*, 2009, 1216, 7570-7575
- [223] H-L. Su, Y-Z. Hsieh, *J. Chromatogr. A*, 2008, 1209, 253-259
- [224] H-L. Su, L-I. Feng, H-P. Jen, Y-Z. Hsieh, *Electrophoresis*, 2008, 29, 4270-4276
- [225] Y-H. Lin, J-F. Chiang, M-R. Lee, R-J. Lee, W-K. Ko, S-M. Wu, *Electrophoresis*, 2008, 29, 2340-2347
- [226] Y-H. Lin, M-R. Lee, R-J. Lee, W-K. Ko, S-M. Wu, *J. Chromatogr. A*, 2007, 1145, 234-240
- [227] Y-H. Lin, J-H. Li, W-K. Ko, S-M. Wu, *J. Chromatogr. A*, 2006, 1130, 281-286
- [228] H-L. Cheng, Y-J. Jong, J-H. Li, W-K. Ko, S-M. Wu, *Electrophoresis*, 2006, 27, 4711-4716
- [229] P. Meng, N. Fang, M. Wang, H. Liu, D. D. Y. Chen, *Electrophoresis*, 2006, 27, 3210-3217
- [230] N. Fang, P. Meng, H. Zhang, Y. Sun, D. D. Y. Chen, *The Analyst*, 2006, 132, 127-134
- [231] H-Y. Chiang, S-J. Sheu, *Electrophoresis*, 2004, 25, 670-676
- [232] M-C. Chen, S-H. Chou, C-H. Lin, *J. Chromatogr. B*, 2004, 801, 347-353

## Partie I - Etude Bibliographique

---

- [233] C. Fang, J-T. Liu, S-H. Chou, C-H. Lin, *Electrophoresis*, 2003, 24, 1031-1037
- [234] C. Fang, J-T. Liu, C-H. Lin, *J. Chromatogr. B*, 2002, 775, 37-47
- [235] O. Nunez, J-B. Kim, E. Moyano, M. T. Galceran, S. Terabe, *J. Chromatogr. A*, 2002, 961, 65-75
- [236] J. P. Quirino, Y. Iwai, K. Otsuka, S. Terabe, *Electrophoresis*, 2000, 21, 2899-2903
- [237] J-B. Kim, K. Otsuka, S. Terabe, *J. Chromatogr. A*, 2001, 932, 129-137
- [238] L. Zhu, C. Tu, H. K. Lee, *Anal. Chem.*, 2002, 74, 5820-5825
- [239] Y-F. Hsu, K-T. Chen, Y-W. Liu, S-H. Hsieh, H-Y. Huang, *Anal. Chim. Acta*, 2010, 673, 206-211
- [240] I. Maijó, F. Borrull, C. Aguilar, M. Calull, *Chromatographia*, 2011, 73, 83-91

***PARTIE II- STABILITE DES CAPILLAIRES  
GREFFES AVEC DU POLYACRYLAMIDE  
LINEAIRE EN MILIEU ACIDE, HYDRO-  
ORGANIQUE, EN PRESENCE DE SURFACTANT  
EN VUE DE LEUR UTILISATION POUR LA  
PRECONCENTRATION ELECTROCINETIQUE IN-  
SITU***



### II. INTRODUCTION

Un des paramètres limitant pour les méthodes de préconcentration est l'existence de différences entre les mobilités électroosmotiques de zones adjacentes, de compositions différentes (pH, force ionique...). Pour pallier ce problème, il est conseillé de travailler dans des conditions sans EOF. Pour cela, il existe plusieurs stratégies, à savoir l'utilisation de grande quantité de solvant organique, se mettre dans des conditions très acides (ce qui n'est pas tout le temps possible à cause de la nature des composés), utiliser des méthodes de greffage dynamique (ce qui peut être une entrave pour les méthodes de préconcentration, car elle demande, dans la majorité des cas, d'ajouter un additif dans le milieu séparatif) ou utiliser des greffages covalents avec des polymères.

Il existe de nombreuses stratégies de greffage covalent tant au niveau du traitement préalable de la surface avant le greffage du polymère que sur la nature de ce dernier. Parmi toutes les possibilités, quand le couplage de la CE avec la spectrométrie de masse n'est pas envisagé, le greffage avec du polyacrylamide linéaire (LPA) présenté par Hjerten [1] est une alternative très avantageuse, car la procédure de greffage est rapide et simple. Toutefois, bien que ce greffage ait été utilisé pour de nombreuses applications, son potentiel pour éliminer l'EOF en milieu acide reste quasiment inconnu, il en est de même pour sa stabilité dans de telles conditions. Ce sont ces deux raisons qui ont motivé cette étude.

Ainsi, des capillaires de silice vierge ont été greffés avec du LPA, en utilisant le protocole de Hjerten légèrement modifié, qui présente l'avantage de pouvoir être mise en place aisément dans un laboratoire. Ces capillaires ont été soumis ensuite à des lavages avec différents milieux pendant 70 heures. La valeur résiduelle de l'EOF a été mesurée au cours du temps en utilisant la méthode développée par Vigh [2]. Les milieux étudiés correspondent à des milieux acides ( $2 < \text{pH} < 4$ ) avec différents additifs rencontrés en CE, à savoir des solvants organiques (acétonitrile, méthanol) et des tensioactifs (dodécylsulfate de sodium, liquide ionique à longue chaîne). Les nombreuses données récoltées au cours du temps ont été analysées en utilisant les outils statistiques. Enfin, le potentiel du LPA dans ces conditions a été comparé au capillaire en silice vierge, mais aussi au greffage par l'hydroxypropylcellulose (HPC).

[1] S. Hjertén, *J. Chromatogr.*, 1985, 347, 191-198

[2] B.A. Williams, G. Vigh, *Anal. Chem.*, 1996, 68, 1174-1180

**Article- Stabilité et efficacité des capillaires greffés par du polyacrylamide linéaire pour la suppression de l'écoulement électroosmotique dans des milieux acides en présence de solvants organiques et de surfactants.**

**Stability and effectiveness of linear polyacrylamide capillary coating to suppress EOF in acidic media in the presence of organic modifiers and surfactants.**

Philippe Anres<sup>1,2,3</sup>, Nathalie Delaunay<sup>1,2,3\*</sup>, Jérôme Vial<sup>2,3,4</sup>, Pierre Gareil<sup>1,2,3</sup>

Chromatographia, 2012, soumis

<sup>1</sup>Chimie ParisTech, Laboratory of Physicochemistry of Electrolytes, Colloids and Analytical Sciences (PECSA), 75005 Paris, France

<sup>2</sup>CNRS, UMR 7195, 75005 Paris, France

<sup>3</sup>UPMC Univ Paris 06, 75005 Paris, France

<sup>4</sup>ESPCI ParisTech, PECSA, 75005 Paris, France

*Key words: capillary coating, CE, electroosmotic flow suppression, ionic liquids, polyacrylamide.*

*Non-standard abbreviations: LPA; linear polyacrylamide; MeOH, methanol; HPC, hydroxypropyl cellulose; APS, ammonium persulfate;  $\gamma$ -MPS, 3-(trimethoxysilyl)propyl methacrylate; UP, ultra pure; C<sub>12</sub>MImBr, dodecylmethylimidazolium bromide.*

### II.1. Abstract

Because of its high hydrophilicity, linear polyacrylamide (LPA) has been used for long as a coating to suppress EOF in CE; however, its stability and effectiveness in acidic media, with or without organic modifiers or surfactants is not well documented. In this work, the adequacy of LPA coating to suppress EOF in those different conditions was studied. It was shown electroosmotic mobilities ( $\mu_{EO}$ ) did not change for at least 70 hours of non-stopped operation in all the tested conditions and the coating was stable. It was also shown LPA coating efficiently suppresses EOF in acidic media (pH 4.0, 3.1, and 2.3) with or without organic modifiers (50 % methanol or acetonitrile, ACN), as measured  $\mu_{EO}$  values were between 18 and 84 times lower than those obtained with bare fused-silica capillaries. In acidic media with anionic or cationic surfactants (50 mM SDS or 25 mM dodecyldimethylimidazolium bromide) or in the presence of SDS and ACN (buffer pH 2.1/ACN (8:2, v/v) + 50 mM SDS) EOF was reduced to a magnitude lower than with bare fused-silica capillaries, even though slight adsorptions of these surfactants were observed. LPA showed its superiority to hydroxypropyl cellulose, for which marked adsorption occurred because of its lower hydrophilicity.

### II.2. Introduction

Method development in CE always requires proper control of EOF conditions, as EOF is a key parameter influencing resolution, speed of analysis, and peak areas. The most often used bare fused-silica capillaries provide cathodic EOFs which are widely cross-correlated to background electrolyte (BGE) pH, ionic strength, ion nature, and solvent composition. According to analytical purposes, there can be a need for EOF to be speeded up, slowed down, reversed or suppressed. A number of strategies have been proposed for all these situations and the subject of several reviews [1,2,3]. Especially, when EOF suppression is intended, covalent or permanent coatings of neutral polymers such as polyvinyl alcohol [4], polyethyleneoxide [5], hydroxypropyl cellulose (HPC) [6] or polyacrylamide [7,8] are the most popular approaches. As compared with the other polymers, polyacrylamide presents the most hydrophilic surface, considerably reducing adsorption of surfactants, peptides, and basic proteins.

Covalent coating with linear polyacrylamide (LPA) was introduced for the first time by Hjertén in 1985 [9]. Typically, the capillary wall is first derivatized with a bifunctional reagent, such as 3-(trimethoxysilyl)propyl methacrylate ( $\gamma$ -MPS), leaving an acrylic group exposed on the wall surface. The capillary is then filled with a polymerising solution containing acrylamide and a polymerisation initiator. The free acrylic groups attached to the capillary wall serve as anchors for growing LPA chains.

Since then, improvements of this coating were presented. New capillary surface derivatisation was proposed with the use of Grignard's reagents as anchors; in this way, during the polymerisation, acrylamide monomers bond to Si-C rather than Si-O sublayers (with  $\gamma$ -MPS) and it was proven the stability of the coating was increased [10,11]. Especially, bleeding because of the aging of the coating is considerably reduced, a very important aspect when CE is hyphenated with mass spectrometry. However, procedures of capillary treatment surface with Grignard's reagents are long and rather tedious to set up because special devices must be used. Another modification was proposed with the addition of cross-linking reagents during the polymerisation step [7,12,13]. The cross-linkers allow the linear polyacrylamide chains to be chemically linked between them. Even though the coating was proved to be more stable, the procedure is more difficult to set up as another constituent need to be optimised and usually special devices are needed, whereas a commercial CE instrument can be used for uncrosslinked LPA capillary coating.

## Partie II - Stabilité des capillaires greffés avec du polyacrylamide

---

Also, notwithstanding the fact that crosslinked LPA coated capillaries can be commercially provided, and when hyphenation with mass spectrometry is not intended, home-made uncrosslinked LPA coating has remained a very viable alternative, because of its simplicity and rapidity of implementation. Consequently, it was extensively used with various BGEs, most often with pH between 4-10 [14,15,16]. This restricted pH range is due to the fact that it is well known polyacrylamide can be hydrolysed with time in basic conditions. Indeed, the stability of LPA coating was studied in highly basic conditions and it was shown hydrolysis occurred [17,18]. Even if periodic hydrochloric acid rinsing has been used [16,19], in our knowledge, there are almost no studies on the stability of this coating in acidic medium (pH 2 to 4), maybe because LPA coating was less often used in highly acidic pH to suppress EOF. In this work, the ability of LPA coating to suppress EOF was extensively studied in acidic media (pH 2-4) in the presence of surfactants (SDS or dodecylmethylimidazolium bromide ( $C_{12}MImBr$ )) and organic modifiers (ACN or methanol).  $C_{12}MImBr$  was selected and preferred for this study over more classical quaternary ammonium type surfactants because it can induce charge transfer interactions in addition to purely hydrophobic ones, and because of our special interest in this class of surfactants for preconcentration studies [20]. EOF suppression by LPA coating was confronted with HPC-coated capillaries, but also with bare fused-silica capillaries with respect to residual EOF in highly acidic media, in order to reinforce the utility of such a coating even in this case.

### II.3. Materials and methods

#### II.3.1. Chemicals and solutions

Phosphoric acid ( $H_3PO_4$ ), ACN, and methanol (MeOH) were of HPLC grade. 1 M sodium hydroxide (NaOH) and 0.1 M hydrochloride (HCl) solutions were purchased from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Tetramethylethylenediamine (TEMED, > 99 %) was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Monobasic and dibasic sodium phosphate (> 99 %), SDS (> 99 %), acrylamide (> 99 %), acetic acid (> 99 %),  $\gamma$ -MPS (> 99 %), ammonium persulfate (APS, > 98 %), formamide (> 99 %), HPC (molecular mass, 100 000, > 99 %), HPLC grade dichloromethane ( $CH_2Cl_2$ ), and HPLC grade acetone were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France).  $C_{12}MImBr$  (> 99 %) was synthesized according to procedures

## Partie II - Stabilité des capillaires greffés avec du polyacrylamide

---

previously reported [21,22]. Ultra-pure (UP) water was delivered by a Direct-Q3 UV system (Millipore, Molsheim, France).

The compositions of used electrolytes were: 19 mM sodium phosphate buffer, pH 2.3 (10 mM ionic strength); 12 mM sodium phosphate buffer, pH 3.1 (10 mM ionic strength); 10 mM sodium phosphate buffer, pH 4.0 (10 mM ionic strength); 5 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0 (10 mM ionic strength). Stock solution of 250 mM SDS was prepared by dissolving the appropriate amount in UP water. BGEs were obtained by adding the appropriate amount of ACN and SDS (from the stock solution) to the sodium phosphate buffers. 0.2 % formamide (v/v) in BGE was used as neutral marker. All solutions were daily prepared, stored at 4°C in a refrigerator, and filtered through 0.20 µm membranes before use. All pH values given are those measured in the aqueous part.

### *II.3.2. Apparatus and software*

All CE experiments were carried out with an Agilent Technologies HP 3D CE system (Massy, France) equipped with a DAD (deuterium lamp) set at 200 and 214 nm (bandwidth of 20 nm, reference wavelength at 340 nm with a bandwidth of 40 nm). Studies of coating stability were performed in 50 cm (effective length: 41.5 cm) x 50 µm id bare fused-silica capillary tubes (Photonlines, Marly-le-Roi, France) coated with LPA. A personal computer using HP 3D ChemStation controlled the HP 3D CE instrument and allowed data analysis. The statistical data analyses were performed using Excel 2003 (Microsoft Corporation, Courtaboeuf, France).

### *II.3.3. Experimental procedures*

#### *II.3.3.1. Coating procedures*

LPA coated capillaries were prepared according to slightly modified Hjerten's procedure, as follows: a new bare fused-silica capillary was flushed with acetone under 1 bar for 10 min using the CE instrument, next with 1 M NaOH for 30 min, followed by 0.1 M HCl and UP water for 10 min each. Then, the capillary was silanised at 25°C by filling it using the pumping facility of the CE instrument (1 bar for 4 min) with a mixture of 0.6 % (v/v)  $\gamma$ -MPS and 0.5 % (v/v) acetic acid in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. After 50 min, the capillary was flushed under 1 bar

## Partie II - Stabilité des capillaires greffés avec du polyacrylamide

---

with MeOH and UP water for 10 min each, next filled (1 bar for 4 min) with acrylamide monomer (15 mg/mL) solution (sonicated for 30 min) including TEMED (0.1 % v/v) and APS (1 mg/mL), and kept at 25°C for 1 h. After this step, the capillary was flushed under with UP water for 10 min and finally dried under a hot nitrogen flow (100°C) for 1 h. HPC-coated capillaries were prepared according to Shen's procedure [6]. The coating quality was checked by measuring the electroosmotic mobility ( $\mu_{EO}$ ) according to Vigh's procedure [23] with a 5 mM sodium phosphate buffer at pH 7.0. Capillaries having  $\mu_{EO}$  values superior to  $2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  just after synthesis were discarded.

### *II.3.3.2. Assessment of EOF suppression*

For each tested BGE condition, new capillaries coated with LPA were submitted to a 70 hour assay with the following protocol: capillaries were flushed under 50 mbar for 1 hour with the specified BGE, then EOF was measured three times using Vigh's procedure [23]. This cycle was repeated 45 times, so that the coated capillary was submitted to both applied pressure and voltage. It represents a total number of 132  $\mu_{EO}$  measurements. EOF mobility was also measured after the 70 hour treatment in the presence of 5 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0 after a flush for 1 h under 50 mbar (13 capillary volumes). Each BGE condition was applied on two different newly coated capillaries. For each tested BGE conditions, EOF mobility was also measured three times successively with HPC-coated and bare fused-silica capillaries.

### *II.3.4. Data analysis*

The obtained results were analysed in the following order as follows:

- (i) Rejection of incongruous points. According to the distribution of the measured  $\mu_{EO}$  values, incongruous measurements were arbitrarily chosen, then confirmed or rejected by a Student test (risk 5 %).
- (ii) Linear regression and significance of the slope. For each tested BGE condition,  $\mu_{EO}$  was plotted as a function of time, then a least-squares linear regression was implemented and the significance of the slope to zero was tested by a Student test (risk 5 %).
- (iii) Reproducibility of the coating. Two successive steps were involved. Firstly, the residual variances of the regressions were compared thanks to a bilateral F-test (risk 5%). Secondly, in

## Partie II - Stabilité des capillaires greffés avec du polyacrylamide

---

case the residual variances were homogeneous, the slopes of the regression lines were compared thanks to a bilateral t-test using the pooled standard deviation of the slopes as denominator (risk 5 %).

### II.4. Results and discussion

#### *II.4.1. Stability of the LPA coating under acidic conditions*

The stability of the LPA coating under various acidic conditions was assessed through the evolution of  $\mu_{EO}$  under these different conditions over a time period of 70 hours' operation. For each of these conditions, two different capillaries were coated with LPA at different days, following the procedure described in section 2.3.1. It was first verified applying statistical tests (see section 2.4), for all the tested acidic conditions, the two capillaries did not give significantly different results (see Table II-1 for statistical results). Therefore the coating can be considered reproducible and both results are similar; hence, for each tested conditions, it was chosen, for clarity, to present only one set of points. Figures II-1-5 show the variation of  $\mu_{EO}$  with time in aqueous sodium phosphate buffers at different acidic pH (pH 2.3-4.0), in the absence or in the presence of 50 mM SDS or 25 mM C<sub>12</sub>MimBr, in hydro-organic (ACN or MeOH) phosphate buffer pH 4.0 mixtures, and in an hydro-organic (ACN) phosphate buffer pH 2.3 mixture containing 50 mM SDS. For all the tested conditions, the slopes of the least-squares regression lines were not different from zero (see Table II-1 for statistical results), which meant it could be considered  $\mu_{EO}$  did not change with time. Moreover, the  $\mu_{EO}$  value measured at pH 7.0 at the end of the whole stability test protocol (see section 2.3.2) did not exceed  $3.0 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , whatever the tested conditions. Hence, LPA coating was stable in the different tested conditions and an average value of  $\mu_{EO}$  could be calculated for each of them.

## Partie II - Stabilité des capillaires greffés avec du polyacrylamide

BGE conditions	Capillary	Test on the slope (significance to zero)			Variance comparison		Mean value comparison		
		$t_{obs}$	$t_{theo}$	Stability of $\mu_{EO}$	$F_{obs}$	$F_{theo}$	$t_{obs}$	$t_{theo}$	Coating reproducibility
Buffer pH 4.0	# 1	-0.485	1.980	YES	1.149	1.432	1.443	1.970	YES
	# 2	1.852	1.979	YES					
Buffer pH 3.1	# 1	1.143	1.982	YES	1.007	1.469	1.495	2.258	YES
	# 2	-0.021	1.983	YES					
Buffer pH 2.3	# 1	-1.443	1.980	YES	1.081	1.427	1.800	2.255	YES
	# 2	-1.290	1.979	YES					
Buffer pH 4.0 + 50 mM SDS	# 1	-1.642	1.978	YES	1.188	1.413	1.932	1.969	YES
	# 2	0.100	1.979	YES					
Buffer pH 3.1 + 50 mM SDS	# 1	1.267	1.978	YES	1.035	1.411	1.184	2.255	YES
	# 2	-1.184	1.978	YES					
Buffer pH 2.3 + 50 mM SDS	# 1	1.251	1.979	YES	1.383	1.446	-1.947	2.257	YES
	# 2	0.766	1.983	YES					
Buffer pH 4.0 + 25 mM C <sub>12</sub> MimBr	# 1	1.845	1.978	YES	1.152	1.411	1.820	1.969	YES
	# 2	-0.752	1.978	YES					
Buffer pH 3.1 + 25 mM C <sub>12</sub> MimBr	# 1	-1.776	1.983	YES	0.895	1.411	-2.246	2.255	YES
	# 2	0.742	1.979	YES					
Buffer pH 2.3 + 25 mM C <sub>12</sub> MimBr	# 1	1.810	1.979	YES	1.382	1.440	-1.915	2.256	YES
	# 2	1.534	1.978	YES					
Buffer pH 4.0/ACN (1:1, v/v)	# 1	-1.569	1.980	YES	1.119	1.436	0.259	1.970	YES
	# 2	-1.768	1.980	YES					
Buffer pH 4.0/MeOH (1:1, v/v)	# 1	0.193	1.984	YES	1.412	1.465	-0.178	1.971	YES
	# 2	0.103	1.980	YES					
Buffer pH 2.3/ACN (8:2, v/v) + 50 mM SDS	# 1	0.943	1.979	YES	1.209	1.417	1.303	1.969	YES
	# 2	1.666	1.978	YES					

Table II-1: Statistical analyses (Student and Fisher tests) of the electroosmotic mobilities obtained in two LPA-coated capillaries (# 1 and # 2) in the different tested conditions. Buffers: sodium phosphate, 10 mM ionic strength. Tests were conducted on the mean values calculated from the whole stability cycle.  $t_{obs}$ ,  $t_{theo}$ ,  $F_{obs}$  and  $F_{theo}$  are for observed and theoretical Student and Fisher values, respectively.

### II.4.2. LPA coating effectiveness under acidic conditions

The aim of this work was to investigate the potential of LPA coating for EOF suppression in acidic and highly acidic media. For each BGE conditions tested,  $\mu_{EO}$  values obtained with LPA-coated capillaries were compared with those obtained under the same conditions with bare fused-silica and HPC-coated capillaries.

First of all, the effectiveness of LPA coating to suppress EOF in acidic media was evaluated in plain 10 mM ionic strength sodium phosphate buffers, pH 4.0, 3.1 and 2.3 (Figure II-1). As shown in Table II-2,  $\mu_{EO}$  values for LPA and HPC coatings do not appear to be significantly different. With respect to bare fused-silica, it is worthy of note that both coatings were highly efficient to reduce EOF, even under highly acidic conditions: indeed at pH 2.3,  $\mu_{EO}$  value with bare fused-silica was about  $3.7 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , whereas for LPA and HPC coatings it was ca.  $0.2$  and  $0.3 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , respectively. Moreover, for HPC and LPA,  $\mu_{EO}$  values were not significantly different at pH 2.3 and 3.1, while the value obtained at pH 4.0 was slightly higher. This behaviour could be attributed to the presence of residual silanol groups at the surface of the capillary.

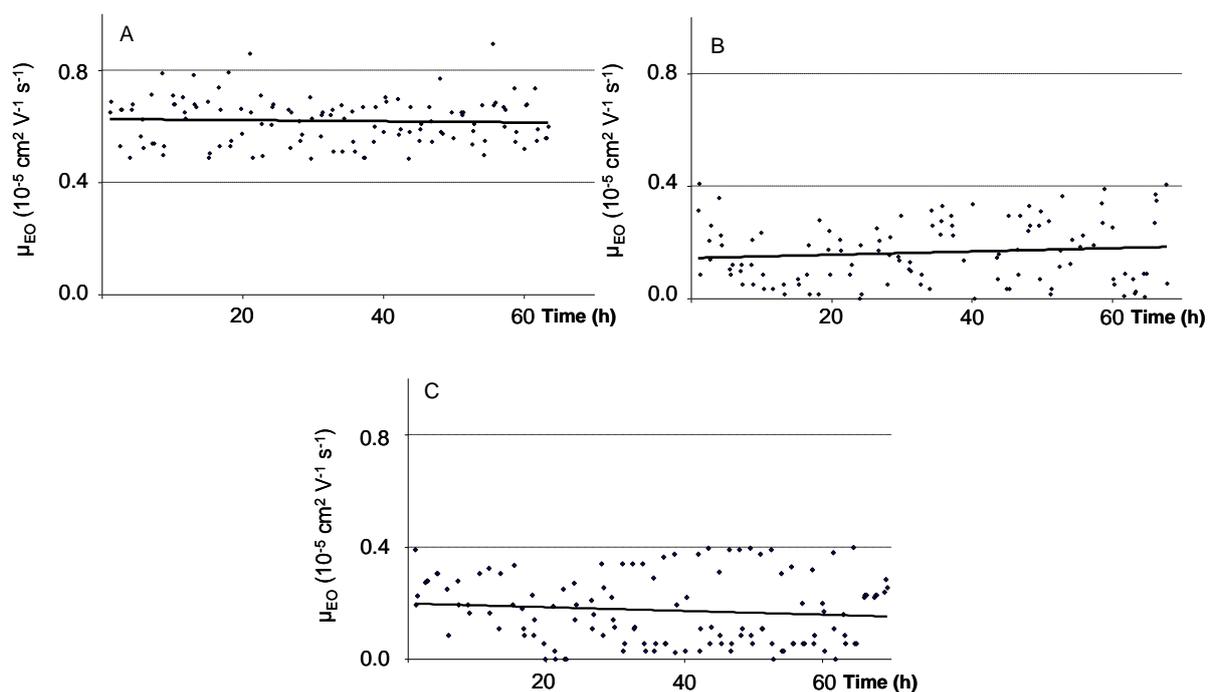


Figure II-1: Variation of electroosmotic mobility with time in LPA-coated capillary for plain aqueous 10 mM ionic strength sodium phosphate buffers of different pH: (A) pH 4.0, (B) pH 3.1, and (C) pH 2.3. The black continuous line corresponds to the linear regression.

Because of the common use of surfactants in CE, the effectiveness of LPA coating to suppress EOF in their presence was next investigated. In the presence of 50 mM SDS (Figure II-2, Table II-2), a slightly pH-independent higher value was observed for  $\mu_{EO}$  with LPA coating (around  $3.4 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), as compared with those obtained previously without SDS, indicating this surfactant slightly adsorbed onto the LPA coating. Nevertheless, LPA still appeared highly efficient to suppress EOF, as compared to bare fused-silica at pH 4.0 and pH 3.1, while similar  $\mu_{EO}$  values were obtained at pH 2.3. On the contrary, an important and pH-independent SDS adsorption was noticed with HPC coating, consistently with its lower hydrophilicity, leading to  $\mu_{EO}$  value of ca  $26 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

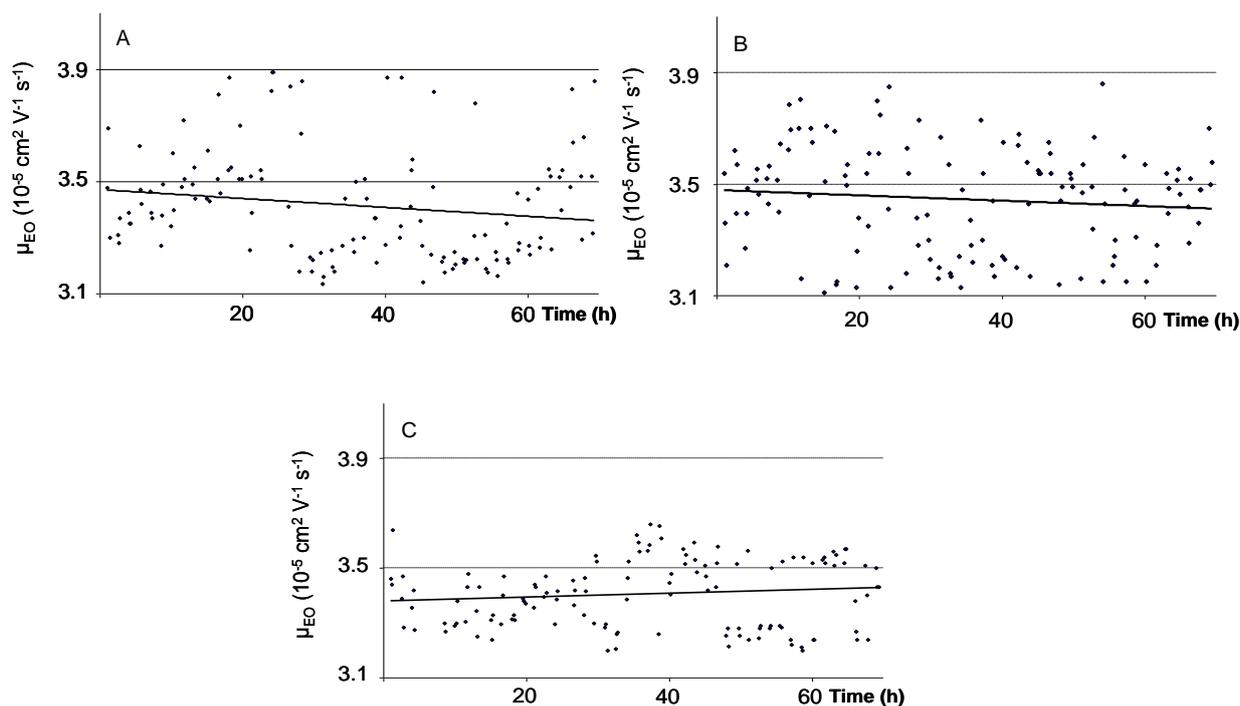


Figure II-2: Variation of electroosmotic mobility with time in LPA-coated capillary for aqueous 10 mM ionic strength sodium phosphate buffers of different pH supplemented with 50 mM SDS: (A) pH 4.0, (B) pH 3.1, and (C) pH 2.3. The black continuous line corresponds to the linear regression.

In the presence of 25 mM of an ionic liquid with long cationic chain,  $C_{12}MimBr$  (Figure II-3, Table II-2), a slight and pH-independent negative value was obtained for  $\mu_{EO}$  (ca  $-0.20 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), corresponding to a very slight anodic (reversed) EOF, which should result from slight adsorption of  $C_{12}MimBr$  to the LPA coating. A quite different behavior was observed with bare fused-silica and HPC-coated capillaries under the same conditions, with typical pH-independent  $\mu_{EO}$  values of about  $-25.0 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  and  $-17.5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , respectively. This indicates  $C_{12}MimBr$  strongly adsorbs onto bare fused-silica and HPC-coated capillaries and again highlights the versatility of highly hydrophilic LPA coating as EOF suppressor.

## Partie II - Stabilité des capillaires greffés avec du polyacrylamide

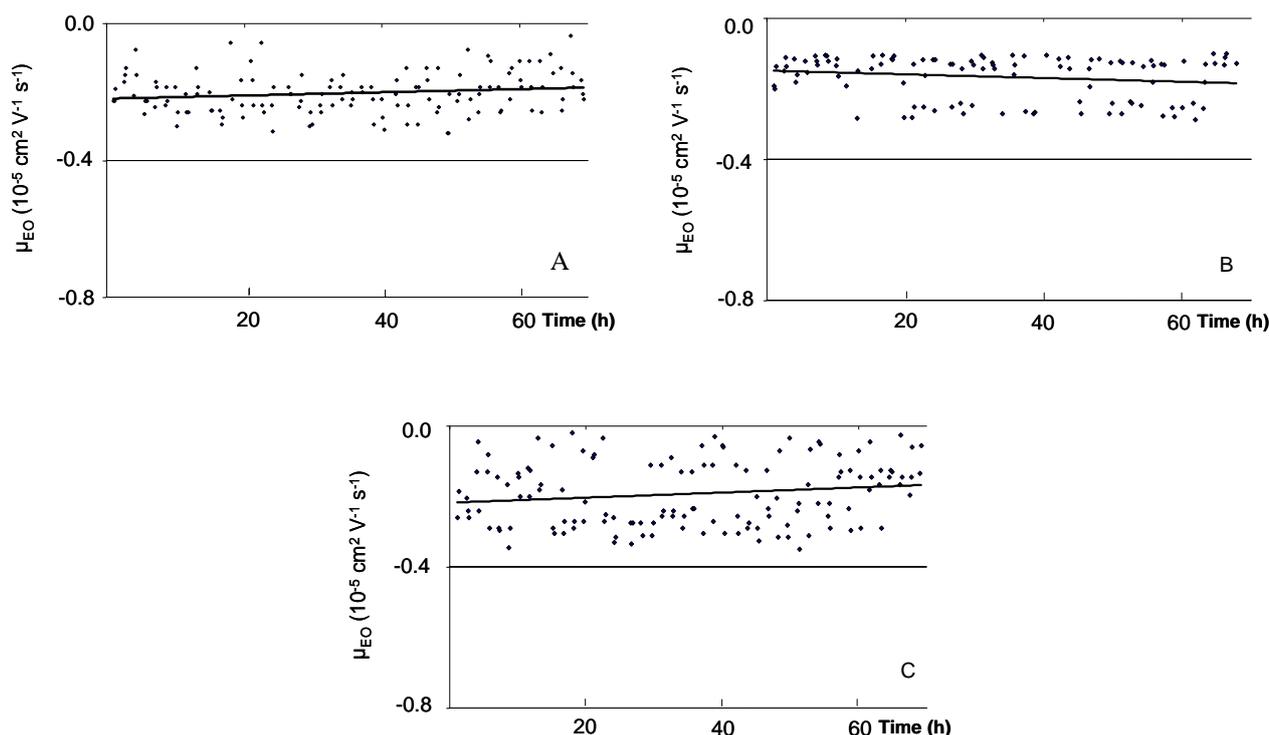


Figure II-3: Variation of electroosmotic mobility with time in LPA-coated capillary for aqueous 10 mM ionic strength sodium phosphate buffers of different pH supplemented with 25 mM  $C_{12}$ MimBr: (A) pH 4.0, (B) pH 3.1, and (C) pH 2.3. The black continuous line corresponds to the linear regression.

Organic modifiers such as ACN and MeOH are frequently used in CE for instance to improve analyte solubility, prevent from wall adsorption, and/or modulate selectivity. This is why the effectiveness of LPA coating was also evaluated in the presence of 50 % (v/v) of these solvents in acidic media at pH 4 (Figure II-4). As also shown in Table II-2, LPA and HPC coatings were proven to be very efficient to suppress EOF, with no significant differences between the two solvents and typical  $\mu_{EO}$  values of ca  $0.4 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Contrarily, very noticeable EOFs were observed with bare fused-silica capillaries, corresponding to  $\mu_{EO}$  values of ca  $13.4 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  and  $25.1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  with MeOH and ACN, respectively.

## Partie II - Stabilité des capillaires greffés avec du polyacrylamide

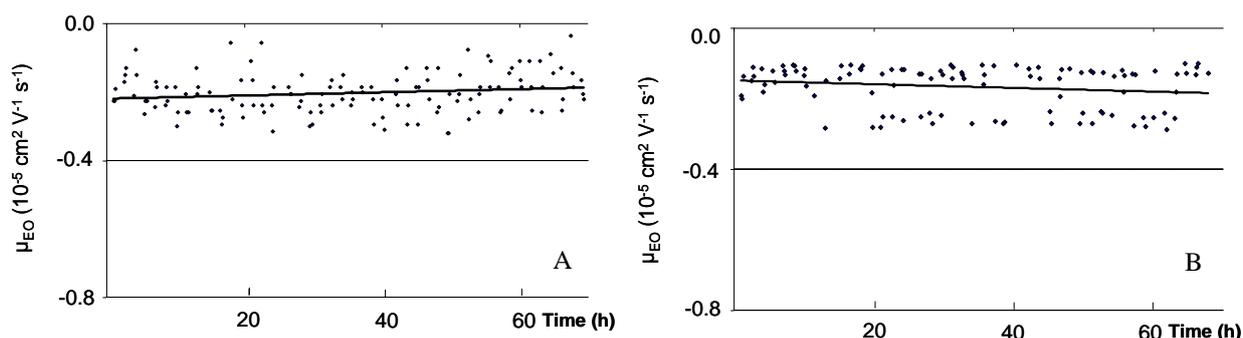


Figure II-4: Variation of electroosmotic mobility with time in LPA-coated capillary for hydro-organic mixtures of 10 mM ionic strength sodium phosphate buffers pH 4.0/ (A) MeOH (1:1, v/v) and (B) ACN (1:1, v/v).

BGE conditions	Bare fused-silica	HPC coating	LPA coating
	$\mu_{EO} (x \pm \sigma)$	$\mu_{EO} (x \pm \sigma)$	$\mu_{EO} (x \pm \sigma)$
Buffer pH 4.0	$30.8 \pm 0.7$	$0.9 \pm 0.5$	$0.6 \pm 0.1$
Buffer pH 3.1	$8.7 \pm 0.3$	$0.5 \pm 0.4$	$0.2 \pm 0.1$
Buffer pH 2.3	$3.7 \pm 0.6$	$0.3 \pm 0.3$	$0.2 \pm 0.1$
Buffer pH 4.0 + 50 mM SDS	$29.4 \pm 0.6$	$27.3 \pm 0.2$	$3.4 \pm 0.2$
Buffer pH 3.1+ 50 mM SDS	$7.9 \pm 0.3$	$26.6 \pm 0.5$	$3.3 \pm 0.2$
Buffer pH 2.3 + 50 mM SDS	$3.6 \pm 0.1$	$25.3 \pm 0.2$	$3.4 \pm 0.1$
Buffer pH 4.0 + 25 mM C <sub>12</sub> MimBr	$-25.70 \pm 0.9$	$-17.4 \pm 0.4$	$-0.2 \pm 0.1$
Buffer pH 3.1 + 25 mM C <sub>12</sub> MimBr	$-25.7 \pm 0.8$	$-17.5 \pm 0.8$	$-0.1 \pm 0.1$
Buffer pH 2.3 + 25 mM C <sub>12</sub> MimBr	$-25.0 \pm 0.7$	$-17.9 \pm 0.6$	$-0.2 \pm 0.1$
Buffer pH 4.0/ACN (1:1, v/v)	$25.1 \pm 0.8$	$0.4 \pm 0.1$	$0.3 \pm 0.2$
Buffer pH 4.0/MeOH (1:1, v/v)	$13.4 \pm 0.2$	$0.4 \pm 0.2$	$0.5 \pm 0.2$
Buffer pH 2.3/ACN (8:2, v/v) + 50 mM SDS	$3.3 \pm 0.5$	$19.5 \pm 0.6$	$1.5 \pm 0.3$

x= mean values  
 $\sigma$ = standard deviation

Table II-2: Mean electroosmotic mobilities obtained in bare fused-silica, HPC- and LPA- coated capillaries in the different tested conditions. Buffers: sodium phosphate, 10 mM ionic strength. Mobilities are given in  $10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  as mean value  $\pm$  one standard deviation. EOF mobilities reported for bare fused-silica and HPC-coated capillaries were determined from three consecutive measurements. EOF mobilities reported for LPA capillaries are the mean values calculated from the whole stability test.

## Partie II - Stabilité des capillaires greffés avec du polyacrylamide

As surfactant and organic modifier are quite often used together in micellar electrokinetic chromatography to modulate retention and selectivity, the ability of LPA coating to act as an EOF suppressor was finally tested under highly acidic conditions (pH 2.3) in the presence of 50 mM SDS and 20 % (v/v) ACN (Figure II-5). A typical  $\mu_{\text{EO}}$  value of  $1.5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  was observed with LPA-coated capillary under these conditions (Table II-2). This coating was again efficient to further reduce  $\mu_{\text{EO}}$ , as lower residual  $\mu_{\text{EO}}$  than in bare fused-silica capillaries were obtained ( $3.3 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). As expected, SDS still adsorbed to HPC coating, although to a lesser extent in the presence of ACN, which points to the hydrophobic character of the interaction.

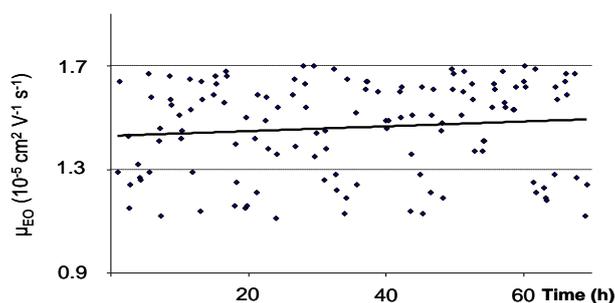


Figure II-5: Variation of electroosmotic mobility with time in LPA-coated capillary for the hydrodynamic mixture of 10 mM ionic strength sodium phosphate buffer, pH 2.3 /ACN (8:2, v/v) + 50 mM SDS. The black continuous line corresponds to the linear regression.

### II.5. Concluding remarks

LPA coated capillaries were shown to be very effective to suppress EOF in acidic (pH 2.3-4.0) electrolytes alone or supplemented with anionic or cationic surfactant and organic modifiers. Especially, this study highlights LPA-coated capillaries provide lower residual EOF than bare fused-silica, even in very acidic pH (pH 2.3). Because of its very high hydrophilicity, LPA coating also proved its superiority over HPC coating, which fails to prevent surfactant adsorption to capillary wall. Moreover, thanks to the presented statistical approach, the stability of the LPA-coated capillaries, with the easy and simple procedure of coating used which only takes about a 3-hours' preparation, was proven for a 70 h period of uninterrupted use. Still, this coating was found stable for at least one-week's experiments in such conditions, as we recently used LPA-coated capillaries for preconcentration experiments in a previous study [24], even if we did not push forward the statistical analyses presented in this paper.

## Partie II - Stabilité des capillaires greffés avec du polyacrylamide

---

### **Acknowledgments**

Authors are thankful to L. Gaillon, J. Siriex-Plénet, and C. Rizzi for providing the ionic liquids. They also thank H. Cottet for fruitful discussions.

### II.6. References

1. Kostal V, Katzenmeyer J, Arriaga EA (2008) *Anal Chem* 80: 4533-4550
2. Lucy CA, MacDonald AM, Gulcev MD (2008) *J Chromatogr A* 1184: 81-105
3. Frost NW, Jing M, Bowser MT (2010) *Anal Chem* 82: 4682-4698
4. Lyubarskaya YV, Dunayevskiy YM, Vouros P, Karger BL (1997) *Anal Chem* 69: 3008-3014
5. Zhao Z, Malik A, Lee ML (1992) *J Microcol Sep* 4: 411-417
6. Shen Y, Smith RD (2000) *J Microcol Sep* 12: 135-141
7. Gao L, Liu S (2004) *Anal Chem* 76: 7179-7186
8. Lu JJ, Liu S (2006) *Electrophoresis* 27: 3764-3771
9. Hjertén S (1985) *J Chromatogr* 347: 191-198
10. Gelfi C, Curcio M, Righetti PG, Sebastiano R, Citterio A, Ahmadzadeh H, Dovichi NJ (1998) *Electrophoresis* 19: 1677-1682
11. Cobb KA, Dolnik V, Novotny M (1990) *Anal Chem* 62: 2478
12. Liu S, Gao L, Pu Q, Lu JJ, Wang X, (2006) *J Proteom Res* 5: 323-329
13. Lu JJ, Liu SR, Pu QS (2005) *J Proteome Res* 4: 1012-1016
14. Tůma P, Samcová E, Stulík K (2011) *Anal Chim Acta* 685: 84-90
15. Meert CD., Brady LJ, Guo A, Balland A (2010) *Anal Chem* 82: 3510-3518
16. Suratman A, Wätzig H (2007) *Electrophoresis* 28: 2324-2328
17. Kurenkov VF, Hartan HG, Lobanov FI (2001) *Russ J Appl Chem* 74: 543-554
18. Engelhardt H, Cunatwalter MA (1995) *J Chromatogr A* 716: 27-33
19. Mohabbati PG, Hjertén S, Westerlund D (2004) *J Chromatogr A* 1053: 201-216
20. Quirino JP, Anres P, Delaunay N, Gareil P (2011) *J Chromatogr A* 1218: 5718-5724
21. Gaillon L, Sirieix-Plénet J, Letellier P (2004) *J Solution Chem* 33: 1333-1347
22. Suarez PAZ, Dullius JEL, Einloft E, De Souza RF, Dupont J (1996) *Polyhedron* 15: 1217-1219
23. Williams BA, Vigh G (1996) *Anal Chem* 68: 1174-1180
24. Anres P, Delaunay N, Vial J, Gareil P (2012) *Electrophoresis* 33:1169-1181

### II. CONCLUSION

Cette étude a permis d'évaluer le potentiel du greffage de capillaires de silice avec du polyacrylamide linéaire dans des milieux acides en présence ou non de solvants organiques et/ou de tensioactifs. Les capillaires greffés par du LPA ont montré leur supériorité par rapport aux capillaires de silice vierge, puisqu'il a été montré qu'en milieu acide ( $2,3 < \text{pH} < 4,0$ ), l'EOF est toujours plus faible qu'avec des capillaires en silice vierge. L'ajout de tensioactif cationique (un liquide ionique à longue chaîne, le bromure de dodécylméthylimidazolium) entraîne, à cause des phénomènes d'adsorption sur les parois du capillaire, des EOF élevés indépendants du pH avec les capillaires de silice vierge, alors qu'avec le greffage LPA les EOF mesurés sont très faibles (légère adsorption cependant puisque les mobilités électrophorétiques sont négatives) et indépendants du pH. Enfin, en présence simultanée d'ACN (20 %) et de SDS (50 mM), pour un tampon de pH 2,3, le greffage LPA conduit à un EOF plus faible qu'avec un capillaire en silice vierge. Le greffage LPA a aussi été comparé avec un greffage HPC. En absence de tensioactif (SDS ou bromure de dodécylméthylimidazolium) les EOF observés sont identiques ; cependant, lorsque ces derniers sont présents dans les milieux considérés, les EOF sont plus élevés à cause d'une forte adsorption de ces tensioactifs sur le HPC. Ceci résulte de l'hydrophobie plus élevée du HPC par rapport au LPA.

Enfin, grâce à une analyse statistique, la stabilité du greffage LPA a été prouvée sur une période d'au moins 70 heures d'usage continu. Bien que cette étude statistique n'ait pas été poussée plus loin, nous avons montré que ce greffage était stable sur au moins une semaine d'expérience, puisque ces capillaires ont été utilisés dans des conditions acides (pH 2,3) en présence de SDS (50-90 mM) et de solvant organique (20 %) pour les expériences présentées dans la suite de ces travaux de thèse.

***PARTIE III- PRECONCENTRATION  
ELECTROCINETIQUE IN-SITU PAR COUPLAGE  
DE L'AMPLIFICATION DE CHAMP  
ELECTRIQUE AVEC UNE INJECTION  
ELECTROCINETIQUE ET LE SWEEPING :  
ETUDE DU MECANISME ET APPLICATION***

### III. INTRODUCTION

Comme les méthodes de préconcentration en CE sont basées sur des mécanismes différents, il est possible de les coupler entre elles afin d'améliorer les gains en sensibilité (SEF) et donc d'abaisser les limites de détection. L'amplification du champ électrique avec une longue injection électrocinétique (FESI) couplée avec le *sweeping* est un des couplages les plus intéressants, puisque les gains en sensibilité sont très élevés. Quirino et Terabe l'ont introduit en 2000 et ont rapporté des SEF atteignant presque 900 000 avec des eaux ultra-pures dopées. Bien que cette méthode ait été utilisée pour différents composés dans différentes matrices, il n'y a aucune étude détaillée des mécanismes mis en jeu. En conséquence, l'influence des facteurs expérimentaux n'est à ce jour toujours pas clair et donc l'exploitation de son potentiel n'est sûrement pas optimale.

Ce chapitre propose donc une étude détaillée du mécanisme de cette méthode lorsqu'elle est appliquée à l'analyse de cations en milieu acide en vue d'une meilleure compréhension des phénomènes mis en jeu, d'une simplification du mode opératoire et de l'amélioration des gains en sensibilité. Pour cela, deux plans d'expérience (fractionnaire factoriel) ont été utilisés, ainsi que de la simulation grâce à un logiciel gratuit et très utilisé (SIMUL 5). Des alcaloïdes et une amine secondaire (un bêta-bloquant) ont servi de composés modèles cationiques.

Finalement, une fois que le mécanisme a été explicité, le travail a été validé en développant une application de cette méthode pour l'analyse d'herbicides, des amines quaternaires (Paraquat, Diquat et Difenzoquat), dans des eaux du robinet afin de déterminer leur présence à l'état de trace.

# CHAPITRE I-Article-Elucidation de l'impact des paramètres influençant le couplage de la préconcentration électrocinétique *in-situ* par amplification de champ électrique avec une injection électrocinétique et le sweeping

**A chemometric approach for the elucidation of the parameter impact in the hyphenation of field-enhanced sample injection and sweeping in capillary electrophoresis.**

Philippe Anres<sup>1,2,3</sup>, Nathalie Delaunay<sup>1,2,3</sup>, Jérôme Vial<sup>2,3,4</sup>, Pierre Gareil<sup>1,2,3</sup>

Electrophoresis, 2012, 33, 1169-1181

<sup>1</sup>Chimie ParisTech, Laboratory of Physicochemistry of Electrolytes, Colloids and Analytical Sciences (PECSA), Paris, France

<sup>2</sup>UPMC Univ Paris, Paris, France

<sup>3</sup>CNRS, UMR 7195, Paris, France

<sup>4</sup>ESPCI ParisTech, PECSA, Paris, France

*Keywords: CE / Cation Selective Exhaustive Injection / Experimental design / Field-enhanced sample injection-sweeping-MEKC / Online preconcentration*

*Non standard abbreviations: CSEI-Sweep-MEKC, cation selective exhaustive injection-sweeping-micellar electrokinetic chromatography; FESI, field-enhanced sample injection; HCB, high conductivity buffer; LPA, linear polyacrylamide;  $\gamma$ -MPS, 3-(trimethoxysilyl)propyl methacrylate; SEF, sensitivity enhancement factor; UP, ultra pure.*

### III.I.1. Abstract

The aim of this work was to elucidate the impacts of parameters influencing cation selective exhaustive injection coupled to sweeping and micellar electrokinetic chromatography (MEKC). A chemometric approach using cationic compounds, acidic conditions (phosphate buffer, pH 2.3) and polyacrylamide-coated capillaries to suppress electroosmotic flow were used. It was demonstrated that the water plug was not useful because of long electrokinetic injections. If conductivity of the high conductivity buffer (HCB) and the HCB to sample conductivity ratio are sufficiently high ( $>1.66$  S/m and  $>30$ , respectively), variations of HCB conductivity do not impact sensitivity. The length of the HCB must be long enough so that the most mobile cation remains stacked in this zone for a given injection time. SDS concentration should be as high as possible (the maximum concentration is dictated by MEKC, here 90 mM), so sensitivity is not impacted. We have shown analytes can be lost after electrokinetic injection, when the polarity of the voltage is reversed. Introducing a plug of micellar electrolyte before polarity reversal avoids these losses. Following these recommendations only injection time and sample conductivity impacted sensitivity enhancement. Sample conductivity had to be the lowest as possible and controlled in real case analyses to obtain repeatable enrichment factors.

### III.I.2. Introduction

Capillary electrophoresis (CE) has become a very powerful separation technique over the last decades, because of its unique assets of high efficiency, versatility for the analysis of a wide range of compounds and matrices and low consumption of solvent and analyte. However, due to the short optical path length for commonly used spectrophotometric detections, the concentration sensitivity of CE is often insufficient for trace analyses. In order to increase the concentration sensitivity, several strategies are available: increasing detection path length by modifying capillary shape [1,2] or using more sensitive detectors such as laser-induced fluorescence (LIF) [3] and mass spectrometry (MS) [4]. Gains with the first strategy are relatively limited and use of high sensitivity detectors increases analysis cost.

That is why development of online preconcentration techniques, which do not require any instrumental modification, is gaining more and more interest. Since the 1980s, and after sample stacking was envisioned by Mikkers et al. [5], and extensively studied by Burgi and Chien [6,7], many techniques have been introduced and were the subject matter of several reviews [8–11] and papers of our team [12–15]. Three techniques can be distinguished based on distinct physicochemical principles such as field amplified sample stacking, isotachopheresis (ITP) and sweeping, plus their variations, which can be implemented separately or combined to reach higher sensitivity enhancement factors (SEFs). For instance, for charged analytes in matrices with low salt content, stacking by electrokinetic injection (field-enhanced sample injection, FESI) [16,17] can be used and SEFs around 1000 were reported. Alternatively, ITP is very interesting for charged analytes in high conductivity matrices, and SEFs from 200 to 10 000 were reported [18,19]. Sweeping, that utilises hydrophobic properties of compounds in the presence of a micellar phase, can provide SEFs up to 5000 for neutral and charged compounds in matrices with low or high salt content [20].

Coupling FESI and sweeping showed to provide the best SEF reported so far, reaching value of one million for the so-called cation-selective exhaustive injection-sweeping micellar electrokinetic chromatography (CSEI-Sweep-MEKC) [21], and allowing detection of cations at part per trillion levels. The capillary was first filled with a background electrolyte (BGE) containing an organic solvent; next with a large plug of a high conductivity buffer (HCB) without organic solvent, and then a short plug of water was introduced by pressure. Finally, a positive polarity was switched on and cationic analytes, present in a low conductivity matrix, were stacked at the water/HCB boundary, because of the differences in electrical field (high

field in the sample vial and water plug and low field in the HCB zone). HCB acted as a trap for analytes and longer injection times (up to 900 s) than usual were used in electrokinetic mode [22]. After this step, a micellar BGE (BGE with micelles such as SDS) was placed at the inlet and outlet vials and a negative polarity was applied. Micelles from the BGE entered the capillary, swept the cations stacked in the HCB plug and finally separation by MEKC proceeded. Since then, CSEI-Sweep-MEKC was applied to various compounds such as cocaine [23], cyanuric acid [24], heroin [25] and different matrices were analysed such as fish water [26], urine [27] and blood [28]. This technique was also applied to the analysis and preconcentration of anions and purposively named anion-selective enhanced injection-Sweep-MEKC [29,30].

Optimisation of this preconcentration technique is rather difficult, because parameters such as injection time, concentration and length of HCB zone, water plug, concentration of SDS and conductivity of sample influence the SEFs. So far, optimisation was systematically conducted by varying one experimental parameter at a time, all the others being fixed, whereas they could present interaction effects. In regard of published papers, authors did not agree with the parameters to be optimised. For example, some authors did not optimize the SDS concentration for the sweeping part (it is fixed according to the requirements of the MEKC separation) [25,27,31,32]. Optimisation of the HCB concentration was also not systematically performed [22–24,33,34]. Influence of the matrix conductivity was hardly investigated [22, 27, 30]. Furthermore, there was no consensus about the usefulness of the water plug, some authors using one [30,34,35], some others not [22,25,36]. Finally, discrepancies were noted about the HCB composition, with the use of phosphoric acid only [21,30,36] or of a phosphate buffer [25,31,32].

Consequently, there is a real need for understanding the impact of the experimental parameters on SEFs in FESISweep- MEKC, and this was the aim of the present work. For this purpose, a chemometric approach based on a fractional factorial design was used for the first time, to our knowledge, for online concentration techniques. Model cationic compounds of environmental interest were chosen so that a wide range of  $\log P$  was encompassed and capillaries coated with linear polyacrylamide were used to suppress electroosmotic flow (EOF). The results obtained with this strategy contribute to elucidate the impact of experimental parameters on SEFs and allow to considerably reduce the parameters to be optimized when FESI-Sweep-MEKC is contemplated for real trace analyses.

### III.I.3. Materials and methods

#### III.I.3.1. Chemicals and solutions

Phosphoric acid ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), acetonitrile (ACN) and methanol (MeOH) were of high-performance liquid chromatography (HPLC) grade, 1 M sodium hydroxide (NaOH) and 0.1 M hydrochloride (HCl) solutions were purchased from VWR (Fontenay-sous-bois, France). Tetramethylethylenediamine (TEMED, >99%) was obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Sodium monobasic ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , >99%) and dibasic phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , >99%), sodium dodecyl sulphate (SDS, >99%), acrylamide monomer (>99%), acetic acid (>99.7%), 3-(trimethoxysilyl)propyl methacrylate ( $\gamma$ -MPS, >99%), ammonium persulphate (APS, >98%), dichloromethane ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , >99%) and acetone (HPLC grade) were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France). Quinine (Q) hydrochloride dihydrate, DL-propranolol (P) hydrochloride, strychnine (S), atropine (A), nicotine (N) and codeine (C), all of 99% purity, were obtained from Sigma-Aldrich. Ultrapure (UP) water was delivered by a Direct-Q3 UV system (Millipore, Molsheim, France). The compositions of used electrolytes were 46 mM sodium phosphate buffer (30 mM ionic strength), pH 2.3; 5 mM sodium phosphate buffer (9 mM ionic strength), pH 7.0. A total of 2, 6 and 9 mM sodium phosphate buffer, pH 2.3, were obtained by diluting the 46 mM sodium phosphate buffer pH 2.3 with UP water. Stock solution of 250 mM SDS was prepared by dissolving the appropriate amount in UP water. BGEs were obtained by adding the appropriate amount of CAN and SDS (from the stock solution) to the sodium phosphate buffers. Four stock mixture solutions of Q, P, S, A, N and C at 400 mg/L each were prepared by dissolving them in 2, 6, 9 and 46 mM sodium phosphate buffers, pH 2.3. The desired concentrations (100 ppm for MEKC, 40 ppb for CSEI-Sweep-MEKC) were obtained by successive dilutions of stock mixture solutions in the appropriate buffers. All solutions were stored at 4°C in a refrigerator, daily prepared and filtered through 0.20  $\mu\text{m}$  membranes before use. All indicated phosphate buffer pH were those measured.

#### III.I.3.2. Apparatus and software

All CE experiments were carried out with an Agilent Technologies HP 3D CE system (Massy, France) equipped with a diode array detector (DAD, deuterium lamp) set at 200 nm for

strychnine, atropine and codeine, 220 nm for propranolol, 250 nm for quinine and 260 nm for nicotine (bandwidth of 20 nm, reference wavelength at 340 nm with a bandwidth of 40 nm). Separations were performed in a 50 cm (effective length: 41.5 cm)  $\times$  50  $\mu$ m inside diameter (id) fused-silica capillary tube (Photonlines, Marly le-Roi, France) coated by linear polyacrylamide polymer (LPA). A personal computer using HP 3D ChemStation controlled the HP 3D CE instrument and allowed data analysis. The statistical data analyses were performed using JMP 5.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) and Excel 2003 (Microsoft Corporation, Courtaboeuf, France).

### *III.1.3.3. Experimental procedures*

#### *III.1.3.3.1. LPA coating and capillary conditioning*

LPA coated capillaries were prepared according to slightly modified Hjerten's procedure [37]: new bare fused-silica capillary was flushed with acetone under 1 bar for 10 min with the CE pump, next with 1 M NaOH for 30 min, followed by 0.1 M HCl and UP water for 10 min each. Then the capillary was silanised at 25°C by filling it with a mixture of 0.6% (v/v)  $\gamma$ -MPS and 0.5% (v/v) acetic acid in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. After 50 min, the capillary was flushed with MeOH and UP water for 10 min each, then filled with acrylamide monomer (15 mg/mL) solution (sonicated for 30 min) including TEMED (0.1% v/v) and APS (1 mg/mL) and kept at 25°C for 1 h. After this step, the capillary was flushed again with UP water for 10 min and finally dried under a hot nitrogen flow (100°C) for 1 h. The coating quality was checked by measuring the electroosmotic mobility ( $\mu_{EO}$ ) according to Vigh's procedure [38] with a 5 mM sodium phosphate buffer at pH 7.0. Capillaries having  $\mu_{EO}$  superior to  $2 \times 10^{-5}$  cm<sup>2</sup>/V/s were discarded.

Every day, the capillary was flushed under 1 bar for 20min with the micellar BGE (46 mM sodium phosphate buffer, pH 2.3, 90 mM SDS/ACN (80:20, v/v)) and a voltage of -15 kV was applied for 10 min. Before each experiment, the capillary was flushed with the desired BGE for 5 min. At the end of the day, the capillary was flushed with UP water for 5 min, and then dried for 5 min under air circulation.

### *III.I.3.3.2. MEKC procedure*

Separation of the test analytes by MEKC was set up before running the experimental design. The micellar BGE compositions were 46 mM sodium phosphate buffer, pH 2.3, containing 50, 70 or 90 mM SDS/ACN (80:20, v/v). Standard analytes (Q, P, S, A, N and C) at 100 ppm in corresponding BGE were injected by pressure (50 mbar, 6.8 s, corresponding to 1.2% of the capillary length). Then a voltage of  $-15$  kV was applied with micellar BGE at inlet and outlet vials for separation.

### *III.I.3.3.3. General CSEI-Sweep-MEKC procedure*

The overall CSEI-Sweep-MEKC procedure is illustrated in Figure III-I-1. Briefly, the capillary was first filled with the BGE without micelles followed by the introduction of a HCB zone under

50 mbar and then of a short plug of water under 25 mbar (Figure III-I-1A). Next, analytes were injected applying a voltage of  $+15$  kV with BGE without micelles at the outlet and sample solution at the inlet (Figure III-I-1B). Injection voltage of  $+15$  kV was used because smooth current curves were obtained and so more reproducible injection [39]. Cations entered the capillary and stacked at the beginning of the HCB zone because of electrical field differences between sample and HCB zones. The voltage was then switched to the reverse polarity ( $-15$  kV) with the micellar BGE at the inlet and outlet, thus, allowing the entry of micelles for sweeping and subsequent separation by MEKC (Figure III-I-1C and D). Injection time, length of HCB and water plug, concentration of HCB and SDS, and sample conductivity values were varied regarding the experimental design.

### *III.I.3.3.4 Procedure for HCB composition investigation*

The two acidic HCB series containing hydrogen cation for the first one, and both hydrogen and sodium cations for the second, were composed of 53, 100 and 142 mM  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , pH 1.2, and 100, 179 and 253 mM sodium phosphate buffer, pH 2.3. The chosen concentrations corresponded to 0.68, 1.02 and 1.29 S/m conductivities, respectively. For these experiments, the BGE without micelles was 46 mM sodium phosphate buffer pH 2.3/ACN (90:10, v/v). HCB zones were introduced under 50 mbar for 84.5 s (corresponding to 15% of the capillary

length). Strychnine (4 mg/L in 3 mM sodium phosphate buffer pH 2.3) was electrokinetically injected at +15 kV during 500 s. Afterwards, a pressure of 50 mbar was applied to the inlet vial with the BGE without micelles in the inlet and outlet vials for the mobilisation of the entire HCB zone until the detection window.

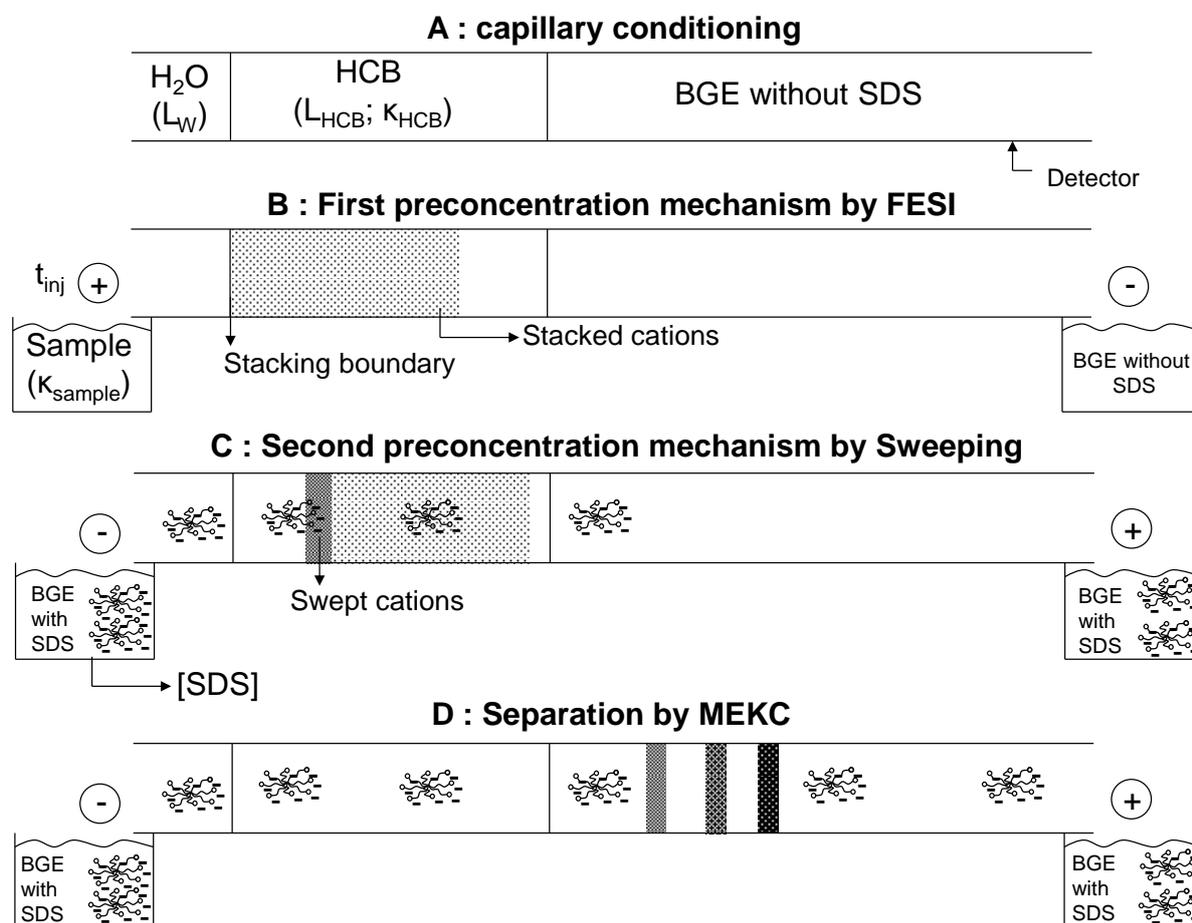


Figure III-I-1: Schematic diagram of the CSEI-Sweep-MEKC. (A) The LPA coated capillary is conditioned with the non-micellar BGE followed by the HCB devoid of organic solvent and micelles, and finally a short plug of water is introduced. (B) Positive polarity is switched on with the analytes diluted in low concentrated BGE without micelles at the inlet and the BGE without micelles at the outlet allowing the injection and concentration of the cations in the HCB by FESI. (C) Polarity is reversed and the micellar BGE is placed at the inlet and outlet. Micelles enter the capillary and concentrate the analytes by sweeping. (D) After analytes being swept by micelles, they separate by MEKC.

### *III.I.3.3.5. Protocol for checking the influence of the introduction of a plug of micellar BGE after sample electrokinetic injection and before sweeping*

For these experiments, the BGE without micelles was 46mM sodium phosphate buffer pH 2.3/ACN (80:20, v/v). HCB was introduced under 50 mbar for 155 s (corresponding to 27.5% of the capillary length), which was followed by the introduction of the water plug at 25 mbar for 2.8 s (corresponding to 0.25% of the capillary length). Analytes were electrokinetically injected under +15 kV for 750 s. Sample solutions were Q, P, S, A, N and C at 40 ppb in 6 mM sodium phosphate buffer pH 2.3. The micellar BGE was composed of 46 mM sodium phosphate buffer, pH 2.3, 70 mM SDS/ACN (80:20, v/v).

In a second experiment, in addition to the preceding steps, a plug of the micellar BGE was hydrodynamically injected (50 mbar, 8.5 s, corresponding to 1.5% capillary volume) after the sample electrokinetic injection step and before the application of the negative voltage for the sweeping step and subsequent separation.

## **III.I.4. Design of experiments**

### *III.I.4.1. Choice of the responses and factors*

The responses chosen to evaluate the influence of each factor were the corrected peak areas, providing information on the quantity of injected analytes and peak heights, which was proportional to the SEFs by FESI and sweeping. Considering previous works reported in the literature [21–36] and the recognised mechanism of CSEI-Sweep-MEKC, six potentially influent factors were selected: HCB conductivity ( $\kappa_{\text{HCB}}$ ), HCB zone length ( $L_{\text{HCB}}$ ), injection time ( $t_{\text{inj}}$ ), sample conductivity ( $\kappa_{\text{sample}}$ ), length of the water plug ( $L_{\text{W}}$ ) and SDS concentration ([SDS]).

### *III.I.4.2. Choice of the experimental design*

The chemometric approach consisted in a two-level fractional design ( $2^{6-2}$ ) for six factors, with four centre points. With this design, main factor effects and first order interactions (two factor interactions) were estimated independently; however the two-factor interactions were confounded with each other as follows:  $\kappa_{\text{HCB}} \times L_{\text{HCB}} = L_{\text{W}} \times [\text{SDS}]$ ;  $\kappa_{\text{HCB}} \times t_{\text{inj}} =$

## Partie III - FESI-Sweep-MEKC- Chapitre I- Etude des paramètres

$$\kappa_{\text{sample}} \times [\text{SDS}]; \kappa_{\text{HCB}} \times \kappa_{\text{sample}} = t_{\text{inj}} \times [\text{SDS}]; \kappa_{\text{HCB}} \times L_{\text{W}} = L_{\text{HCB}} \times [\text{SDS}]; L_{\text{HCB}} \times t_{\text{inj}} = \kappa_{\text{sample}} \times L_{\text{W}}; \kappa_{\text{HCB}} \times [\text{SDS}] = L_{\text{HCB}} \times L_{\text{W}} = t_{\text{inj}} \times \kappa_{\text{sample}}; L_{\text{HCB}} \times \kappa_{\text{sample}} = t_{\text{inj}} \times L_{\text{W}}.$$

### III.I.4.3. Factor levels

Injection times were from 500 to 1000 s. Length of the water plug was from 0 to 0.5% of the capillary length. Analytes were diluted in pH 2.3 sodium phosphate buffers with conductivity levels from 0.05 to 0.16 S/m. The HCB conductivity was chosen at 1.66, 1.87 and 2.09 S/m. HCB zone lengths were chosen between 15 and 40% of the capillary length. SDS concentration was from 50 to 90 mM. Factor levels, in initial and coded values, of the fractional design are given in Table III-I-1.

Coded levels		-1	0	+1
$\kappa_{\text{HCB}}$	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> -based HCB conductivity (S/m)	1.66	1.87	2.09
	<i>corresponding H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> concentration (mM)</i>	<i>200</i>	<i>250</i>	<i>300</i>
$L_{\text{HCB}}$	Length of HCB (% of capillary length)	15	27.5	40
$t_{\text{inj}}$	Sample injection time (s)	500	750	1000
$\kappa_{\text{sample}}$	Sample conductivity (S/m) (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 2.3)	0.05	0.10	0.16
	<i>Corresponding phosphate concentration (mM)</i>	<i>2</i>	<i>6</i>	<i>9</i>
$L_{\text{W}}$	Length of water plug (% of length of capillary)	0	0.25	0.5
[SDS]	SDS concentration (mM)	50	70	90

Table III-I-1: Initial and coded values for the different studied factors

### III.I.4.4. Matrix of experiments

The fractional design was composed of 16 experiments repeated twice and eight repetitions of the central point; hence, a total of 40 experiments were performed. Experiments were split in four blocks of ten experiments (see Table III-I-2). The ten experiments of each block were realized in one continuous period (one to two days of experiments) and two different coated capillaries were used: a first one for block 1 and a second one for blocks 2, 3 and 4. Thus, the influences of capillary coating and day-to-day variations were evaluated. Inside blocks, experiments were randomized to avoid being affected by uncontrolled factor variations.

Block	K <sub>HCB</sub>	L <sub>HCB</sub>	t <sub>inj</sub>	K <sub>sample</sub>	L <sub>w</sub>	[SDS]
1	-	-	-	-	-	-
1	+	-	-	+	+	-
1	+	-	+	+	-	+
1	-	-	+	-	+	+
1	-	+	-	+	-	+
1	0	0	0	0	0	0
1	-	+	+	+	+	-
1	+	+	-	-	+	+
1	0	0	0	0	0	0
1	+	+	+	-	-	-
2	0	0	0	0	0	0
2	+	+	+	+	+	+
2	-	-	-	+	+	+
2	+	-	+	-	+	-
2	0	0	0	0	0	0
2	-	+	-	-	+	-
2	+	+	-	+	-	-
2	+	-	-	-	-	+
2	-	+	+	-	-	+
2	-	-	+	+	-	-
3	-	+	+	+	+	-
3	+	-	-	+	+	-
3	+	+	-	-	+	+
3	+	+	+	-	-	-
3	-	+	-	+	-	+
3	-	-	-	-	-	-
3	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
3	-	-	+	-	+	+
3	+	-	+	+	-	+
4	-	-	-	+	+	+
4	+	-	-	-	-	+
4	+	-	+	-	+	-
4	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
4	+	+	+	+	+	+
4	-	-	+	+	-	-
4	-	+	+	-	-	+
4	+	+	-	+	-	-
4	-	+	-	-	+	-

Table III-I-2: Matrix of experiments for the design of experiments in coded values

#### III.I.4.5. Determination of the effects

Factor effects were calculated by classical least-squares multiple linear regression. Hence, the following model was retained,  $Y = \text{intercept} + \sum_i E_i X_i + \sum_i \sum_j E_{ij} X_i X_j$ , where  $Y$  is the predicted response from linear model, intercept was the constant term,  $E_i$  the coefficient of factor  $X_i$  (i.e. the effect of factor  $X_i$ ),  $E_{ij}$  the coefficient of the interaction between factors  $X_i$  and  $X_j$ . As a first order model equation was applied, second order interactions and above were assumed to be negligible and, therefore, were not calculated. Effect significance was evaluated by comparing the coefficient to its standard deviation (obtained from the repeated measurements and the lack of fit of the model) thanks to a  $t$ -test with a risk of first kind of 5%. The

experimental design chosen did not allow studying all the first order interactions independently (see confusions in section 3.2). Hence, the final interactions retained were those most likely to exist, that is for which the two factors were also significant. To better realize the impact of the factors, coefficients were expressed as relative effects, that is effect normalized by the average value of the response.

### III.I.5. Results and discussion

#### III.I.5.1. Setup of the MEKC separation

The target of the present study was to better understand the impact of the factors influencing CSEI-Sweep-MEKC. For this purpose, compounds with a rather wide range of  $\log P$  values (from 1.2 for nicotine to 3.5 for quinine) and different electrophoretic mobilities were selected (see Table III-I-3). It can be noticed that the compounds were fully ionised at the acidic pH used in this study.

	Quinine	Propranolol	Strychnine	Atropine	Nicotine	Codeine
pKa	8.5 ; 4.11	9.42	8.26 ; 2.3	9.43	8.02 ; 3.12	8.21
M (g/mol)	324.4	259.9	334.4	289.4	162.2	299.4
$\mu_0$ ( $\times 10^{-5}$ cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	14.3	11.7	15.1	13.1	24.1	13.0
$\mu_0$ ( $\times 10^{-5}$ cm <sup>2</sup> V <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	28.3	NA	29.4	NA	47.5	NA
log P	3.44	3.48	1.93	1.83	1.17	1.19

Table III-I-3: Physico-chemical properties of the test analytes (pKa, molecular weight, electrophoretic mobilities at infinite dilution and  $\log P$ ) pKa and  $\log P$  values at 25°C were obtained from the database ‘PhysProp’ (<http://www.srcinc.com>).  $\mu_0$  was obtained by measuring the migration times by capillary zone electrophoresis (CZE) at 25°C at suitable pHs (in order to have the analytes in mono or dicationic form) and the corrections for ionic strength were performed using Friedl’s model [43]. For strychnine mobility of the dicationic form is the one measured at pH 1.2 (it was impossible to get a suitable BGE with lower pH).

Focalisation by sweeping is proportional to retention factor [20], so the higher the SDS concentration, the higher sensitivity enhancement is. Hence a concentration of 90 mM SDS was chosen as the maximum, in accordance with values encountered in literature. A total of 20% of ACN in the BGE were necessary in order to have quinine, the most hydrophobic compound, eluted out of the micelles, as verified with sulconazole chosen as a micellar

marker (data not shown). The minimum concentration of SDS was chosen in order to be at least two times higher than the critical micelle concentration (CMC). As a CMC around 20 mM with 20% ACN was reported in literature [40–42], 50 mM was chosen as the minimum concentration. The voltage separation was fixed at –15 kV because above this value, Joule effect started to be observed with 90 mM of SDS.

Figure III-I-2 shows the electropherograms obtained with 46 mM sodium phosphate buffer, pH 2.3, containing 50, 70 and 90 mM SDS/ACN (80:20, v/v). Note that LPA-coated capillary was used to ensure very small EOF (electroosmotic mobility lower than  $2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{V/s}$  in micellar and non-micellar BGEs, as measured by Vigh's method [38]). Consequently, the most hydrophobic analyte came out first and the less hydrophobic one came out last. All compounds were always baseline separated.

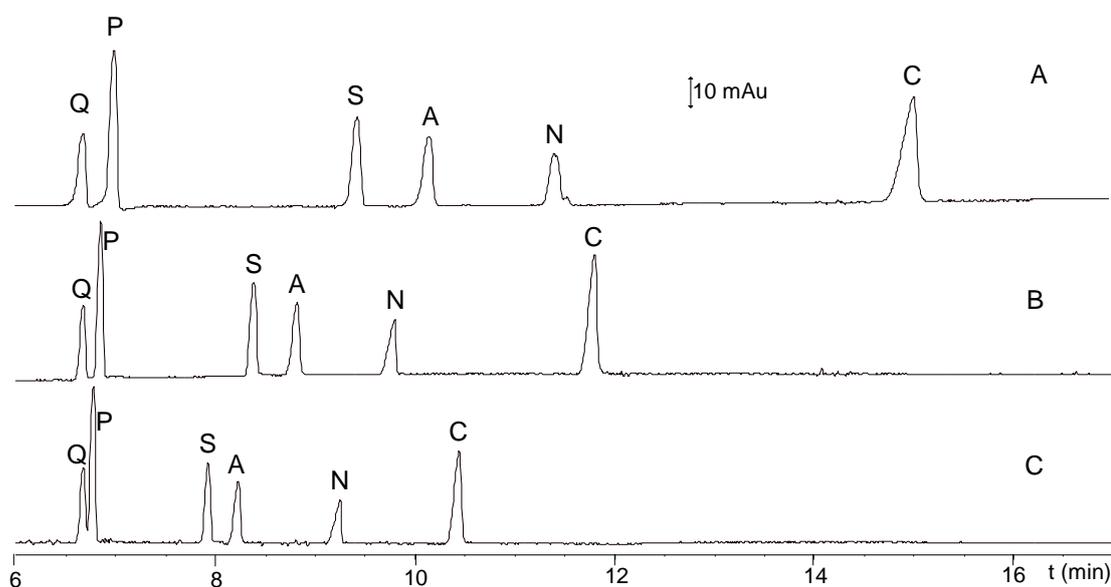


Figure III-I-2: MEKC separations of quinine (Q), propranolol (P), strychnine (S), atropine (A) nicotine (N) and codeine (C). BGE: 46 mM sodium phosphate buffer, pH 2.3, with 50 mM (A), 70 mM (B) and 90 mM (C) SDS/ACN (80:20, v/v). Sample concentration: 100 mg/L in BGE. UV absorbance detection at 200 nm.

### III.I.5.2. Investigation on HCB composition

In CSEI-Sweep-MEKC, HCB zone acts as a trap allowing long electrokinetic injections of analytes (several hundred seconds) [22,23,36], because of the large discrepancy in electrolyte and sample conductivities and the long HCB zone. Indeed, in the absence of adverse

dispersive effects, the stacked analyte concentration in HCB zone should be proportional to the electrical field ratio between sample and HCB zone ( $E_S/E_{HCB}$ ). Use of either phosphoric acid alone pH 1.9 [21,30,36] or acidic phosphate buffer pH 2.5–2.9 [25,31,32] as HCB was reported in the literature, but there was no given explanation for this in either one or the other case. To better understand their influence, both HCB compositions were tested in this work at three conductivity levels. For this, long electrokinetic injections of strychnine were performed after the capillary was filled with the BGE containing ACN and a long HCB zone, and just after injection, the zones were hydrodynamically mobilized past the detector (Figure III-I-3).

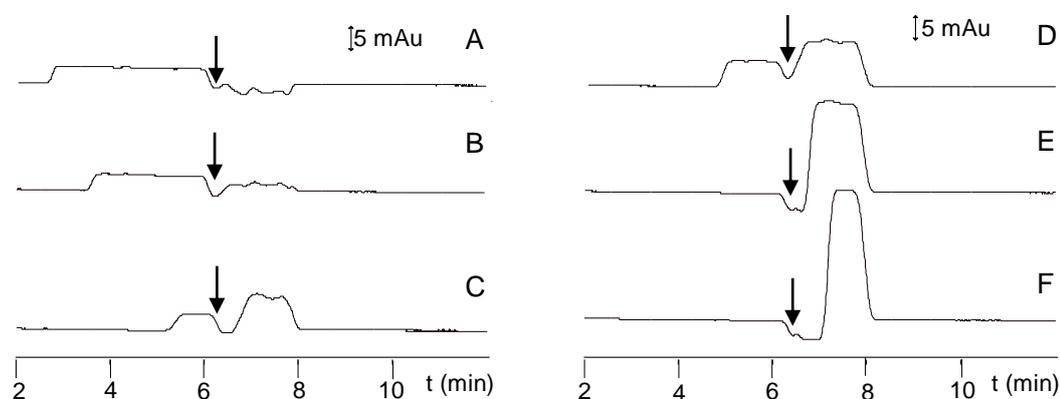


Figure III-I-3: Influence of HCB nature and concentration on field-amplified electrokinetic sample injection observed after pressure mobilization of electrophoretic bands. BGE, 46 mM sodium phosphate buffer, pH 2.3/ACN (90:10, v/v). Hydrodynamic introduction of HCB, 50 mbar, 84.5 s (7.5 cm length, 15% capillary volume): (A) 53 mM  $H_3PO_4$  (0.680 S/m, pH 1.2); (B) 100 mM  $H_3PO_4$  (1.024 S/m, pH 1.2); (C) 142 mM  $H_3PO_4$  (1.290 S/m, pH 1.2); (D) 100 mM sodium phosphate buffer pH 2.3 (0.680 S/m); (E) 179 mM sodium phosphate buffer pH 2.3 (1.024 S/m); (F) 253 mM sodium phosphate buffer pH 2.3 (1.290 S/m). Sample: 4 mg/L strychnine in 3 mM sodium phosphate buffer, pH 2.3. Arrows represent the boundary between the BGE (containing ACN) and the HCB zone (without ACN).

The baseline dip detected at around 6 min should correspond to the boundary between the BGE (containing ACN) and the HCB (devoid of ACN). The positive signal before 6 min thus corresponds to strychnine that passed through out of the HCB zone and the one after 6 min to strychnine stacked in the HCB. As can be seen, first for both HCB compositions, stacking of strychnine became more efficient upon increasing HCB conductivity, as a result of a decrease in electrical field in this zone and a concomitant increase in electrical field in the sample vial during injection. Second, it appears that, for a given conductivity, strychnine was more

efficiently trapped in sodium phosphate buffer (Figure III-I-3D to F), than in phosphoric acid alone (Figure III-I-3A to C). In Figure III-I-3F, strychnine was totally stacked in the HCB zone, whereas for the same conductivity (1.02 S/m) with phosphoric acid, it was not (Figure III-I-3C). Indeed, the signal of strychnine is 3.3 times higher and the width is 2.5 times lower when phosphate buffer is used than with phosphoric acid.

This could be explained by the existence of a transient isotachopheresis (t-ITP) mechanism occurring with sodium phosphate buffer and not with phosphoric acid alone. t-ITP happens when species acting as leading (LI) and terminating (TI) ions are present. In sodium phosphate buffer, possible LI and TI were  $\text{Na}^+$  and  $\text{H}^+$ , respectively. Absolute mobilities at 25°C for  $\text{Na}^+$  [41] and strychnine (see Table III-I-3) are  $51.9 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$  and  $31.5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , respectively. Hence,  $\text{Na}^+$  could act as LI. Effective mobility for  $\text{H}^+$  can be calculated as follows:

$$\mu_{\text{eff}}(\text{H}^+) = \mu^\circ(\text{H}^+) \times \frac{[\text{H}^+]}{[\text{H}^+] + [\text{H}_3\text{PO}_4]} \quad (1)$$

where  $\mu(\text{H}^+)$  is the actual  $\text{H}^+$  electrophoretic mobility, calculated using Friedl's model [43] and  $\mu_{\text{eff}}(\text{H}^+)$  the effective  $\text{H}^+$  electrophoretic mobility at pH 2.3.

For sodium phosphate buffers of 100, 179 and 253 mM total phosphate concentrations, calculation gave absolute mobility for  $\text{H}^+$  of 46.0, 28.1 and  $20.9 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , respectively. These calculations showed that with 179 mM and 253 mM sodium phosphate buffer HCBs (conditions corresponding to Figure III-I-3E and F, respectively), absolute mobility of  $\text{H}^+$  was lower than actual mobility of strychnine. Consequently,  $\text{H}^+$  could act as a terminating ion. Accordingly, strychnine was fully stacked with sharp fronts between the LI and the TI and its final concentrations should tend to adjust to sodium ion concentration. This explains why strychnine zone narrowed upon increasing sodium buffer concentration. Although sodium phosphate buffer was more efficient than phosphoric acid alone as HCB to focalize cationic analytes because a t-ITP step was involved, it was decided for subsequent experiments to work with phosphoric acid alone to keep closer to the principles of FESI-Sweep-MEKC as described originally in the literature [21]. However, a study in our

laboratory is being undergone in order to investigate the possible benefit of sodium phosphate buffer as HCB over phosphoric acid.

### *III.I.5.3. Influence of the experimental factors*

#### *III.I.5.3.1. Choice of the factor levels*

Injection times and lengths of water plug were chosen in accordance with values generally encountered in literature. Rather than working on samples corresponding to analytes diluted in UP water, analytes were diluted in pH 2.3 sodium phosphate buffers of different concentrations in order to evaluate the influence of sample conductivity. Indeed, conductivity of real samples might significantly vary. Chosen conductivity levels corresponded to the conductivity range of current mineral waters. SDS concentration was chosen as explained in section 4.1. As stacking with FESI depends on HCB to sample conductivity ratio (the higher this ratio, the better SEFs are), HCB conductivity was chosen in order to have a minimal ratio of 10. The corresponding phosphoric concentrations (200–300 mM) were in accordance with values already used in literature. The HCB length was chosen so that nicotine, the most mobile analyte, remained fully trapped in the HCB with an injection of 1000 s, leading to a length of 40% of the capillary (using a HCB of 200 mM phosphoric acid, data not shown) and propranolol, the less mobile analyte, remained fully trapped in the HCB with an injection of 500 s, leading to a length of 15% of the capillary (using a HCB of 200 mM phosphoric acid, data not shown). Factor levels, in initial and coded values, of the fractional design are shown in Table III-I-1. Most of the experimental results are gathered in Figure III-I-4 and 5 under the form of the relative effects of each experimental factor and factor interactions on corrected peak areas (Figure III-I-4) and peak heights (Figure III-I-5). The given values correspond to the variation, normalized by the average value, of the answer when the given experimental factor varies from level –1 to level 0.

#### *III.I.5.3.2. Influence of HCB conductivity*

The HCB (phosphoric acid) conductivity ( $\kappa_{\text{HCB}}$ ) was varied between 1.66 and 2.09 S/m. Figures III-I-4 and III-I-5 show variations of HCB conductivity have no influence on corrected peak areas and peak heights. These results are in agreement with those obtained previously by other authors [25, 32, 41]. In order to better understand the obtained results, the

## Partie III - FESI-Sweep-MEKC- Chapitre I- Etude des paramètres

electrical field distribution between the BGE zone ( $E_{BGE}$ ), the HCB zone ( $E_{HCB}$ ) and the sample vial ( $E_S$ ) was evaluating. The approach developed by Chien and Burgi, where the different boundaries were considered pseudo-stationary, was used to calculate  $E_{HCB}$  and  $E_{BGE}$  [7]. If the capillary is considered only fill with the BGE and the HCB zones, the electrical fields in the HCB zone and in the BGE zone could be calculated as follows:

$$E_{HCB} = \frac{V_{inj}/L}{x_{HCB} + (1 - x_{HCB}) \kappa_{HCB} / \kappa_{BGE}} \quad (2)$$

$$E_{BGE} = \frac{V_{inj}/L}{x_{BGE} + (1 - x_{BGE}) \kappa_{BGE} / \kappa_{HCB}} \quad (3)$$

where  $\kappa_{HCB}$  and  $\kappa_{BGE}$  are the conductivities of the HCB and the BGE, respectively;  $V_{inj}$ , the applied voltage during the injection;  $L$ , the length of the capillary and  $x_{HCB}$  and  $x_{BGE}$ , the zone length to capillary length ratio of HCB and BGE, respectively. Applying the balance of current density  $J$  ( $J = \kappa_{HCB} \times E_{HCB} = \kappa_{BGE} \times E_{BGE}$ ) at a given time, we were then able to evaluate a mean electrical field in the sample vial,  $E_S$ . These rough and approximate calculations (especially for  $E_S$ ) did not take into account (i) the spatial distribution of electrical field in the sample vial and (ii) the dynamic evolution of zone composition with time under the voltage application, but they just intend to get an idea of the tendencies of the electrical field in order to understand the observed results.

Table III-I-4 presents the calculated electrical fields in the three zones and the sample to HCB electrical field ratio ( $E_S/E_{HCB}$ ) for the different configurations of HCB lengths and concentrations and sample conductivities. Peak areas, which are proportional to the amount of analytes injected in the capillary, should depend on the electrical field within the sample vial, because velocity is proportional to electrical field. As can be seen in Table III-I-4, upon increasing HCB concentration (from 200 to 300 mM) for a fixed HCB length (15% of capillary length) and a sample conductivity of 0.05 S/m,  $E_{HCB}$  decreased from 3000 to 2400  $V\ m^{-1}$ , but variations of  $E_S$  were very small (from 102 500 to 102 800  $V\ m^{-1}$ ). Same conclusions can be done for other HCB length and/or sample conductivity values. Therefore,

## Partie III - FESI-Sweep-MEKC- Chapitre I- Etude des paramètres

impact of HCB conductivity on corrected peak areas was not expected. These evaluations were in accordance with the results depicted in Figure III-I-4. The presented approach is rather simple, but it helps understanding the results and even more to predict tendencies for different configurations.

$L_{HCB}$ (% of capillary length)	[HCB] (mM)	$E_{HCB}$ (V/m)	$E_{BGE}$ (V/m)	$E_s$ (V/m)			$E_s/E_{HCB}$		
				$K_{sample}=0.05$ S/m	$K_{sample}=0.10$ S/m	$K_{sample}=0.16$ S/m	$K_{sample}=0.05$ S/m	$K_{sample}=0.10$ S/m	$K_{sample}=0.16$ S/m
15	200	3000	34800	102500	49200	32400	34	16	11
15	250	2700	34800	102700	49300	32500	38	18	12
15	300	2400	34900	102800	49400	32500	43	20	13
27.5	200	3500	40100	118100	56700	37300	34	16	11
27.5	250	3100	40200	118600	57000	37500	38	18	12
27.5	300	3800	40300	118900	57100	37600	43	20	13
40	200	4100	47300	139400	67000	44100	34	16	11
40	250	3670	47600	140200	67400	44300	38	18	12
40	300	3300	47800	140900	67700	44600	43	20	13

Table III-I-4: Estimation of electrical fields in HCB and BGE zones and sample vial, as calculated using the approach by Chien and Burgi [7] for all configurations of HCB lengths and concentrations and sample conductivities.

Peak heights should be related to the preconcentration mechanism of FESI and thus be proportional to the sample to HCB electric field ratio. Upon increasing HCB concentration from 200 to 300 mM, for a fixed HCB length (15% of the capillary length) and a conductivity of 0.05, 0.10 and 0.16 S/m, this ratio increased from 34 to 43, 16 to 20 and 11 to 13, respectively (Table III-I-4), and peak heights were expected to increase accordingly. This, however, was not confirmed experimentally (Figure III-I-5). Three explanations to this can be set forth. First, these electrical field ratio variations may not be large enough to induce a significantly higher stacking phenomenon. Second, convective band broadening by Joule heating or diffusion may offset the gain by stacking. Third, the  $E_s/E_{HCB}$  ratio was approximately calculated for a pseudo-stationary system, where conductivities of HCB zone and sample vial do not change during the injection step, whereas anions migrating from the capillary and hydrogen cations produced at the electrode led to a decrease in this ratio. But eventually, it is not possible for us to say which hypothesis prevails.

### III.I.5.3.3 Influence of HCB zone length

The HCB zone length ( $L_{HCB}$ ) was varied between 15 and 40% of the length of the capillary. As can be seen in Figure III-I-4, variations of the HCB zone length positively influenced corrected peak areas (from 10 to 30%). This could be explained first by an increase in the electrical field in the sample vial upon increasing HCB zone length, using the calculations

## Partie III - FESI-Sweep-MEKC- Chapitre I- Etude des paramètres

presented in section 4.3.2. In effect, the electrical field in the sample was expected to rise from 102 500 to 139 400 V m<sup>-1</sup> (a variation of 31%) when the HCB length increased from 15 to 40% of the capillary length for a 200 mM concentration of HCB and a sample conductivity of 0.05 S/m (Table III-I-4). This increase in electrical field in the sample vial led to an increase in injected sample amount. In addition to this, if the HCB length was not long enough and the injection time too long, analytes could leave the HCB zone and even the capillary, leading to sample losses. This was confirmed by the fact that nicotine, the most mobile ion, was the most affected and indeed, this latter was totally stacked in the HCB zone when it occupied 40% of the capillary with an injection time of 1000 s.

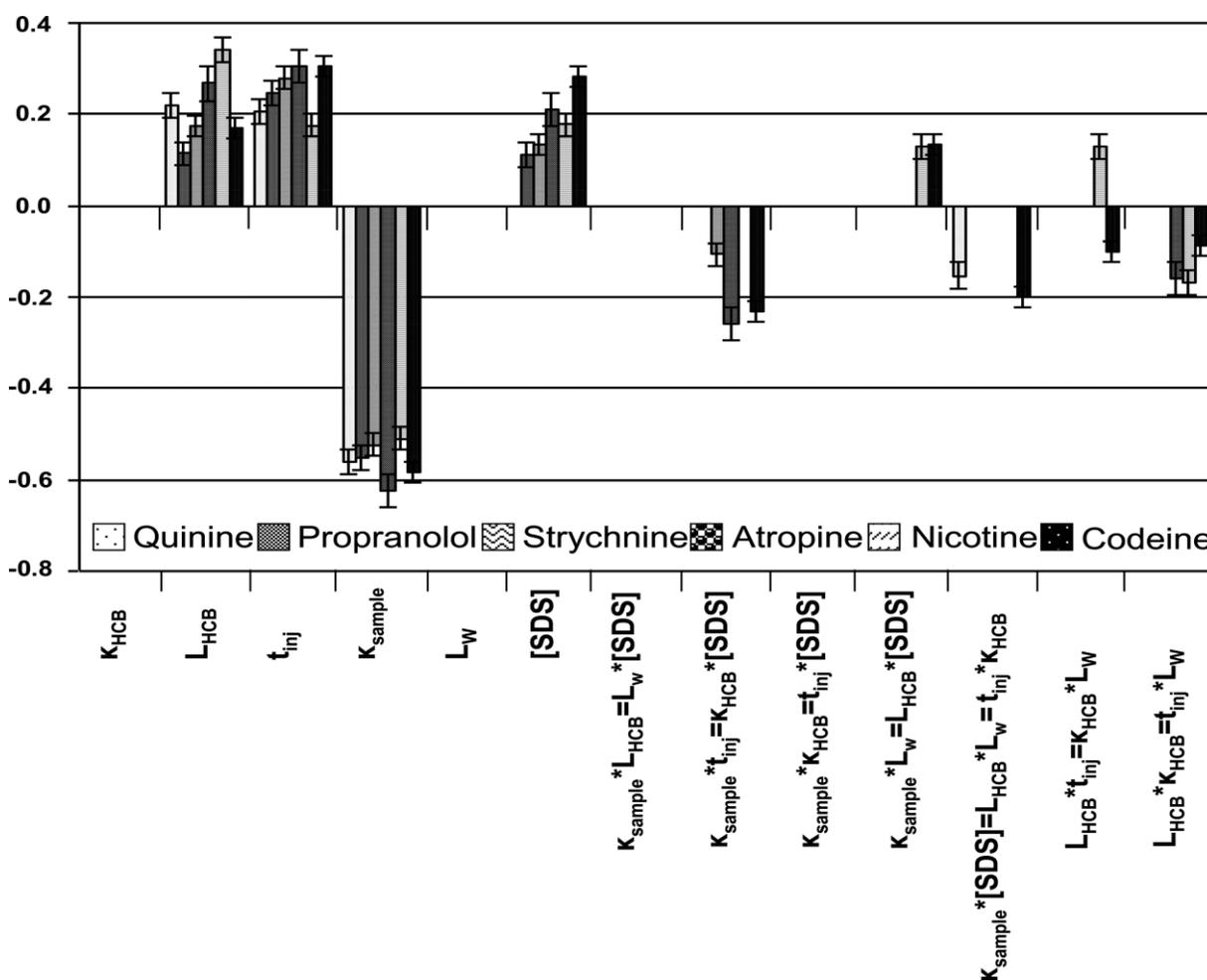


Figure III-I-4: Relative effects on corrected peak areas of each experimental parameter and parameter interactions. The values correspond to the variation, normalized by the average value, of the answer when the given experimental factor varies from level -1 to 0. Bars stand for 1 standard deviation. Only significant effects and interaction are reported. Parameters are HCB conductivity ( $\kappa_{HCB}$ ), HCB zone length ( $L_{HCB}$ ), injection time ( $t_{inj}$ ), sample conductivity ( $\kappa_{sample}$ ), length of the water plug ( $L_w$ ) and SDS concentration ([SDS]).

## Partie III - FESI-Sweep-MEKC- Chapitre I- Etude des paramètres

As far as SEFs are concerned, Figure III-I-5 shows that  $L_{HCB}$  did not influence peak heights for quinine, propranolol, strychnine and nicotine. This behaviour could be understood in considering that the  $E_s/E_{HCB}$  ratio may not be altered by the HCB zone length, as anticipated by the approximate calculations reported in Table 4. In effect, for a HCB concentration of 200 mM and a sample conductivity of 0.05 S/m, the sample-to- HCB electrical field ratio was expected to keep a constant value (34), when the HCB length increased from 15 to 40% of the capillary length. Apart from this, a positive effect of HCB zone length on peak height was noted for codeine (ca. 5%) and a negative one for atropine (ca. 5%) (Figure III-I-5). These peculiar behaviors do not seem to be related to any physical and chemical properties. Additional experiments should be performed in order to confirm or not these different tendencies.

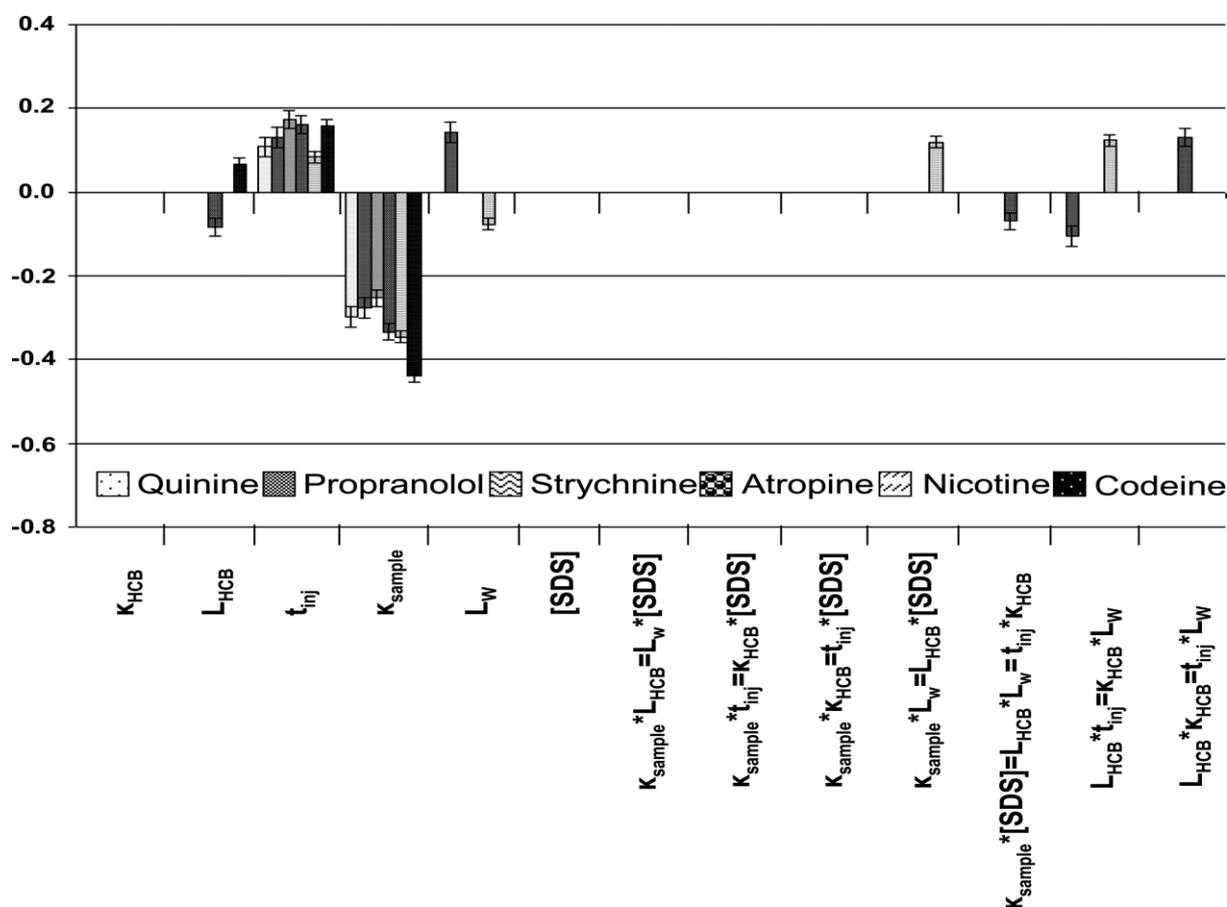


Figure III-I-5: Relative effects on peak heights of each experimental parameter and parameter interactions. The values correspond to the variation, normalized by the average value, of the answer when the given experimental factor varies from level -1 to 0. Bars stand for 1 standard deviation. Only significant effects and interaction are reported. Parameters are HCB conductivity ( $\kappa_{HCB}$ ), HCB zone length ( $L_{HCB}$ ), injection time ( $t_{inj}$ ), sample conductivity ( $\kappa_{sample}$ ), length of the water plug ( $L_w$ ) and SDS concentration ([SDS]).

The explanations and conclusions reported above, using only three specific setups, were confirmed for the other configurations, even though the calculated values were different (Table III-I-4). Again, this simple model can be a useful tool in order to understand and predict the tendencies.

### *III.I.5.3.4. Influence of injection time*

The injection time ( $t_{inj}$ ) was varied between 500 and 1000 s. Figure III-I-4 shows that upon increasing injection time, corrected peak areas increased as well, since a larger amount of analytes was expected to be injected into the capillary. As the variation of injection time from one level to another one was 50%, an increase in corrected peak areas by 50% was expected, whereas variations by 20–30% only were observed. This lower than expected increase could be explained by the fact that on one hand, injection was limited by potential analyte depletion and slow mass transfer at the capillary inlet and on the other hand, electrical field in the sample vial could decrease during the electrokinetic injection because of the generation of  $H^+$  at the electrode and the migration of anions from the capillary into the sample vial.

Regarding peak heights, a positive impact of injection time can be noted too (Figure III-I-5), as expected, but variations were smaller than for corrected peak areas (ca. 10–20%). This suggests that analyte stacking was not fully effective and that some peak broadening took place, possibly because of some Joule effect.

### *III.I.5.3.5. Influence of sample conductivity*

Sample conductivity ( $\kappa_{sample}$ ) was varied between 0.05 and 0.16 S/m. Figures III-I-4 and III-I-5 show sample conductivity had a negative impact on corrected peaks areas (50–60%) and on peaks heights (30–40%). Indeed, it is well known that sample conductivity plays an important role in electrokinetic injection and FESI. Salts present in the sample dramatically reduce the electrical field in the sample vial, and consequently sample load and focalisation by stacking decrease. Consequently, optimisations with standards diluted in UP water are not relevant and sensitivity enhancements reported likewise are not representative of real sample analysis. Hence, it is recommended for better reproducibility to control the sample conductivity of low

conductivity real samples, by adding a small amount of salt or preparing the sample in diluted BGE.

### *III.I.5.3.6. Influence of the length of the water plug*

The length of the water plug ( $L_w$ ) introduced after the HCB zone was varied between 0 and 0.5% of the capillary length. Figure III-I-4 shows variations of  $L_w$  did not impact on corrected peak areas, while Figure III-I-5 displays no influence on peak height for most of the model analytes (quinine, strychnine, atropine and codeine), but a positive one for propranolol (15%) and a slightly negative one for nicotine (5%). Zhang and Thormann asserted that the presence of a small water plug at the inlet of the capillary allowed more sample to be injected by electrokinetic injection [44]. This behavior was justified by a higher electrical field as soon as the voltage was switched on. To the least, this was established for a small injection time (20 s). In the present case, long electrokinetic injections were used (up to 1000 s), and during the electrokinetic injection, the water plug was suspected to be quickly filled by ions coming from the capillary and the sample vial and the enhancement of the electrical field might be rapidly lost. Theoretically, the water plug conductivity should not increase, following Kohlraush regulation function [45], however, the explanation proposed above is in accordance with the results obtained by Quirino and Terabe, who observed an augmentation of the water plug conductivity during the electrokinetic injection of cationic species [46]. Diffusion of species and/or convection due to thermal effects could explain the conductivity augmentation. The absence of an effect was also previously observed by others [22, 25, 36]. Hence, for long electrokinetic injections, the presence of a short water plug is no more needed.

### *III.I.5.3.7. Influence of SDS concentration*

SDS concentration was varied between 50 and 90 mM. Quite unexpectedly, Figure III-I-4 shows that SDS concentration had an influence on corrected peak areas (from 10 to 30%, except for quinine), although SDS was not present in the system during the injection step. The variations seemed to be correlated with analyte  $\log P$ , as a gradual increase in variation was observed from propranolol ( $\log P = 3.44$ ) to codeine ( $\log P = 1.19$ ). A possible explanation is that while switching the polarity after the injection step, the cations stacked at the capillary inlet migrated back to the inlet vial and went out of the capillary. SDS entering the capillary should prevent this loss of analytes, unless the interactions with micelles were not strong

enough, in other words, unless hydrophobicity of the analyte was not high enough. This hypothesis was confirmed by the following experiments. Indeed, an additional series of five identical experiments were performed in the same conditions as for the center points of the preceding experimental design, except the fact that a small plug (1.5% of the capillary volume) of micellar BGE was hydrodynamically introduced before inverting the polarity for sweeping and subsequent separation. The results obtained for the two series of experiments were compared in Figure III-I-6, where the mean corrected peak areas obtained without the micellar BGE plug were normalized to 100% for each compound and the variation of corrected peak areas for the experiments with the plug was calculated with respect to the experiments without the plug.

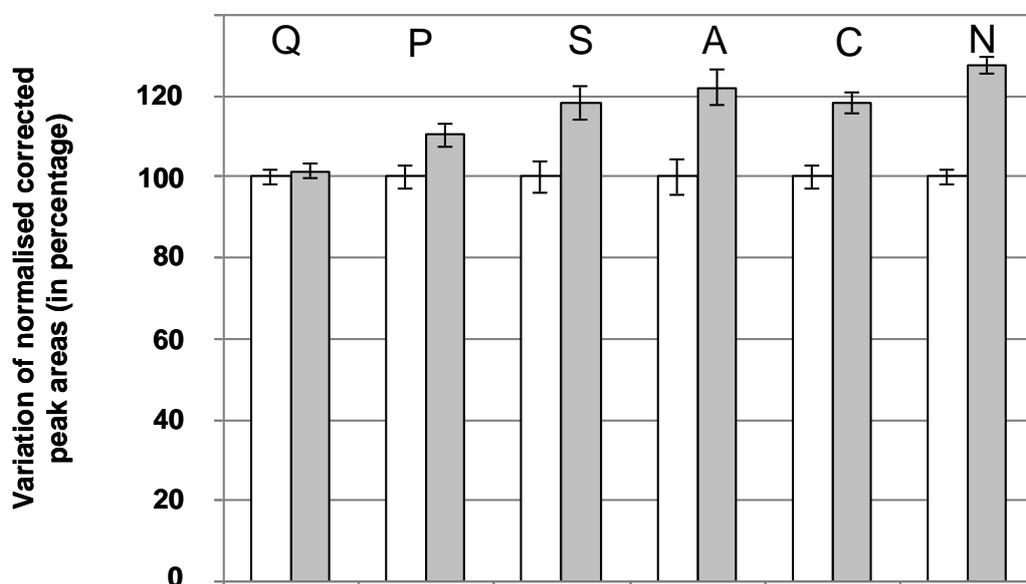


Figure III-I-6: Influence on corrected peak areas of the presence of a micellar BGE plug at the capillary inlet after the FESI step. In white, normalised (100%) mean corrected peak areas for the experiments without the micellar BGE plug. In grey, mean corrected peak areas for the experiments with the micellar BGE plug, normalised with values obtained without the micellar BGE plug. Non-micellar BGE: 46 mM sodium phosphate buffer, pH 2.3/ACN (80:20, v/v). HCB: 250 mM phosphoric acid, 50 mbar, 155 s (27.5% capillary volume). Water plug (25 mbar, 2.8 s, 0.25% capillary volume). Sample: analytes at 40 ppb each in 6 mM sodium phosphate buffer, pH 2.3. Micellar BGE plug, 50 mbar, 8.5 s (1.5% of capillary volume). Micellar BGE: 46 mM phosphate buffer, pH 2.3, 70 mM SDS/ACN (80:20, v/v). Error bars stand for 1 standard deviation ( $n = 5$ ).

As can be seen for each compound, corrected peak areas were higher in the presence of the micellar BGE plug than in the absence, except for quinine (the most hydrophobic analyte), for

which no difference was visualised. Gradual variations between 10 and 25% were observed with the increase in hydrophobicity of the compounds. An ANOVA test (with a risk of 5%) was conducted and established that, except for quinine, the mean values were significantly different (data not shown). These results confirmed that, in the absence of a plug of micellar BGE, analytes were lost when the polarity was reversed after the FESI step. This loss was avoided when a plug of micellar BGE was added before switching the polarity, after which, variation of SDS concentration was no more a parameter influencing on corrected peak areas. Figure III-I-5 shows the SDS concentration did not impact on peak heights. In the CSEI-Sweep-MEKC process, SDS used at a higher concentration than its CMC sweeps the cationic analytes previously stacked in the HCB zone while entering into the capillary after the injection step. The sweeping effectiveness was therefore expected to be proportional to analyte retention factors with the micellar phase and hence to SDS concentration and  $\log P$  of analytes. In the present case, SDS concentration had no influence on peak heights, probably because of the high concentration of micelles entering the HCB zone. The fact that the CMC value should be lower in HCB than in the micellar BGE (because of the high salt content and because it is devoid of organic solvent) helped analytes to be more strongly swept by the micelles.

### *III.I.5.3.8. Interactions between the factors*

With the fractional factorial design used, some second order interactions are confused (see section 3.2). However, it was inferred the most likely interactions were those with two parameters having a significant influence. Figure III-I-4 reveals the existence of a significant interaction term  $L_{\text{HCB}} \times t_{\text{inj}}$  for strychnine, atropine and codeine. This emphasized the fact that  $L_{\text{HCB}}$  should be correlated to injection time, because, for a given injection time, the HCB zone length must be long enough to have all compounds trapped in it. An interaction between  $L_{\text{HCB}}$  and  $\kappa_{\text{sample}}$  is also shown in Figure III-I-4 for atropine, nicotine and codeine. Indeed, the velocity of analytes entering the HCB is proportional to the electrical field in sample vial and, as shown in Table III-I-4, could be affected by the length of HCB. Finally for codeine and quinine, the influences of matrix conductivity and injection time seemed to be correlated, but no explanation was proposed for those compounds. Other interactions were observed in Figure III-I-4 and III-I-5, but these behaviors concerned only one or two compounds; hence, no systematic explanations could be found. However, the fact that interactions were observed confirmed the relevance of the chemometric strategy used for this study.

### *III.I.5.3.9. Influence of experiment block: Capillary and day-to-day repeatability*

The design of experiments was constructed so that we could conclude on the influence of capillary and day-to-day repeatability. Four blocks of ten experiments were designed. Each series of ten experiments took around two days of experiments. Two different coated capillaries were used between block 1 and blocks 2, 3 and 4. Both capillary and experiment day had no influence on corrected peak areas. However, an influence on peak height was noticed between blocks 1 and 2, but not between the other blocks. Variations of 10–20% were observed for propranolol, atropine, nicotine and codeine, but there was no influence for quinine and strychnine. As there was no influence between blocks 2, 3 and 4 (for which the same capillary was used), we could conclude there was no impact of day, but the coated capillary had one. These results can be understood in considering that small residual EOF differences affect FESI performance. Indeed, after the runs the measured electroosmotic mobilities were  $9.8 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{V/s}$  with the capillary used for block 1 and  $1.5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{V/s}$  with the capillary used for blocks 2, 3 and 4 (both with 5 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0).

### **III.I.6. Conclusion**

In this study, for the first time to our knowledge, a chemometric approach was used to determine the behavior of parameters influencing FESI-Sweep-MEKC. The obtained results allow the proposal of an optimisation guideline. First of all, some parameters need to be chosen properly. SDS concentration must be the highest as possible but is limited by MEKC separation. In order to obtain the highest SEFs, sample conductivity has to be the lowest as possible; however, it must be controlled to ensure reproducible results (by addition of some salts or BGE), then using ‘pure’ water as matrix is banished. SEFs will increase upon increasing injection time (for instance, up to 1000 s or more), but are limited by mass transfer and/or gradual depletion in sample vial and increase in sample conductivity during the injection. The injection time and the sample conductivity fix the length of the HCB zone that must be long enough so that all the compounds stay trapped in it and its concentration has to be at least 200 mM of phosphoric acid. The water plug, usually suggested when electrokinetic injections are used, is not useful in FESI-Sweep-MEKC because of the long injection. A plug

## Partie III - FESI-Sweep-MEKC- Chapitre I- Etude des paramètres

---

of micellar BGE must be introduced after the electrokinetic injection and before the reversal of the polarity, in order to avoid losses of compounds stacked at the head of the column. The highlight of these correlations between parameters lends support to the multivariate strategy employed in this work. Finally, it has been seen in this study that using phosphate buffer as HCB instead of phosphoric acid might induce a t-ITP step rather than FESI. In order to determine the potential of this, a study in our laboratory has been undergone.

*The authors are thankful to J. P. Quirino for fruitful discussions during his stay at Chimie ParisTech.*

### III.I.7. References

- [1] Moring, S. E., Reel, R. T., Vansoest, R. E. J., *Anal. Chem.* 1993, 65, 3454–3459.
- [2] Suhyeon, K., Weonseop, K., Jong, H. H., *J. Chromatogr. A* 1994, 680, 109–116.
- [3] Culbertson, C. T., Jorgenson, J. W., *Anal. Chem.* 1998, 70, 2629–2638.
- [4] Osaki, H., Itou, N., Terabe, S., Takada, Y., Sakairi, M., Koizumi, H., *J. Chromatogr. A* 1995, 716, 69–79.
- [5] Mikkers, F. E. P., Everaerts, F. M., Verheggen, T. P. T. M., *J. Chromatogr.* 1979, 169, 1–10.
- [6] Burgi, D. S., Chien, R. L., *Anal. Chem.* 1991, 63, 2042–2047.
- [7] Chien, R. L., Burgi, D. S., *J. Chromatogr.* 1991, 559, 141–152.
- [8] Urbánek, M., Křivánková, L., Boček, P., *Electrophoresis* 2003, 24, 466–485.
- [9] Simpson Jr., S. L., Quirino, J. P., Terabe, S., *J. Chromatogr. A* 2008, 1184, 504–541.
- [10] Breadmore, M. C., Dawod, M., Quirino, J. P., *Electrophoresis* 2011, 32, 127–148.
- [11] Breadmore, M. C., Haddad, P. R., *Electrophoresis* 2001, 22, 2464–2489.
- [12] Urbánek, M., Delaunay, N., Michel, R., Varenne, A., Gareil, P., *Electrophoresis* 2007, 28, 3767–3776.
- [13] Lagarrigue, M., Bossée, A., Bégos, A., Delaunay, N., Varenne, A., Gareil, P., Bellier, B., *J. Chromatogr. A* 2008, 1178, 239–247.
- [14] Lagarrigue, M., Bossée, A., Bégos, A., Delaunay, N., Varenne, A., Gareil, P., Bellier, B., *Electrophoresis* 2009, 30, 1522–1530.
- [15] Sarazin, C., Delaunay, N., Varenne, A., Vial, J., Costanza, C., Eudes, V., Minet, J.-J., Gareil, P., *J. Chromatogr. A* 2010, 1217, 6971–6978.
- [16] Foret, F., Sustacek, V., Boček, P., *J. Microcol. Sep.* 1990, 2, 229–233.
- [17] Hirokawa, T., Ohmori, A., Kiso, Y., *J. Chromatogr.* 1993, 634, 101–106.
- [18] Zhang, C.-X., Thormann, W., *Anal. Chem.* 1998, 70, 540–548.
- [19] Chien, R. L., Burgi, D. S., *J. Chromatogr.* 1991, 559, 153–161.
- [20] Quirino, J. P., Terabe, S., *Science* 1998, 282, 465–468.
- [21] Quirino, J. P., Terabe, S., *Anal. Chem.* 2000, 72, 1023–1030.
- [22] Li, X., Hu, J., Han, H., *J. Sep. Sci.* 2011, 34, 323–330.
- [23] Su, H.-L., Feng, L.-I., Jen, H.-P., Hsieh, Y.-Z., *Electrophoresis* 2008, 29, 4270–4276.
- [24] Jin, Y., Meng, L., Li, M., Zhu, Z., *Electrophoresis* 2010, 31, 3913–3920.
- [25] Jong, Y.-J., Ho, Y.-H., Ko, W.-K., Wu, S.-M., *J. Chromatogr. A* 2009, 1216, 7570–7575.

- [26] Luo, X., Jiang, X., Tu, X., Luo, S., Yan, L., Chen, B., *Electrophoresis* 2010, 31, 688-694.
- [27] Yang, Y., Nie, H., Li, C., Bai, Y., Li, N., Liao, J., Liu, H., *Talanta* 2010, 82, 1797–1801.
- [28] Cheng, H.-L., Liao, Y.-M., Chiou, S.-S., Wu, S.-M., *Electrophoresis* 2008, 29, 3665–3673.
- [29] Kim, J.-B., Otsuka, K., Terabe, S., *J. Chromatogr. A* 2001, 932, 129–137.
- [30] Lin, Y., Meng, L., Li, M., Zhu, Z., *Electrophoresis* 2010, 31, 3913–3920.
- [31] Meng, P., Fang, N., Wang, M., Liu, H., Chen, D. D. Y., *Electrophoresis* 2006, 27, 3210–3217.
- [32] Nunez, O., Kim, J.-B., Moyano, E., Galceran, M. T., Terabe, S., *J. Chromatogr. A* 2002, 64, 65–75.
- [33] Lin, Y.-H., Li, J.-H., Ko, W.-K., Wu, S.-M., *J. Chromatogr. A* 2006, 1130, 281–286.
- [34] Cheng, H.-L., Jong, Y.-L., Li, J.-H., Ko, W.-K., Wu, S.-M., *Electrophoresis* 2006, 27, 4711–4716.
- [35] Fang, C., Liu, J.-T., Lin, C.-H., *J. Chromatogr. B* 2002, 775, 37–47.
- [36] Chiang, H.-Y., Shu, S.-J., *Electrophoresis* 2004, 25, 670–676.
- [37] Hjerten, S., *J. Chromatogr.* 1985, 347, 191–198.
- [38] Williams, B. A., Vigh, G., *Anal. Chem.* 1996, 68, 1174–1180.
- [39] Fang, N., Meng, P., Zhang, H., Sun, Y., Chen, D. D. Y., *Analyst* 2007, 132, 127–134.
- [40] Jacquier, J. C., Desbène, P. L., *J. Chromatogr. A* 1996, 743, 307–314.
- [41] Lin, C.-E., *J. Chromatogr. A* 2004, 1037, 467–478.
- [42] Marcus, Y., *Ion properties*, M. Dekker, New York 1997.
- [43] Friedl, W., Reijenga, J. C., Kenndler, E., *J. Chromatogr. A* 1995, 709, 163–170.
- [44] Zhang, C.-X., Thormann, W., *Anal. Chem.* 1996, 68, 2523–2532.
- [45] Kohlraush, F., *Ann. Physik.* 1897, 62, 209–239.
- [46] Quirino, J. P., Terabe, S., *Anal. Chem.* 1998, 70, 1983–1901.

## **CHAPITRE II-Article-Influence de la composition de la zone de haute conductivité sur l'amplification de champ électrique avec une injection électrocinétique couplée avec le *sweeping* en électrophorèse capillaire.**

**Influence of high conductivity buffer composition on field-enhanced sample injection coupled to sweeping in capillary electrophoresis**

Philippe Anres<sup>1, 2, 3</sup>, Nathalie Delaunay<sup>1, 2, 3\*</sup>, Jérôme Vial<sup>2, 3, 4</sup>, Wolfgang Thormann<sup>5</sup>, Pierre Gareil<sup>1, 2, 3</sup>

Electrophoresis, 2012, soumis

<sup>1</sup>Chimie ParisTech, Laboratory of Physicochemistry of Electrolytes, Colloids and Analytical Sciences (PECSA), 75005 Paris, France

<sup>2</sup>UPMC Univ Paris 06, 75005 Paris, France

<sup>3</sup>CNRS, UMR 7195, 75005 Paris, France

<sup>4</sup>ESPCI ParisTech, PECSA, 75005 Paris, France

<sup>5</sup>University of Bern, Clinical Pharmacology Laboratory, Institute for Infectious Diseases, CH-3010 Bern, Switzerland

*Key words: CE, Experimental design, Field Enhanced Sample Injection-Sweeping-MEKC, On-line preconcentration, Simulation*

*Non-standard abbreviations: FESI: Field Enhanced Sample Injection. HCB: High Conductivity Buffer. SEF: Sensitivity Enhancement Factor. UP: Ultra Pure. KRF: Kohlrausch regulation function*

### III.II.1. Abstract

The aim of this work was to clarify the mechanism taking place in field enhanced sample injection coupled to sweeping and micellar electrokinetic chromatography (FESI-Sweep-MEKC), with the utilization of two acidic high conductivity buffers (HCB), phosphoric acid or sodium phosphate buffer, in view of maximizing sensitivity enhancements. Using cationic model compounds in acidic media, a chemometric approach and simulations with SIMUL5 were implemented. Experimental design first enabled to identify the significant factors and their potential interactions. With sodium phosphate buffer, the HCB conductivity increased during the injection, leading to a more efficient preconcentration by stacking (about 1.6 times) than with phosphoric acid alone, for which conductivity decreased during injection. For the same injection time at constant voltage, a lower amount of analytes was injected with sodium phosphate buffer than with phosphoric acid. Consequently sensitivity enhancements were lower for the whole FESI-Sweep-MEKC process. Simulation demonstrates the formation of moving boundaries during sample injection which originate at the initial sample/HCB and HCB/buffer discontinuities and gradually change the compositions of HCB and BGE. Sample components are stacked within the modified HCB zone and migrate without forming an isotachophoretic zone structure. In order to maximize sensitivity enhancements, it is proposed to work with sodium phosphate buffer as HCB and to use constant current during sample injection.

### III.II.2. Introduction

Capillary electrophoresis is a very powerful separation technique, but because of its miniaturized dimensions the sensitivity in concentration is rather low with optical detectors such as UV absorbance (i.e. internal diameter of capillaries 25-100  $\mu\text{m}$ ). In order to increase the sensitivity, several preconcentration techniques (without modifications of the instruments) have been developed since the 1980s, including ITP [1-3], field amplified sample stacking [4-6] and sweeping [7,8]. Because these techniques are based on different mechanisms, they can be hyphenated and still higher sensitivity enhancements are obtained. Two hyphenations are particularly effective: (i) field enhanced sample injection (FESI) with transient-ITP, referred to as electrokinetic supercharging [9,10] and (ii) FESI with sweeping, named FESI-Sweep-MEKC [11,12]. Sensitivity Enhancement Factors (SEF) obtained with the last one are particularly attractive, with almost a million fold, as reported by Quirino and Terabe [11]. It resulted from the combination of long electrokinetic injection (up to 1000 s) with sweeping.

In FESI-Sweep-MEKC, analytes are injected in the absence of electroosmosis from a low conductivity matrix by application of a voltage (positive for cations) into a high conductivity buffer (HCB) zone devoid of organic solvent and occupying a large part of the capillary, while the other part is filled with the BGE containing an organic solvent. By virtue of the electrical field difference (high and low in sample and HCB zones, respectively), analytes are stacked in the HCB and continuous application of the voltage allows more compounds to be trapped in this zone. After the long injection, BGE with organic solvent and micelles (with opposite charges to the analytes) is placed at the inlet and outlet of the capillary, a voltage is applied and micelles entering the HCB zone concentrate the analytes by sweeping. When they encounter the BGE (with organic solvent) at the opposite end of the HCB zone, interactions between analytes and micelles are reduced and MEKC separation proceeds. Because of its high potential, this technique was applied to numerous compounds and matrices for the determination of trace amounts of analytes, allowing limits of detection (LODs) on ppb and ppt levels [13-40].

At first sight, optimization of this technique was thought to be demanding, particularly due to the large number of parameters (injection time, sample conductivity, length and conductivity of the HCB zone, surfactant concentration, water plug length). This is clearly seen in the literature, where no consensus was observed and the impact of the parameters was not fully understood [13-40]. In a recent paper, using a chemometric approach with cationic model compounds (alkaloids), the impact of the abovementioned parameters was elucidated and a

simplified optimization process was proposed [41]. By properly choosing the incoming levels of the experimental factors, only injection time and sample conductivity had a significant influence.

Many types of HCB zones were used, the majority being composed of phosphoric acid and phosphate buffer. However, no justification on the choice of a HCB zone could be found in the literature. Following this assessment, the influence of the HCB composition (phosphoric acid or sodium phosphate buffer) was studied and different profiles of the analytes stacked in the HCB were observed [41]. Peak heights (peak widths) were higher (lower) with sodium phosphate buffer than with phosphoric acid. Based on the calculation of the mobilities, a t-ITP mechanism was suspected to take place when sodium phosphate buffer was substituted for phosphoric acid as HCB, with  $\text{Na}^+$  and  $\text{H}^+$  potentially acting as leading and terminating ions, respectively [41].

In the present work, the influence of HCB composition on the performance of FESI-Sweep-MEKC was further investigated via (i) evaluation of the impact of the HCB composition on peak heights (this parameter is commonly used for LOD determination) by a chemometric approach and (ii) description of the electrokinetic injection of analytes into the HCB zone by simulation using SIMUL5 software. This work was executed with the same cationic model compounds as in the previous study.

### III.II.3. Materials and method

#### III.II.3.1 Chemicals and solutions

HPLC grade acetonitrile (ACN), phosphoric acid ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ , > 80 %), 1 M sodium hydroxide (NaOH) and 0.1 M hydrochloride (HCl) solutions were purchased from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Sodium monobasic ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , > 99 %), sodium dodecyl sulphate (SDS, > 99 %), quinine, DL-propranolol hydrochloride, strychnine hydrochloride, atropine, (-)-nicotine and codeine, all of 99 % purity, were from Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France). Ultra-pure (UP) water was delivered by a Direct-Q3 UV system (Millipore, Molsheim, France).

The compositions of used buffers were: 46 mM sodium phosphate buffer (22 mM ionic strength), pH 2.1; 2, 6 and 9 mM sodium phosphate buffer, pH 2.9, were obtained by diluting the 46 mM sodium phosphate buffer pH 2.1 with UP water. Stock solution of 250 mM SDS was prepared by dissolving the appropriate amount in UP water. BGE without micelle was obtained by adding 20 % ACN (v/v) in 46 mM sodium phosphate buffer and BGE with micelles was obtained by

adding 20 % ACN (v/v) and the appropriate amount of SDS (from the stock solution) to have a final SDS concentration of 70 mM in the ACN-water mixture. The different HCBs were prepared as follows: for 0 mM sodium ion concentration and a targeted conductivity  $\kappa$  of 1.66 S/m, 200 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 1.3 was used; for 0 mM sodium and a  $\kappa$  value of 2.09 S/m, 300 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 1.2 was used; for 100 mM sodium ion concentration and a  $\kappa$  value of 1.66 S/m, 348 mM sodium phosphate buffer (120 mM ionic strength, pH 1.7) was used; for 100 mM sodium ion and a  $\kappa$  value of 2.09 S/m, 457 mM sodium phosphate buffer (126 mM ionic strength, pH 1.6) was used; for 50 mM sodium ion concentration and a  $\kappa$  value of 1.87 S/m, 412 mM sodium phosphate buffer (84 mM ionic strength, pH 1.5) was used. Three stock mixture solutions of quinine, propranolol, strychnine, atropine, nicotine and codeine at 150 mg/L each were prepared by dissolving them in 2, 6 or 9 mM sodium phosphate buffers, pH 2.1 (then stored at 4°C in a refrigerator). The desired concentration (20 ppb) was obtained by successive dilutions of stock mixture solutions in the appropriate buffers. All solutions were daily prepared, filtered through 0.20  $\mu$ m membrane disks before use (VWR). All indicated pH values were those measured.

### *III.II.3.2. Apparatus and software*

All CE experiments were carried out with an Agilent Technologies 7100 CE system (Massy, France) equipped with a DAD (deuterium lamp) set at 200 nm for strychnine, atropine and codeine, 220 nm for propranolol, 250 nm for quinine and 260 nm for nicotine (bandwidth of 20 nm, reference wavelength at 340 nm with a bandwidth of 40 nm). Separations were performed in a 60 cm (effective length: 51.5 cm) x 50  $\mu$ m id fused-silica capillary tube (Photonlines, Marly-le-Roi, France). A personal computer using HP 3D ChemStation controlled the HP 7100 CE instrument and allowed data analysis. The statistical data analyses were performed using JMP 5.1 (S.A.S Institute Inc, Cary, NC, USA), Excel 2010 (Microsoft Corporation, Courtaboeuf, France) and simulations were performed with SIMUL5 (freely downloaded from [www.natur.cuni.cz/Gas](http://www.natur.cuni.cz/Gas) [42]).

### *III.II.3.3. Capillary treatment*

New capillaries were activated by flushes under 1 bar with 1 M NaOH, then 0.1 M NaOH and water (10 min each). Every day, the capillary was flushed under 1 bar for 10 min with 0.1 M NaOH followed by the micellar BGE for 10 min (46 mM aqueous sodium phosphate buffer, pH 2.1/ACN 80:20 (v/v) containing 70 mM SDS) and a voltage of -15 kV was applied for 10

min. Before each experiment, the capillary was flushed with the desired BGE without micelles for 5 min. At the end of the day, the capillary was flushed with UP water for 5 min.

### ***III.II.3.4. General FESI-Sweep-MEKC procedure***

Briefly, the capillary was first filled with the BGE without micelles followed by the introduction of a HCB zone under 50 mbar. Next, analytes were injected applying a voltage of +15 kV with BGE without micelles at the outlet and sample solution at the inlet. Injection voltage of +15 kV was used because smooth current curves were obtained and so more reproducible injections [30]. After injection of analytes, the voltage was switched to reverse polarity (-15 kV) with the micellar BGE at the inlet and outlet, thus allowing the entry of micelles for sweeping and subsequent separation by MEKC. Injection time, length and conductivity of HCB zone, and sample conductivity were varied regarding the experimental design.

### ***III.II.3.5. Procedure to highlight the influence of the HCB composition***

The two acidic HCB series containing only hydrogen cation for the first one and both hydrogen and sodium cations for the second one were composed of 200 and 300 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> at pH 1.3 and 1.2, respectively, and 348 (120 mM ionic strength) and 457 mM (126 mM ionic strength) of sodium phosphate buffer at pH 1.7 and 1.6, respectively. The chosen concentrations corresponded to 1.66 and 2.09 S/m conductivities, respectively. HCB zones were introduced under 50 mbar for 113 s (corresponding to 20 % of the capillary length). A mixture of the analytes, diluted in 2 mM sodium phosphate buffer pH 2.1 (330 ppb atropine, 280 ppb nicotine, 300 ppb quinine, 250 ppb codeine, 245 ppb propranolol hydrochloride and 261 ppb strychnine hydrochloride), were electrokinetically injected at +15 kV for 500 s. Afterwards, a pressure of 50 mbar was applied to the inlet vial with the BGE without micelle in the inlet and outlet vials for the mobilization of the entire HCB zone to the detection window.

### III.II.4. Design of experiment

#### *III.II.4.1. Choice of the factors and responses*

Considering previous works reported in the literature [13-40], the conclusions from our previous work [41] and the recognized mechanism of FESI-sweep-MEKC, five potentially influential factors were selected: HCB conductivity ( $\kappa_{\text{HCB}}$ ), HCB zone length ( $L_{\text{HCB}}$ ), injection time ( $t_{\text{inj}}$ ), sample conductivity ( $\kappa_{\text{sample}}$ ) and sodium concentration in HCB ( $[\text{Na}^+]$ ). The chosen response to evaluate the influence of each factor was the peak height, which was proportional to the SEFs by FESI and sweeping.

#### *III.II.4.2. Choice of the design of experiment*

The chemometric approach consisted in a two-level fractional design ( $2^{5-1}$ ) for five factors, with 4 center points. With this design of experiment, main factor effects were confounded with third order interactions (four-factor interactions) and first order interactions (two-factor interactions) were confounded with second order interactions (three-factor interactions). Because second order and third order interactions were not realistic, main factor effects and first order interactions were then estimated independently.

#### *III.II.4.3. Factor levels*

Injection times were from 500 to 1000 s. Analytes were diluted in sodium phosphate buffers with conductivity levels from 0.05 to 0.16 S/m. The HCB conductivity values were chosen at 1.66, 1.87 and 2.09 S/m. HCB zone lengths were chosen between 20 and 40 % of the capillary length. Sodium concentration in HCB was set at 0, 50 and 100 mM. Factor levels in initial and coded values of the fractional design are given in Table III-II-1.

#### *III.II.4.4. Matrix of experiments*

The fractional design was composed of 16 experiments and 4 center points repeated twice; hence, a total of 40 experiments was performed (See Table III-II-2). Experiments were randomized to avoid being affected by uncontrolled factor variations.

Experiment	$\kappa_{\text{HCB}}$	$[\text{Na}^+]$	$L_{\text{HCB}}$	$t_{\text{inj}}$	$\kappa_{\text{sample}}$
1	-	-	-	+	-
2	+	-	-	-	-
3	-	-	+	+	+
4	0	0	0	0	0
5	+	+	+	-	-
6	+	+	-	-	+
7	0	0	0	0	0
8	+	+	+	+	+
9	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0
12	-	+	-	-	-
13	+	-	-	+	+
14	-	-	+	-	-
15	-	+	-	+	+
16	+	-	+	-	+
17	+	-	+	+	-
18	-	+	-	-	-
19	+	-	+	+	-
20	-	-	-	-	+
21	-	-	-	-	+
22	-	-	+	-	-
23	+	-	-	-	-
24	-	+	+	-	+
25	-	+	-	+	+
26	+	+	+	+	+
27	0	0	0	0	0
28	+	+	-	-	+
29	-	-	+	+	+
30	+	-	-	+	+
31	+	+	-	+	-
32	-	+	+	+	-
33	0	0	0	0	0
34	-	+	+	+	-
35	-	+	+	-	+
36	+	-	+	-	+
37	+	+	+	-	-
38	0	0	0	0	0
39	-	-	-	+	-
40	+	+	-	+	-

Table III-II-2: Matrix of experiments for the design of experiments in coded values.

### III.II.4.5. Determination of the effects

Factor effects were calculated by classical least-squares multiple linear regression. Hence, the following model was retained,  $Y = \text{intercept} + \sum_i E_i X_i + \sum_i \sum_j E_{ij} X_i X_j$ , where  $Y$  is the predicted response from linear model, intercept was the constant term,  $E_i$  the coefficient of factor  $X_i$  (i.e. the effect of factor  $X_i$ ),  $E_{ij}$  the coefficient of the interaction between factors  $X_i$  and  $X_j$ . As a first-order model equation was applied, second-order interactions and above were

assumed to be negligible and, therefore, were not calculated. Effect significance was evaluated by comparing the coefficient to its standard-deviation (obtained from the repeated measurements and the lack of fit of the model) thanks to a t-test with a risk of first kind of 5 %. To better realize the impact of the factors, coefficients were expressed as relative effects, i.e., effect normalized by the average value of the response.

### III.II.5. Computer simulations of the FESI process

Computer simulations were performed using SIMUL5 developed by Gaš et al. [42]. The software was implemented on a PC featuring an AMD Sempron™ 145 2.8 GHz processor. Simulations were performed for a 60 mm capillary which was divided into 4000 equal segments, an applied constant voltage of + 1000 V, an electroosmotic flow of  $1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , and with activation of ionic strength corrections. With this voltage, the electrical fields in the capillary are somewhat different than those obtained in the experiments. They are, however, of the same order of magnitude. Simulations were also conducted at constant current (10  $\mu\text{A}$ ) in order to analyze the shape of moving boundaries. Absolute mobilities and pKa values of analytes used were those published in a recent paper [41] and the corresponding values for buffer components were taken from the data base of SIMUL5. The capillary was divided into three zones of 2, 19.6 and 78.4 % length of capillary, in order to represent the sample, HCB and BGE, respectively.

The sample composition was as follow: 0.64 mM  $\text{Na}^+$ , 2 mM phosphoric acid,  $1.73 \times 10^{-3}$  mM  $\text{Cl}^-$ ,  $1.14 \times 10^{-4}$  mM (380 ppb) atropine,  $1.73 \times 10^{-3}$  mM (280 ppb) nicotine,  $8.76 \times 10^{-4}$  mM (300 ppb) quinine,  $8.35 \times 10^{-4}$  mM (250 ppb) codeine,  $9.45 \times 10^{-4}$  mM (245 ppb) propranolol,  $7.82 \times 10^{-4}$  mM (261 ppb) strychnine;  $\kappa = 0.047 \text{ S/m}$ , pH 2.98. The BGE composition was: 14.7 mM  $\text{Na}^+$ , 45.7 mM phosphoric acid ( $\kappa = 0.42 \text{ S/m}$ , pH 2.12). The phosphoric acid-based HCB was entered as: 0 mM  $\text{Na}^+$ , 200 mM phosphoric acid ( $\kappa = 1.42 \text{ S/m}$ , pH 1.48), and the phosphate buffer-based HCB as: 100 mM  $\text{Na}^+$ , 348 mM phosphoric acid ( $\kappa = 1.35 \text{ S/m}$ , pH 1.78).

### III.II.6. Results and discussions

The aim of this work was to further elucidate the influence of the HCB composition on FESI-Sweep-MEKC. In the previous study [41], phosphoric acid was used as HCB and the impact

## Partie III - FESI-Sweep-MEKC- Chapitre II- Simulation

of each experimental parameter influencing the preconcentration mechanism was evaluated using a chemometric approach. For analyte injection into the HCB zone, a t-ITP mechanism was suspected when sodium phosphate buffer was used as HCB with  $\text{Na}^+$  and  $\text{H}^+$  being the leading and the terminating ions, respectively [41]. In this work, an experimental design was also used, but with different experimental parameters (see paragraph 3.1). This approach allowed to further investigate the hypothesis of a t-ITP mechanism, but also to re-evaluate the impact of the experimental parameters. Indeed, as with sodium phosphate buffer-based HCB a different mechanism was suspected than with phosphoric acid-based HCB, different behaviors of the experimental parameters could be observed. Moreover, an uncoated fused-silica capillary was used rather than a linear polyacrylamide coated capillary, because peak heights were noted to be slightly dependent on the batch of the coated capillary.

Coded levels		-1	0	+1
$\kappa_{\text{HCB}}$	HCB conductivity (S/m)	1.66	1.87	2.09
$L_{\text{HCB}}$	Length of HCB (% of capillary length)	20	30	40
$t_{\text{inj}}$	Sample injection time (s)	500	750	1000
$\kappa_{\text{sample}}$	Sample conductivity (S/m) ( $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 2.1)	0.05	0.10	0.16
	<i>Corresponding phosphate concentration (mM)</i>	2	6	9
$[\text{Na}^+]$	Sodium concentration in HCB (mM)	0	50	100

Table III-II-1: Initial and coded values for the different studied factors.

### **III.II.6.1. Choice of the factor levels**

It was previously shown that the water plug loaded after the HCB at the inlet of the capillary was not useful in FESI-Sweep-MEKC and the SDS concentration did not impact peak heights when it was higher than 50 mM [41]. Consequently, no water plug was used and the final SDS concentration in BGE was fixed at 70 mM. Injection times and conductivities of HCB and sample were fixed at the same values as in our previous work. The length of the HCB zone was slightly increased and varied between 20 and 40 % of capillary length such that all compounds stayed trapped in the HCB zone. As in t-ITP analyte concentrations are expected to be adjusted to leading ion concentration, the  $\text{Na}^+$  concentration in the HCB zone was varied from 0 mM (corresponding to phosphoric acid) to 100 mM (corresponding to sodium

phosphate buffer). Factor levels, in initial and coded values, of the fractional design are shown in Table III-II-1.

### *III.II.6.2. Influence of the experimental parameters*

Experimental results in the format of the relative effects of each experimental factor on peak heights are depicted in Figure III-II-1. The given values correspond to the variation, normalized by the average value, of the answer when the given experimental factor varies from level -1 to level 0. Factor interactions were not represented for simplicity, as only few of them were relevant and no systematic influence was observed.

Injection time ( $t_{inj}$ ) was varied between 500 and 1000 s. Figure III-II-1 shows that upon increasing injection time peak heights increased as well and the observed behaviors are the same as in the previous study [41].

Sample conductivity ( $\kappa_{sample}$ ) was varied between 0.05 and 0.16 S/m. Data of Figure III-II-1 show that sample conductivity had a negative impact on peak heights (30-40 %). This behavior, including its magnitude, was already observed in the previous study [41].

In the present work, the HCB zone length ( $L_{HCB}$ ) was varied between 20 and 40 % of the capillary length. As can be seen in Figure III-II-1, an increase in  $L_{HCB}$  may have a slight positive or no influence on peak heights, according to analytes. These results are globally consistent with those obtained previously, since no impact had been observed for most analytes [41].

The HCB conductivity ( $\kappa_{HCB}$ ) was varied between 1.66 and 2.09 S/m. Figure III-II-1 shows that  $\kappa_{HCB}$  may have a slight positive, negative or no impact on peak heights. These behaviors confirm the results obtained previously, as this parameter did not seem to influence peak heights [41].

Finally, the concentration of sodium ion ( $[Na^+]$ ) in the HCB zone was varied between 0 and 100 mM. As shown in Figure III-II-1,  $[Na^+]$  had a negative effect for all analytes, by 10 to 20 %. If a t-ITP mechanism was to take place with sodium as the leading ion, analyte concentrations would be adjusted to  $[Na^+]$ , and a positive impact of  $[Na^+]$  would result. Henceforth, two assumptions can be contemplated: firstly, there were some unresolved issues with t-ITP kinetics, or secondly, t-ITP was not occurring at all.

The developed chemometric approach allowed us to confirm the influences of injection time, sample conductivity and HCB conductivity on the performances of FESI-Sweep-MEKC. The

experimental design does not support the hypothesis of t-ITP occurring during sample injection into the HCB zone when a sodium phosphate buffer-based HCB is employed.

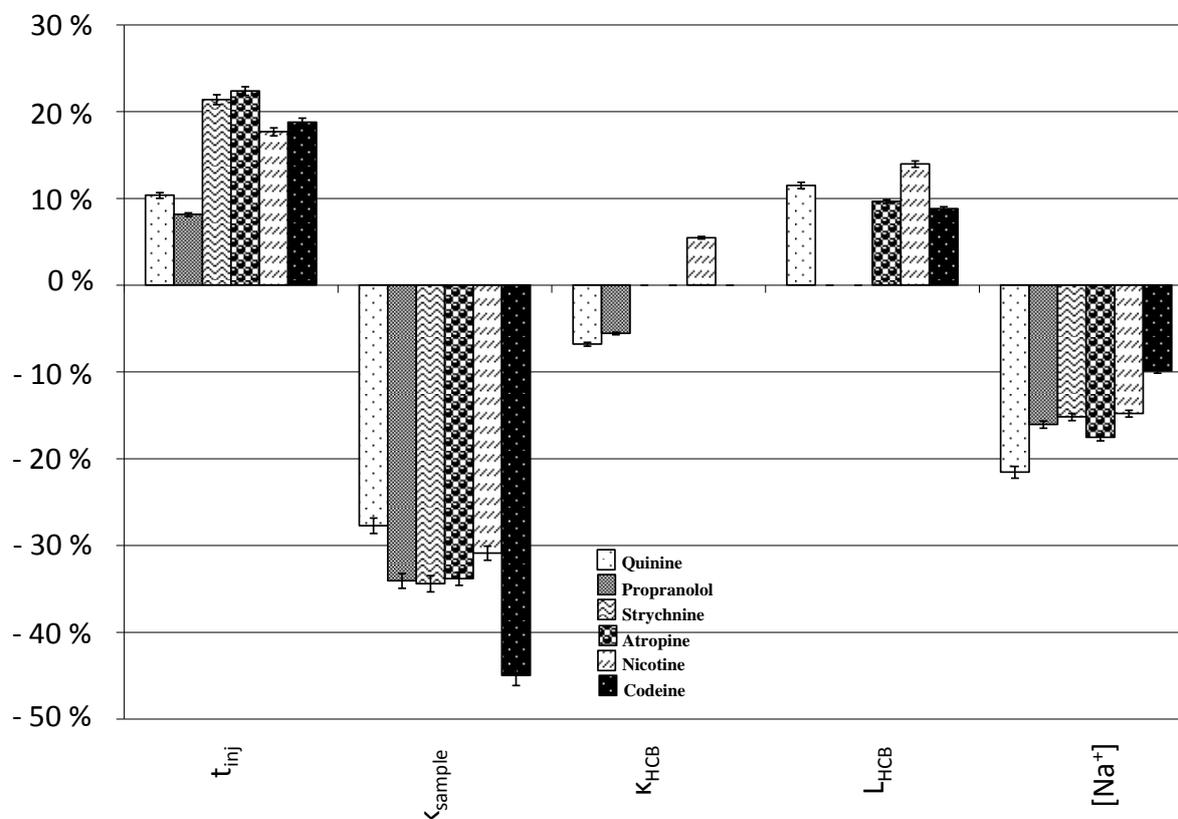


Figure III-II-1: Relative effects of each experimental factor on peak heights for the FESI-Sweep-MEKC process. The indicated values correspond to the variation, normalized by the average value, of the answer when the given experimental factor varies from level -1 to 0. Bars stand for one standard deviation. Only significant effects are reported. Factors are injection time ( $t_{inj}$ ), sample conductivity ( $\kappa_{sample}$ ), HCB conductivity ( $\kappa_{HCB}$ ), HCB zone length ( $L_{HCB}$ ), and sodium ion concentration in HCB zone ( $[Na^+]$ ).

### III.II.6.3. Deeper insight into the influence of the nature of the HCB on the FESI step

The influence of the HCB composition on the preconcentration effect was further studied by focusing on the FESI step only. To do so, the six analytes prepared in low conductivity buffer were electrokinetically injected for 500 s followed by hydrodynamic mobilization of the zones passed the detector in the absence of applied voltage. Phosphoric acid and sodium phosphate buffer (100 mM  $Na^+$  ions) as HCB were investigated at two levels of conductivity (Figure III-II-2). For both HCB compositions, stacking became more efficient upon increasing

the HCB conductivity, as a result of the decrease in electrical field in this zone. Secondly, at the same conductivity level, peak heights were higher (by a factor of 1.6 to 1.9) with sodium phosphate buffer (Figures III-II-2C-D) than with phosphoric acid alone (Figures III-II-2A-B). This indicates that stacking is more efficient with sodium phosphate buffer. This behavior was unexpected as conductivity ratios are the same between these two HCBs.

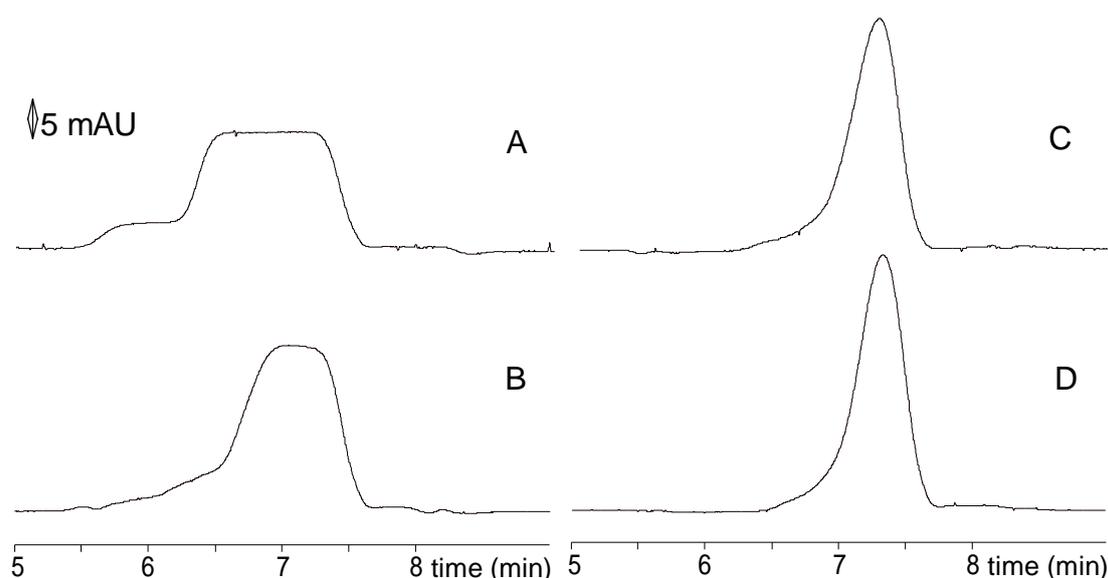


Figure III-II-2: Influence of HCB composition and concentration on field enhanced sample injection observed after pressure mobilization (50 mbar) of electrophoretic bands. (A) 200 mM  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (1.66 S/m, pH 1.3); (B) 300 mM  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (2.09 S/m, pH 1.2); (C) 348 mM sodium phosphate buffer pH 1.7 (1.66 S/m); (D) 457 mM sodium phosphate buffer pH 1.6 (2.09 S/m). Bare fused-silica capillary, 50  $\mu\text{m}$  id x 50 cm (detection, 41.5 cm). BGE: 46 mM sodium phosphate buffer, pH 2.1/ACN 8:2, (v/v). Hydrodynamic introduction of HCB (50 mbar, 113 s, 20 % capillary length). Electrokinetic injection (+ 15 kV, 500 s). Sample: 330 ppb atropine, 280 ppb nicotine, 300 ppb quinine, 250 ppb codeine, 245 ppb propranolol, 261 ppb strychnine in 2 mM sodium phosphate buffer, pH 2.1. Detection at 200 nm.

Peak areas were lower with sodium phosphate buffer (Figures III-II-2C-D) than with phosphoric acid alone (Figures III-II-2A-B). Figure III-II-3A shows the variations of the current intensity recorded during two of the four different injection conditions of Figure III-II-2. With phosphoric acid alone, the current intensity first increased, reached a maximum and decreased thereafter, while with sodium phosphate buffer, the current decreased all the time. This variation in current intensity is consistent with the fact that, from the chemometric

## Partie III - FESI-Sweep-MEKC- Chapitre II- Simulation

approach, factor  $[\text{Na}^+]$  was found to have a negative influence on the SEFs obtained by FESI-Sweep-MEKC. Indeed, the injected amount of analytes should be proportional to the amount of electricity involved during the injection.

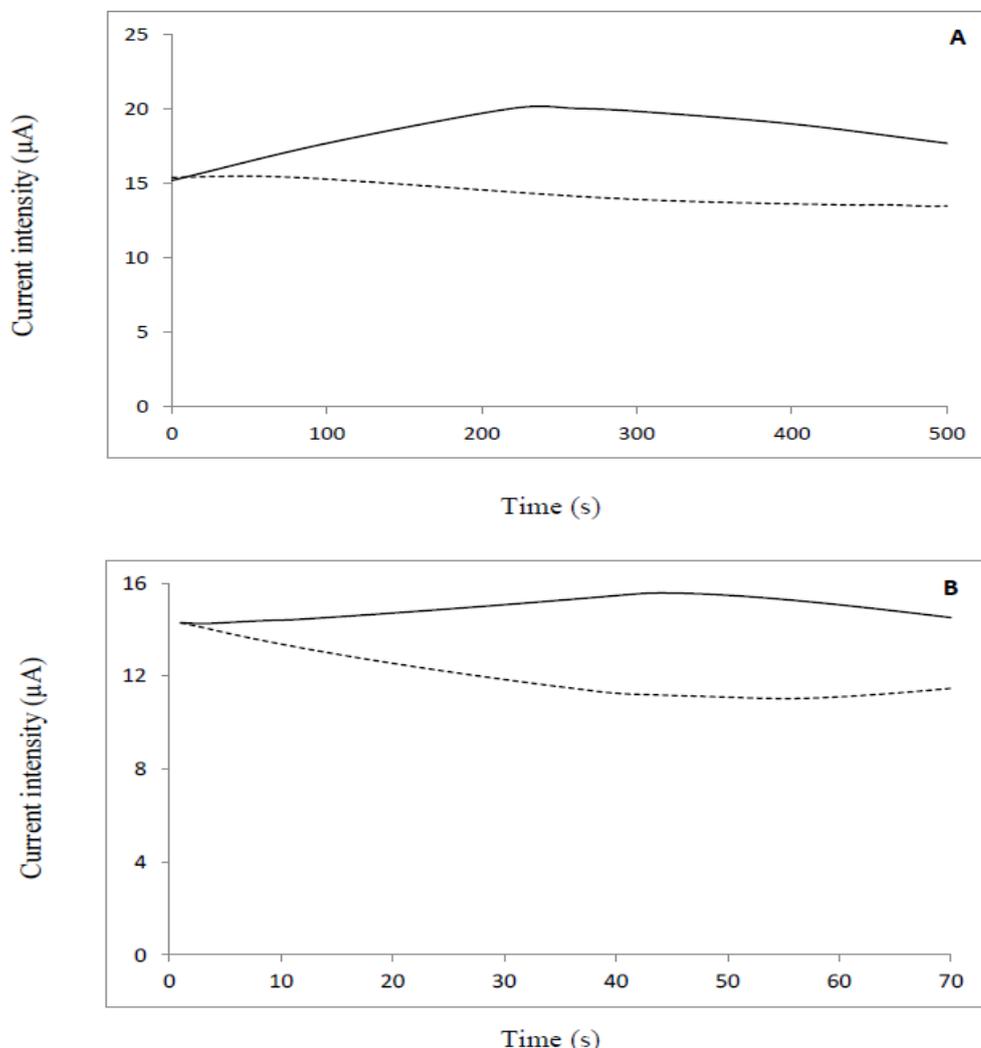


Figure III-II-3: Influence of the HCB composition on the evolution of the current during the electrokinetic injection of the sample mixture (quinine, propranolol, strychnine, atropine, nicotine and codeine). (A) experimental results at constant voltage (+ 15 kV) for 500 s; full line 200 mM phosphoric acid, pH 1.3 and dashed line: 348 mM sodium phosphate buffer, pH 1.7, other conditions see Figure 2. (B) simulation results for an injection time of 70 s; full line, 200 mM phosphoric acid-based HCB and dashed line, 100 mM  $\text{Na}^+$  and 348.2 mM phosphoric acid-based HCB. Capillary length, 60 mm, divided into 4000 segments. Applied voltage, + 1000 V. Capillary set up with sample, HCB and BGE occupying 2 %, 19.6 % and 78.4 % capillary length, respectively. BGE: 14.7 mM  $\text{Na}^+$ , 45.7 mM phosphoric acid. Sample: 0.64 mM  $\text{Na}^+$ , 2 mM phosphoric acid,  $1.73 \times 10^{-3}$  Cl<sup>-</sup>,  $1.14 \times 10^{-4}$  mM atropine,  $1.73 \times 10^{-3}$  mM nicotine,  $8.76 \times 10^{-4}$  mM quinine,  $8.35 \times 10^{-4}$  mM codeine,  $9.45 \times 10^{-4}$  mM propranolol,  $7.82 \times 10^{-4}$  mM strychnine.

As derived from Figure III-II-3A, this amount is lower with sodium phosphate buffer than with phosphoric acid, resulting in a lower amount of injected analytes. Eventually, as sweeping is more efficient with higher amounts of analytes, the final peak heights are lower when sodium phosphate buffer was used as HCB [7].

Even though the variation in current intensity is consistent with the conclusions drawn from the design of experiment, the stacking mechanism involved inside the HCB zone according to its composition remains to be explained. Although conductivity levels were identical at the start of the injections, the observed peak shapes and the evolution of the current intensities were not similar. These differences support the assumption that dynamics of buffer components taking place in the HCB zone during the injection are dependent on HCB composition. A first explanation that came to mind was a t-ITP mechanism with sodium and hydronium ions acting as leading and terminating ions, respectively, as already contemplated previously [41]. To support this hypothesis, effective mobilities in HCB were calculated in order to check if the mobility requirements are satisfied and confronted to other experiments (see supporting information). These supplementary results did not positively conclude on a t-ITP mechanism. Hence, numerical simulation taking into account the migration dynamics of all species was implemented.

### *III.II.6.4. Simulation of the FESI process*

Computer simulation is a very effective tool to understand the effect of the dynamics of moving boundaries, resulting from electrolyte discontinuities inside a capillary [42-45]. This approach was used in the present case for the FESI step with phosphoric acid or sodium phosphate buffer as HCB (chosen conductivity around 1.40 S/m). Mobility and pKa values taken for simulation were those for water, as they are not available for a water/ACN 80:20 (v/v) mixture corresponding to BGE solvent composition. This may result in some discrepancies between experiments and simulations. The concentrations of all the analytes, sodium ion and phosphoric acid, as well as conductivity and pH at different time points (0, 10, 20, 30, 40 and 70 s) along the capillary for two configurations are given in Figures 4 (200 mM phosphoric acid as HCB, pH 1.48,  $\kappa = 1.42$  S/m) and 5 (sodium phosphate buffer composed of 100 mM NaOH and 348 mM phosphoric acid, pH 1.78,  $\kappa = 1.35$  S/m). With the data of these figures, five general conclusions can be drawn: (i) HCB and BGE zone compositions are changing upon current flow due to the formation of moving concentration boundaries

which originate at the initial buffer discontinuities; (ii) migrating boundaries exhibit steady-state or broadening concentration gradients; (iii) stationary concentration/dilution boundaries are formed at the inlet/outlet ends of the HCB zone; (iv) sample components are electrokinetically stacked at the sample/HCB interface and migrate as plateau-shaped zones of increasing length; (v) the phosphoric acid HCB zone evolves differently compared to that containing sodium phosphate buffer.

When 200 mM phosphoric acid is used as HCB (see Figure III-II-4, panel A, time points 10-40 s), the penetration of sodium ions from the sample into the HCB zone results in the formation of a zone with the concentration adjusted according to the Kohlrausch regulation function (KRF) [46,47] and a steady-state moving front boundary. This zone with increasing length has a somewhat lower phosphoric acid concentration (panel A), a lower conductivity (panel C) and a higher pH (panel C) compared to the original HCB zone. Another moving boundary is formed at the HCB/BGE interface resulting from the vanishing of sodium ions. This boundary is rapidly broadening and changes the properties of the BGE (time points 10-40 s, panels A and C). When the sodium boundary migrating through the HCB zone reaches its cathodic end, a new migrating steady-state boundary is formed (Figure III-II-4, panel A, time points 40-70 s), which gradually changes the composition of the BGE again, inverting the variation of conductivity and pH (Figure III-II-4, panel C, time frames 40-70 s).

Analytes become stacked at the sample/HCB interface (by a factor of 25 to 45) and migrate as zones with distinct plateau concentrations within the newly formed HCB zone. The speed of each front boundary is proportional to the analyte mobility (Figure III-II-4, panel B, time frames 10-40 s). Figure III-II-6A shows the moving front boundaries of nicotine within the HCB zone, simulated at constant current, after 20 and 30 s. In order to compare the evolution of their shapes more easily, the front boundary at time 20 s was overlaid to that predicted for 30 s (shift of 1.58 mm). As can be seen, this moving boundary is spreading with time, due to diffusion, and it does not exhibit a conductivity change as is customary in ITP. Therefore, the boundary has no steady-state form, and hence the stacking mechanism is not an ITP process. Later on, when a sample reaches the cathodic end of the HCB zone, it becomes diluted to a new concentration value according to the KRF and keep on migrating within the adjusted BGE (Figure III-II-4, panel B, time 70 s).

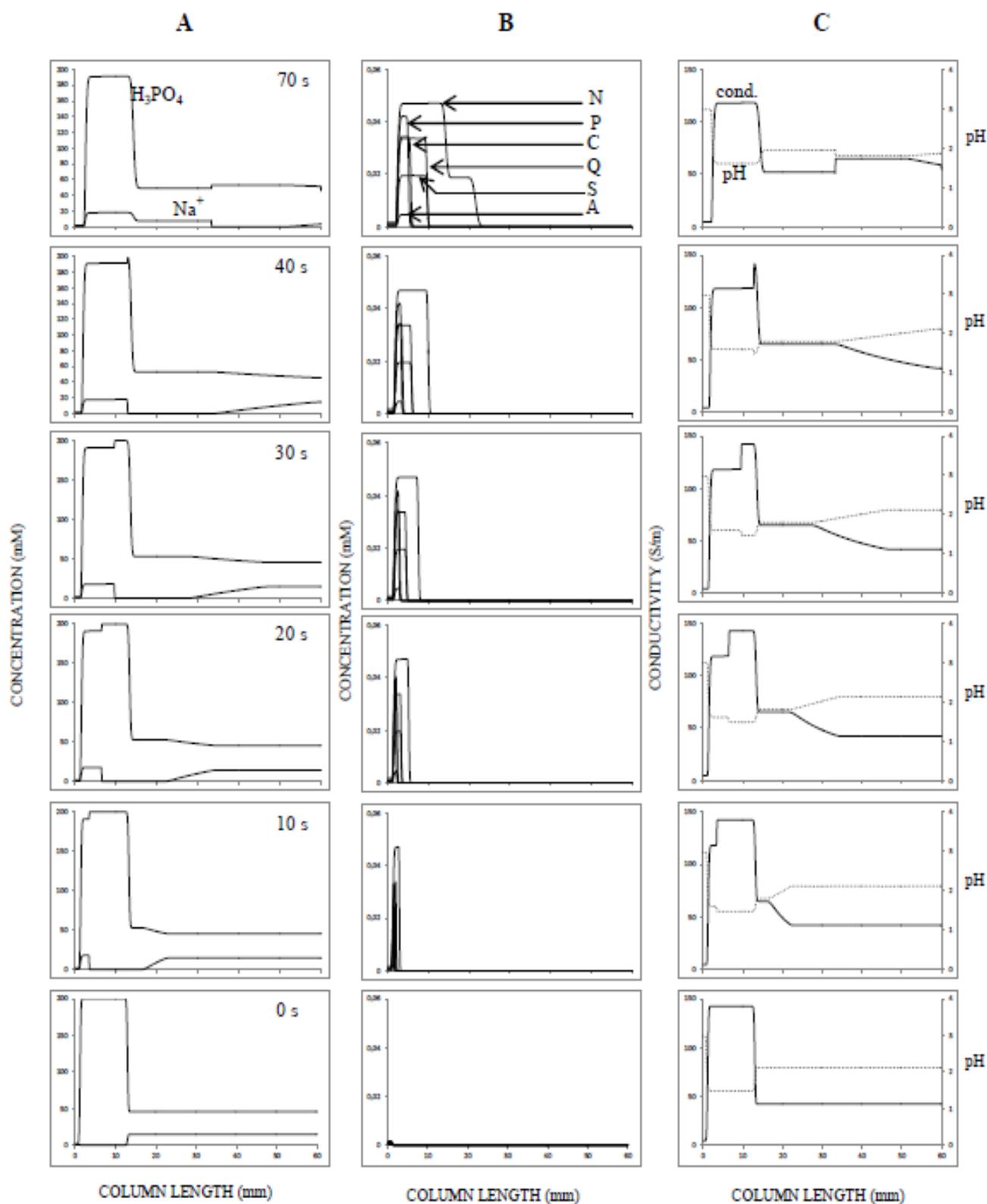


Figure III-II-4: Simulation of the FESI process for the case of 200 mM phosphoric acid as HCB (pH 1.48,  $\kappa = 1.424$  S/m). Other conditions see Figure III-II-3B.

When sodium phosphate buffer (100 mM Na<sup>+</sup> ion, 348 mM phosphoric acid) is used as HCB, a similar behavior is observed. However, a non-steady state moving boundary within the HCB zone is formed (Figure III-II-5, panel A, time frames 10-40 s) and the conductivity of the changing HCB zone increases (Figure III-II-5, panel C, time frames 10-40 s). When this boundary migrating through the HCB zone reaches its cathodic end, a new moving boundary with no steady state is formed (see Figure III-II-5, panel A, time frames 40-70 s) and the composition of the BGE, as well as conductivity and pH, are gradually changing (Figure III-II-5, panel C, time frames 40-70 s). Furthermore, a steady-state moving boundary is formed at the initial HCB/BGE interface (Figure III-II-5, panel A, time frames 10-30 s), resulting in a decrease in BGE conductivity and an increase in pH (Figure III-II-5, panel C, time point 10-30 s). With this HCB composition, analytes become more efficiently stacked at the sample/HCB interface (41-75 fold, instead of 25-45 with phosphoric acid). They migrate as zones with plateau concentrations, the velocities being dependent on their mobilities. However, because conductivity in this HCB zone becomes higher than with phosphoric acid, analytes migrate slower and remain trapped in the HCB zone even after 70 s. The moving front boundaries of nicotine at times 20 and 30 s are presented in Figure III-II-6 B (simulation at constant current). For comparison purposes, the front boundary at time 20 s was overlaid after an x-axis shift of 1.07 mm. As for the case of phosphoric acid HCB, this moving boundary is spreading with time, therefore, there is no steady-state, and hence, no ITP stacking.

SIMUL 5 allows to predict the temporal behavior of the current intensity, as is presented in Figure III-II-3B. With phosphoric acid as HCB, the current first increases before it decreases, while with sodium phosphate buffer as HCB, it first decreases, then stabilizes, before it slightly increases. Direct comparison of the current intensities with the ones obtained experimentally (Figure III-II-3A) cannot be made, because the applied electric fields are not equal (voltage/capillary length ratio and mobility data taken for aqueous solutions). Nevertheless, close agreement is obtained for relative intensity variations with experimental results. Furthermore, simulation at constant voltage confirms and explains that the number of Coulomb involved during electrokinetic injection is lower with sodium phosphate buffer as HCB than with phosphoric acid alone. Thus, smaller amounts of analytes become injected per unit time under these conditions.

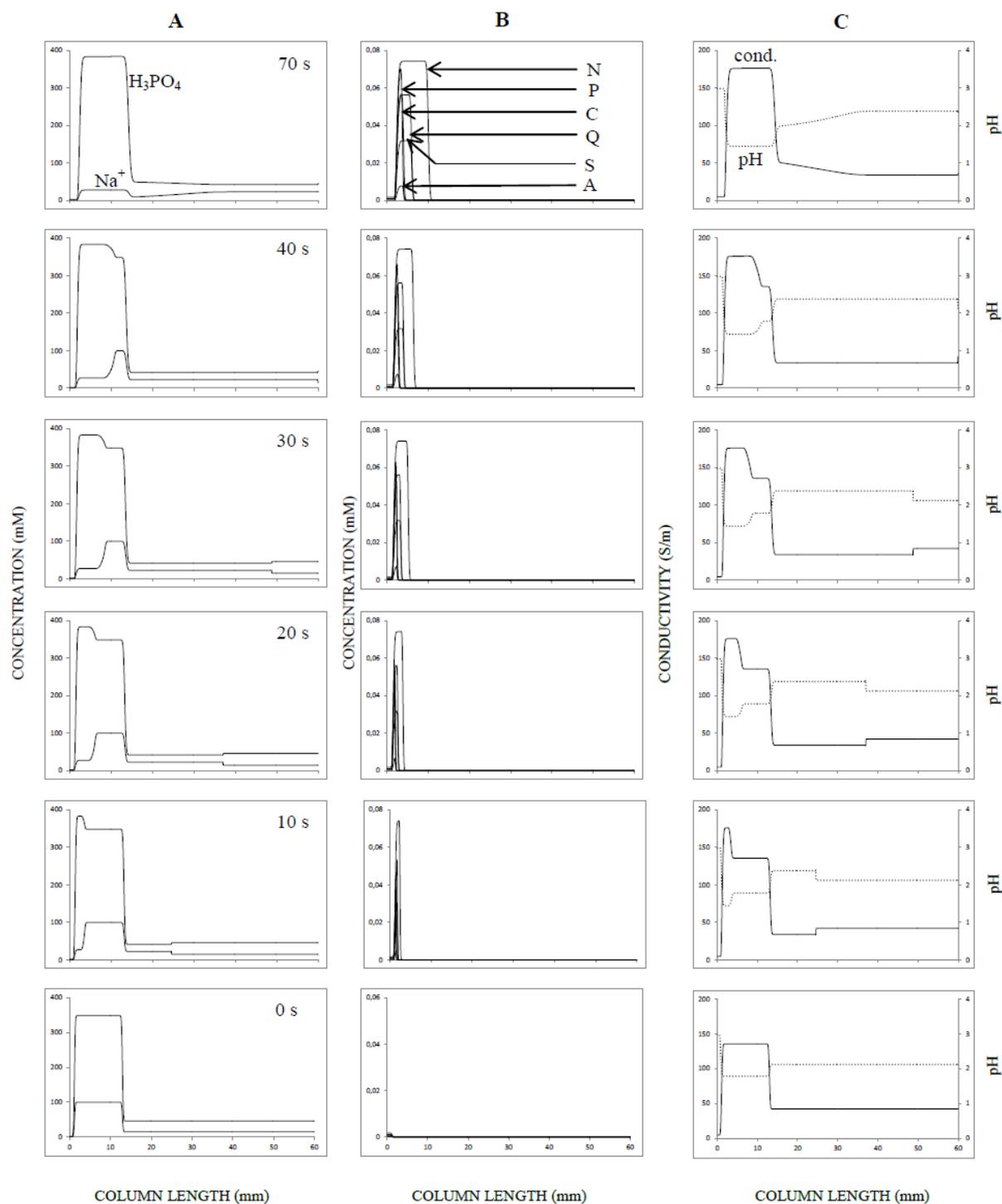


Figure III-II-5: Simulation of the FESI process for the case of 100 mM NaOH and 348 mM phosphoric acid as HCB ( $\text{pH} = 1.78$ ,  $\kappa = 1.354 \text{ S/m}$ ). Other conditions see Figure III-II-3B.

BG

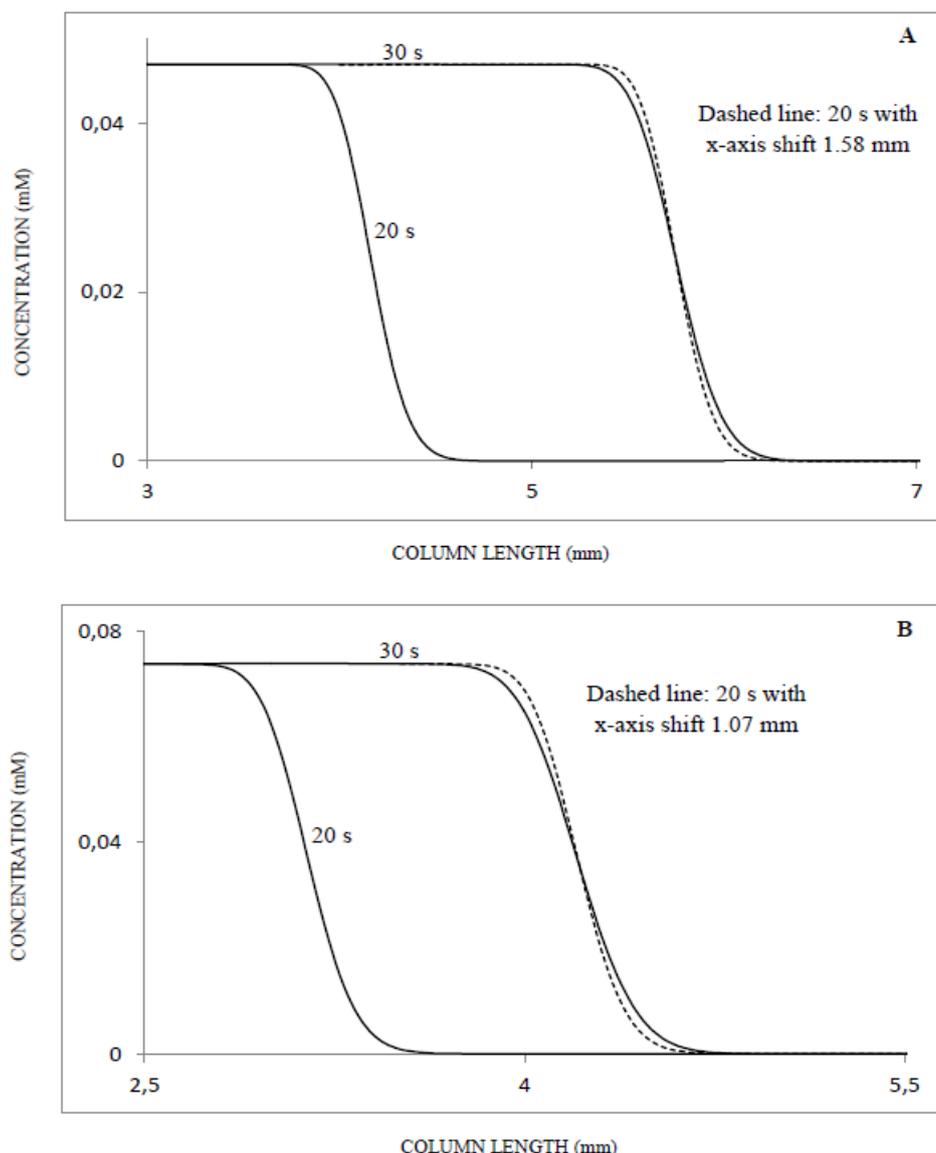


Figure III-II-6: Simulation at constant current ( $10 \mu\text{A}$ ) of the shape of the moving front boundary of nicotine after 20 and 30 s of electrokinetic injection, in case of (A) 200 mM phosphoric acid HCB and (B) 100 mM NaOH, 348 mM phosphoric acid HCB. The x-axis of the boundary at time 20 s was shifted with (A) 1.58 mm, or (B) 1.07 mm (dashed lines). Other conditions: see Figure III-II-3B.

### III.II.7. Concluding remarks

In the present work, it was for the first time shown that the HCB composition influences the SEFs obtained by FESI-Sweep-MEKC. At the same conductivity level and injection time under constant voltage, when sodium phosphate buffer is used as HCB, SEFs are lower than when phosphoric acid is used. Simulations with SIMUL 5 revealed that moving boundaries are formed at the initial buffer interfaces such that the compositions of HCB and BGE are

gradually changing during electrokinetic sample injection. The conductivity of the HCB increased with sodium phosphate buffer as HCB, whereas it decreased with phosphoric acid. This leads to a better stacking by FESI with sodium phosphate buffer-based HCB. The presented data revealed that stacking of analytes is not based on ITP as was hypothesized in our previous work [41]. Concurrently, because of the decrease in current intensity during the electrokinetic injection under constant voltage, a lower analyte amount is injected with sodium phosphate buffer than with phosphoric acid as HCB. This is detrimental to the overall SEFs, which are proportional to the injected amount of analytes [7]. Hence, in order to benefit from the more efficient stacking provided by sodium phosphate buffer as HCB, it is recommended to perform injection under constant current rather than constant voltage.

### **Acknowledgements**

The simulation part was supported by the Swiss NSF.

**The authors have declared no conflict of interest.**

### III.II.8. References

- [1] Gaš, B., Vacík, J., Zelenský, I., *J. Chromatogr. A*, 1991, 545, 225-237.
- [2] Beckers, J.L., Everaerts, F.M., *J. Chromatogr.*, 1990, 508, 3-17.
- [3] Gebauer, P., Thormann, W., Boček, P., *J. Chromatogr.*, 1992, 608, 47-57.
- [4] Chien, R.L., Burgi, D.S., *J. Chromatogr.*, 1991, 559, 153-161.
- [5] Burgi, D.S., Chien, R.L., *Anal. Chem.*, 1991, 63, 2042-2047.
- [6] Mikkers, F.E.P., Everaerts, F.M., Verheggen, T.P.T.M., *J. Chromatogr.*, 1979, 169, 1-10.
- [7] Quirino, J.P., Terabe, S., *Science*, 1998, 282, 465-468.
- [8] Quirino, J.P., Terabe, S., *Anal. Chem.*, 1999, 71, 1638-1644.
- [9] Hirokawa, T., Okamoto, H., Gaš, B., *Electrophoresis*, 2003, 24, 498-504.
- [10] Okamoto, H., Hirokawa, T., *J. Chromatogr. A*, 2003, 990, 335-341.
- [11] Quirino, J.P., Terabe, S., *Anal. Chem.*, 2000, 72, 1023-1030.
- [12] Kim, J.B., Otsuka, K., Terabe, S., *J. Chromatogr. A*, 2001, 932, 129-137.
- [13] Luo, X., Jiang, X., Tu, X., Luo, S., Yan, L., Chen, B., *Electrophoresis*, 2010, 31, 688-694.
- [14] Li, X., Hu, J., Han, H., *J. Sep. Sci.*, 2011, 34, 323-330.
- [16] Wang, C.H., Chen, C.C., Wang, S.J., Wu, S.M., *J. Chromatogr. A*, 2011, 1218, 6832-6837.
- [17] Tsai, I.L., Liu, H.Y., Kuo, P.H., Wang, J.Y., Shen, L.J., Kuo, C.H., *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, 401, 2205-2214.
- [18] Jin, Y., Meng, L., Li, M., Zhu, Z., *Electrophoresis*, 2010, 31, 3913-3920.
- [19] Yang, Y., Nie, H., Li, C., Bai, Y., Li, N., Liao, J., Liu, H., *Talanta*, 2010, 82, 1797-1801.
- [20] Luo, X., Jiang, X., Tu, X., Luo, S., Yan, L., Chen, B., *Electrophoresis*, 2010, 31, 688-694.
- [21] Wang, M.J., Tsai, C.H., Hsu, W.Y., Liu, J.T., Lin, C.H., *J. Sep. Sci.*, 2009, 32, 441-4445.
- [22] Jong, Y.J., Ho, Y.H., Ko, W.K., Wu, S.M., *J. Chromatogr. A*, 2009, 1216, 7570-7575.
- [23] Su, H.L., Hsieh, Y.Z., *J. Chromatogr. A*, 2008, 1209, 253-259.
- [24] Su, H.L., Feng, L.I., Jen, H.P., Hsieh, Y.Z., *Electrophoresis*, 2008, 29, 4270-4276.
- [25] Lin, Y.H., Chiang, J.F., Lee, M.R., Lee, R.J., Ko, W.K., Wu, S.M., *Electrophoresis*, 2008, 29, 2340-2347.
- [26] Lin, Y.H., Lee, M.R., Lee, R.J., Ko, W.K., Wu, S.M., *J. Chromatogr. A*, 2007, 1145, 234-240.
- [27] Lin, Y.H., Li, J.H., Ko, W.K., Wu, S.M., *J. Chromatogr. A*, 2006, 1130, 281-286.

- [28] Cheng, H.L., Jong, Y.J., Li, J.H., Ko, W.K., Wu, S.M., *Electrophoresis*, 2006, 27, 4711-4716.
- [29] Meng, P., Fang, N., Wang, M., Liu, H., Chen, D.D.Y., *Electrophoresis*, 2006, 27, 3210-3217.
- [30] Fang, N., Meng, P., Zhang, H., Sun, Y., Chen, D.D.Y., *The Analyst*, 2006, 132, 127-134.
- [31] Chiang, H.Y., Sheu, S.J., *Electrophoresis*, 2004, 25, 670-676.
- [32] Chen, M.C., Chou, S.H., Lin, C.H., *J. Chromatogr. B*, 2004, 801, 347-353.
- [33] Fang, C., Liu, J.T., Chou, S.H., Lin, C.H., *Electrophoresis*, 2003, 24, 1031-1037.
- [34] Fang, C., Liu, J.T., Lin, C.H., *J. Chromatogr. B*, 2002, 775, 37-47.
- [35] Nunez, O., Kim, J.B., Moyano, E., Galceran, M. T., Terabe, S., *J. Chromatogr. A*, 2002, 961, 65-75.
- [36] Quirino, J.P., Iwai, Y., Otsuka, K., Terabe, S., *Electrophoresis*, 2000, 21, 2899-2903.
- [37] Kim, J.B., Otsuka, K., Terabe, S., *J. Chromatogr. A*, 2001, 932, 129-137.
- [38] Zhu, L., Tu, C., Lee, H.K., *Anal. Chem.*, 2002, 74, 5820-5825.
- [39] Hsu, Y.F., Chen, K.T., Liu, Y.W., Hsieh, S.H., Huang, H.Y., *Anal. Chim. Acta*, 2010, 673, 206-211.
- [40] Maijón, I., Borrull, F., Aguilar, C., Calull, M., *Chromatographia*, 2011, 73, 83-91.
- [41] Anres, P., Delaunay, N., Vial, J., Gareil, P., *Electrophoresis*, 2012, 33, 1169-1181.
- [42] Hruška, V., Jaroš, M., Gaš, B., *Electrophoresis*, 2006, 27, 984-991.
- [43] Breadmore, M.C., Mosher, R.A., Thormann, W., *Anal. Chem.*, 2006, 78, 538-546.
- [44] Mosher, R.A., Thormann, W., *Electrophoresis*, 2002, 23, 1803-1814.
- [45] Thormann, W., Breadmore, M.C., Caslavská, J., Mosher, R.A., *Electrophoresis*, 2012, 31, 726-754.
- [46] Kohlrausch, F., *Ann. Physik.*, 1897, 62, 209-239.
- [47] Hruška, V., Gaš, B., *Electrophoresis*, 2007, 28, 3-14.
- [48] Friedl, W., Reijenga, J.C., Kenndler, E., *J. Chromatogr. A*, 1995, 709, 163-170

### III.II.9. Supporting information

#### S.1 Experimental

The procedure detailed in paragraph 2.5 in the main manuscript was also applied for sample solutions of 250 ppb nicotine or 340 ppb atropine alone. Two different HCBs were used: (i) 200 mM phosphoric acid and (ii) 348 mM sodium phosphate buffer.

#### S.2 Results

Following the assumption of a t-ITP mechanism occurring in HCB during the FESI injection, effective mobilities in the sodium phosphate buffer-based HCB were calculated (Table III-II-S1). From these, only nicotine and quinine have effective mobilities higher than  $H^+$  ion effective mobility for both conductivity levels experienced, while strychnine satisfied this condition for the lower level of conductivity only. Consequently, nicotine, quinine and strychnine should be influenced by sodium ion concentration, whereas atropine, codeine and propranolol should not.

Electrophoretic mobilities in HCB ( $10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )								
Experiment	$Na^+$	Nicotine	Quinine	Strychnine	Codeine	Atropine	Propranolol	$H^+$
C	43.7	39.0	23.8	22.6	10.9	11.0	9.9	15.2
D	43.5	38.3	23.7	19.8	10.9	11.0	9.8	22.4

Table III-II-S1: Calculated effective mobilities of the analytes,  $Na^+$  and  $H^+$  ions in sodium phosphate buffer-based HCBs. Experiment C,  $\kappa_{HCB} = 1.66 \text{ S/m}$ , pH 1.7, 120 mM ionic strength; experiment D,  $\kappa_{HCB} = 2.09 \text{ S/m}$ , pH 1.6, 126 mM ionic strength. Mobilities were calculated with Friedl's model [48] using the mobilities at infinite dilution determined previously [41].

To confirm this, additional electrokinetic injections followed by pressure mobilization were performed for samples of nicotine or atropine with phosphoric acid and sodium phosphate buffer (100 mM  $Na^+$  ions) as HCB at conductivities of 1.66 S/m. The results (peak heights and peak areas) presented in Table III-II-S2 show both nicotine and atropine are influenced by the HCB composition, with higher peak heights and lower peak areas for both compounds for the case of sodium phosphate buffer. Also, another mechanism than t-ITP is likely to take place.

## Partie III - FESI-Sweep-MEKC- Chapitre II- Simulation

	Peak height (mAU)		Peak area (s.mAU)	
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> based-HCB (200 mM, pH 1.3)	Nicotine	14.9 ± 0.1	Nicotine	2528 ± 60
	Atropine	24.7 ± 1.2	Atropine	1628 ± 13
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> based-HCB (348 mM, pH 1.7)	Nicotine	23.5 ± 0.4	Nicotine	2309 ± 26
	Atropine	36.0 ± 0.3	Atropine	1520 ± 43

Table III-II-S2: Influence of the HCB composition on peak heights and peak areas for nicotine and atropine. Solutions of nicotine (at 250 ppb) or atropine (at 340 ppb) diluted in 2 mM sodium phosphate buffer (pH 2.9) were separately injected electrokinetically (+ 15k V for 500 s). After the injection, the zones were mobilized by pressure (50 mbar) passed the detection window. Three repetitions for each experiment.

## **CHAPITRE III-Application du FESI-Sweep-MEKC pour l'analyse d'herbicides dans des eaux potables présents à l'état d'ultra trace**

Ce travail a été réalisé en collaboration avec Rebecca Rivière, stagiaire de master 1 de l'Université Paris 6.

*Abbréviations : PQ : Paraquat. DQ : Diquat. DF : Difenzoquat. EV : Viologène d'éthyle. LOD : Limite de détection. LOQ : Limite de quantification. ACN : Acétonitrile.*

### **III.III.1. Introduction**

Les deux travaux précédents sur l'étude du mécanisme du *FESI-Sweep-MEKC* ont permis de dégager des axes d'amélioration des gains en sensibilité de cette technique, mais aussi de simplification de sa mise en place pour l'application à des cas réels [1,2]. C'est pourquoi, afin de valider ces conclusions, nous nous sommes attachés à développer une application pour l'analyse d'une famille d'herbicides. En effet, afin d'augmenter la productivité de l'agriculture moderne, une grande quantité d'herbicides est répandue chaque année sur les terres agricoles. Ceux à base d'ammonium quaternaire, généralement appelés les « quats », sont un groupe important à analyser à cause du tonnage élevé employé. Les « quats » utilisés diffèrent dans leurs actions ; en effet, le paraquat (PQ) et le diquat (DQ) sont utilisés en tant qu'herbicides non sélectifs, alors que le difenzoquat (DF) est un herbicide sélectif utilisé pour le contrôle de la Folle-avoine dans l'orge et le blé [3]. A cause de leurs propriétés physico-chimiques (charge et faible poids moléculaire), ce sont des produits très solubles dans l'eau et ils sont facilement retrouvés dans les sols, les aliments et l'eau [4-7]. De plus, ils sont connus pour avoir des effets toxiques [8-10] et le PQ est soupçonné de provoquer la maladie de Parkinson [11-14]. C'est pourquoi, depuis 2007, l'Union Européenne a interdit l'utilisation du PQ [15] et les teneurs maximales dans les eaux potables sont fixées à 0,1 µg/L pour chaque herbicide et 0,5 µg/L pour la quantité totale d'herbicides [16].

Plusieurs stratégies ont été développées pour l'analyse de ces composés incluant des bio-essais [17,18], des méthodes électrochimiques [19,20] et des méthodes de chromatographie en phase liquide [21-25]. Bien que la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse soit un outil très puissant pour l'analyse de ces composés dans les eaux [24,25], l'électrophorèse capillaire (CE), grâce à ses performances élevées, son faible prix et sa conception respectueuse de l'environnement, est devenue une alternative prometteuse [26-28]. Cependant, comme la CE souffre d'un manque en sensibilité avec les détecteurs spectrophotométriques, des méthodes de préconcentration off-line (l'extraction liquide-liquide ou sur phase solide) ont été utilisées pour leur analyse dans des eaux, mais elles restent insuffisantes pour atteindre les limites de détection fixées par l'Union Européenne [29-31].

Ainsi, des méthodes de préconcentration ont été utilisées pour abaisser les limites de détection (LOD) en CE. En 2002, Núñez et coll. ont utilisé le *FESI-Sweep-MEKC* pour l'analyse des « quats » dans des eaux potables sans que les LOD préconisées par l'Union Européenne ne soient atteintes [32]. Il y a quelques années, la « Micelle to Solvent Stacking » a aussi été appliquée à l'analyse des « quats » dans des eaux, mais là aussi les spécifications de l'Union Européenne n'ont pas été obtenues [33].

C'est pourquoi nous nous sommes attachés à appliquer cette méthode aux « quats » afin d'évaluer les gains pouvant être obtenus avec les avancées réalisées suite aux travaux sur la compréhension du mécanisme du *FESI-Sweep-MEKC* avec comme point de comparaison les travaux de Núñez et coll..

### III.III.2. Matériels et procédures électrophorétiques

#### III.III.2.1. Produits et solutions

L'acétonitrile (ACN) de qualité HPLC, l'acide phosphorique ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ , > 80 %) et l'hydroxyde de sodium 1 M ont été achetés chez VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Le phosphate de sodium monobasique ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , > 99 %), le dodécyl sulfate de sodium (SDS, > 99 %), le dichlorure de paraquat (> 99,9 %), le dibromure de viologène d'éthyle (> 99 %) et le dibromure de diquat (> 99 %) ont été achetés chez Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France). Le méthyle sulfate de difenzoquat (> 98 %) a été acheté chez CIL Cluzeau (Sainte

Foy la Grande, France). L'eau ultra-pure (UP) a été délivrée par un système Direct-Q3 UV (Millipore, Molsheim, France).

La composition des tampons utilisés était la suivante : tampon phosphate de sodium 46 mM (force ionique 22 mM) avec un pH de 2,1 ; tampons phosphate de sodium 2, 6 et 9 mM, pH 2,9, obtenus par dilution du tampon phosphate de sodium 46 mM pH 2,1 avec de l'eau UP. Une solution mère de SDS à 250 mM dans de l'eau UP a été préparée chaque jour. L'électrolyte sans micelles a été obtenu en ajoutant 20 % d'ACN (v/v) dans le tampon phosphate de sodium 46 mM pH 2,1 ; l'électrolyte avec micelles a été obtenu en ajoutant les quantités nécessaires d'ACN et de SDS (à partir de la solution mère) pour avoir un pourcentage final de 20 % (v/v) pour l'ACN et une concentration finale de 50 mM pour le SDS. Ces deux électrolytes ont été préparés juste avant chaque expérience. L'électrolyte de forte conductivité (« High Conductivity Buffer, (HCB) ») avec une concentration en sodium de 100 mM, une conductivité ( $\kappa$ ) de 2,09 S/m et un pH de 1,6 a été obtenu en préparant un tampon phosphate de sodium 457 mM (force ionique de 126 mM). Une solution mère de diquat (255 ppm), de paraquat (339 ppm), de viologène d'éthyle (286 ppm) et de difenzoquat (345 ppm) a été préparée en dissolvant ces composés dans de l'eau ultra-pure, puis stockée à 4°C dans un réfrigérateur. Les concentrations finales désirées ont été obtenues en dopant avec cette solution mère de l'eau de distribution urbaine (Paris V<sup>ème</sup>) acidifiée. Cette eau acidifiée a été obtenue en ajoutant à 20 mL d'eau de distribution prélevée au robinet une quantité variable d'acide phosphorique à 1,4 M (cette concentration a été choisie de telle sorte que l'ajout d'acide phosphorique entraîne une variation du volume final négligeable) afin d'obtenir les pH et conductivités rapportés dans le manuscrit. Les conductivités ont été mesurées en utilisant l'appareil d'électrophorèse capillaire selon la procédure présentée dans la référence [34]. Toutes les solutions ont été filtrées sur des membranes de 0,20  $\mu$ m avant leur utilisation (Polytétrafluoroéthylène, VWR). Tous les pH indiqués sont ceux mesurés.

### **III.III.2.2. Matériels**

Toutes les expériences ont été réalisées avec un appareil d'électrophorèse capillaire 7100 CE d'Agilent Technologies (Massy, France) équipé d'un DAD (lampe de deutérium) programmé aux longueurs d'onde suivantes : 254 nm pour le difenzoquat, le viologène d'éthyle et le paraquat avec une bande passante de 20 nm (référence à 350 nm avec une bande passante de 80 nm) et 305 nm pour le diquat avec une bande passante de 20 nm (référence à

360 nm avec une bande passante de 40 nm). La fréquence d'acquisition a été fixée à 5 Hz. Le choix des longueurs d'onde, bandes passantes et la fréquence d'acquisition résultent d'une optimisation de ces paramètres (les données ne sont pas montrées). Un ordinateur équipé du logiciel HP 3D Chemstation a permis de contrôler l'appareil de CE et d'analyser les données. Les séparations ont été réalisées dans des capillaires de silice vierge de 60 cm (longueur effective 51,5 cm) x 50 µm de diamètre interne (Photonlines, Marly-leRoi, France) ou dans des capillaires à bulle en silice vierge de 60 cm (longueur effective 51,5 cm) x 50 µm de diamètre interne et avec un diamètre interne de 150 µm à la fenêtre de détection (Agilent Technologies, Massy, France).

### **III.III.2.3. Procédures électrophorétiques**

Les nouveaux capillaires ont été activés en faisant circuler sous une pression de 1 bar les solutions suivantes : NaOH 1 M, puis NaOH 0,1 M et enfin de l'eau UP pendant 10 min chacune. Avant chaque expérience, les capillaires ont été soumis à des lavages successifs sous 1 bar de NaOH à 0,1 M pendant 5 min, puis de l'eau UP pendant 5 min et enfin 5 min avec l'électrolyte sans micelles. A la fin de chaque jour, les capillaires ont été lavés sous 1 bar pendant 10 min avec de l'eau.

Pour la *MEKC*, les capillaires ont été conditionnés avec l'électrolyte avec micelles, puis les analytes dilués à 5,1 ppm pour le DQ, 6,8 ppm pour le PQ, 5,7 ppm pour le viologène d'éthyle et 6,9 ppm pour le DF dans l'eau du robinet ( $\kappa = 0,070$  S/m, pH = 7,8) ont été injectés pendant 8 s sous 50 mbars (1,4 % du volume du capillaire). Ensuite, avec l'électrolyte avec micelles à l'entrée et à la sortie du capillaire, une tension de -20 kV a été appliquée jusqu'à la détection des composés.

Pour l'optimisation de la durée d'injection et de la longueur du HCB en fonction de la conductivité de l'eau, la procédure suivante a été appliquée : à 20 mL d'eau du robinet, différentes quantités d'acide phosphorique à 1,4 M ont été ajoutées (entre 20 et 80 µL) afin d'obtenir les conductivités et pH spécifiés dans le Tableau III-III-2. Cette eau acidifiée a été utilisée pour dissoudre le PQ à une concentration de 1 ppm. Ensuite, dans un capillaire conditionné au préalable avec l'électrolyte sans micelles, cette solution a été injectée électrocinétiquement (20 µA, pour les temps spécifiés voir le Tableau III-III-2) avec, respectivement, l'échantillon et l'électrolyte sans micelles à l'entrée et à la sortie du capillaire. A la fin de l'injection, l'électrolyte sans micelles a été placé à l'entrée du capillaire et les

## Partie III - FESI-Sweep-MEKC- Chapitre III- Application

zones ont été mobilisées par pression (50 mbars) jusqu'à ce que tout le PQ piégé dans le HCB soit détecté.

Pour le *FESI-Sweep-MEKC*, le capillaire a tout d'abord été conditionné avec l'électrolyte sans micelles, puis le HCB a été introduit (50 mbars, 244 s, soit 30 % du volume du capillaire) et enfin les analytes dilués aux concentrations désirées dans l'eau du robinet acidifiée ( $\kappa = 0,080$  S/m, pH = 3,2) ont été injectés électrocinétiquement (20  $\mu$ A, pendant 1000 s) avec, respectivement, l'échantillon et l'électrolyte sans micelles à l'entrée et à la sortie du capillaire. Après l'injection, avec l'électrolyte avec micelles placé à l'entrée et à la sortie du capillaire, une tension de -20 kV a été appliquée jusqu'à la détection de tous les composés. L'optimisation et la prévalidation de cette méthode a été conduite sur des capillaires cylindriques standards. Le *FESI-Sweep-MEKC* a aussi été réalisé sur des capillaires à « bulle » afin de déterminer les LOD avec un tel outil.

### III.III.3. Résultats et discussions

La structure des quatre composés analysés au cours de ces travaux est représentée en Figure III-III-1. Les trois « quats » sont des mono ou di-ammoniums quaternaires dichargés dans les conditions expérimentales avec des masses moléculaires sensiblement égales. Le viologène d'éthyle ne fait pas partie des « quats », bien que sa structure soit très ressemblante à celle des « quats » ; il a donc été choisi comme étalon interne.

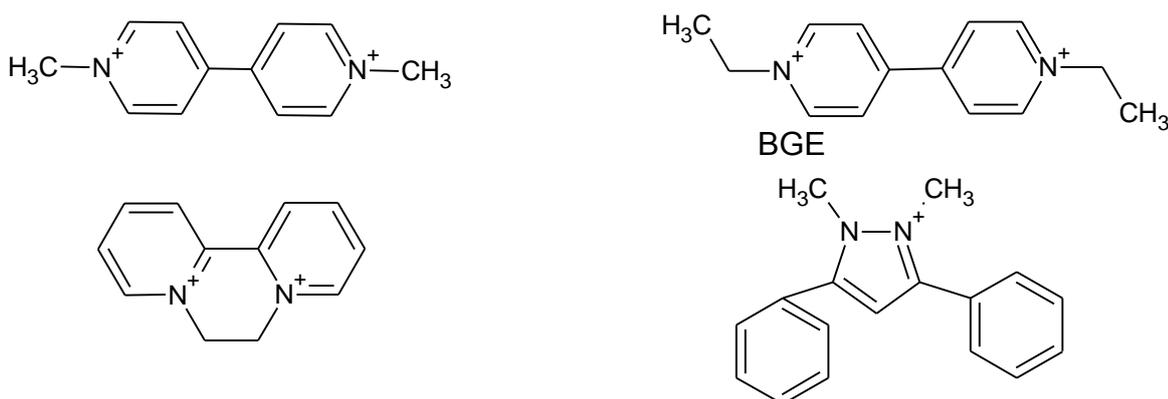


Figure III-III-1 : représentation de la structure des composés analysés dans cette étude et leur log P : paraquat (M = 186 g/mol ; log P = -4,5) ; diquat (M = 184 g/mol ; log P = -4,6) ; viologène d'éthyle (M = 286 g/mol ; log P = -2,71) ; difenzoquat (M = 249 g/mol ; pKa = 7 ; log P = 0,65 à pH = 5 et log P = -0,62 à pH = 7). Les données proviennent de la base de données de « World Agrochemical Yellow Pages Online ».

### III.III.3.1. Séparation par MEKC

D'après les travaux de Núñez et coll., ces quatre composés peuvent être séparés par *MEKC* en milieu acide (tampon phosphate de sodium, pH = 2,5) en présence de 20 % d'ACN (v/v) et une concentration de SDS allant de 50 à 80 mM [32]. Ces conditions étant très proches de celles utilisées dans nos deux chapitres précédents [1,2], ces dernières ont été reprises dans cette étude. La concentration en SDS a été fixée à 50 mM, car au-dessus de celle-ci des problèmes de stabilité du courant et de chute irréversible du courant ont été observés lors de l'application du *FESI-Sweep-MEKC*. Aucune explication exacte de ce phénomène n'a pu être fournie, mais une hypothèse est une précipitation avec un effet de germination à la surface du capillaire. La concentration en SDS, la concentration des ions dans le HCB, la longueur du HCB et la valeur de l'écoulement électroosmotique (EOF) semblent avoir une influence sur la cinétique de ce phénomène. En conséquence, la séparation en *MEKC* a été conduite avec un tampon phosphate de sodium 46 mM (pH 2,1) contenant 50 mM de SDS et 20 % d'ACN (v/v). L'électrophorégramme obtenu est représenté en Figure III-III-2.

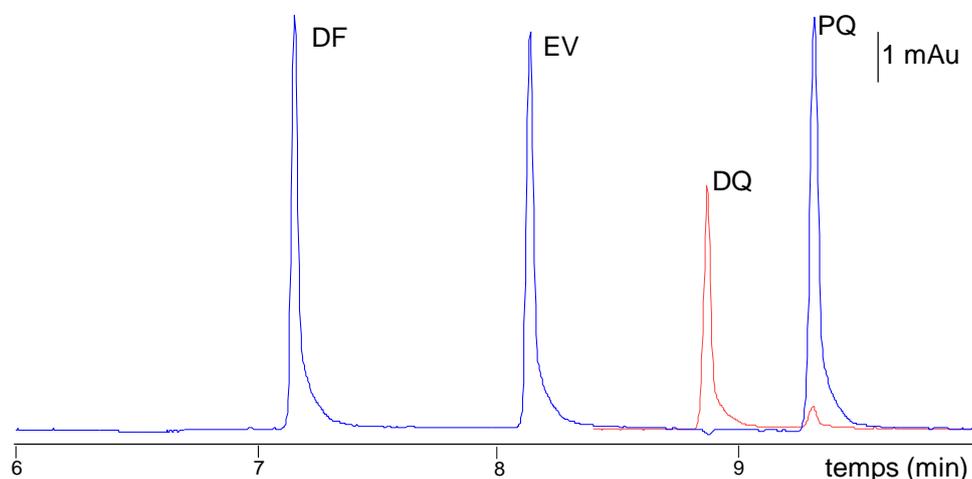


Figure III-III-2 : séparation par *MEKC* d'une eau potable de distribution urbaine ( $\kappa = 0,070$  S/m, pH = 7,8) dopée avec du DF (6,9 ppm), de l'EV (5,7 ppm), du DQ (5,1 ppm) et du PQ (6,8 ppm). Capillaire : silice vierge 60 cm (longueur effective 51,5 cm) x 50  $\mu$ m. Electrolyte avec micelles : tampon phosphate de sodium 46 mM (pH 2,1) contenant 50 mM de SDS et 20 % d'ACN (v/v). Tension de séparation -20 kV. Injection 50 mbars pendant 8 s. Détection UV à 254 nm pour DF, EV et PQ, à 305 nm pour DQ.

## Partie III - FESI-Sweep-MEKC- Chapitre III- Application

Le pH du tampon étant acide et le BGE contenant 20 % d'ACN on peut considérer que l'EOF est très faible. En conséquence, les composés sortent dans l'ordre croissant de leur affinité pour les micelles et ceci est confirmé quand on regarde les log P. Les LOD et LOQ ont été calculées en mesurant le rapport signal sur bruit à partir de l'électrophérogramme obtenu pour une concentration des analytes à 2,1 ppm pour le DF, 2,7 ppm le viologène d'éthyle, 2,5 ppm pour le DQ et 2,7 ppm pour le PQ et sont présentées dans le Tableau III-III-1. Les LOD et LOQ, quoique respectivement dans les gammes des ppb et des ppm, sont trop élevées selon la législation de l'UE. Il est donc nécessaire de développer une méthode d'analyse plus sensible. C'est pourquoi le *FESI-Sweep-MEKC* a été appliqué pour l'analyse de ces composés dans l'eau de distribution.

	Difenzoquat	Diquat	Paraquat
LOD (S/B = 3, ppb)	550	350	450
LOQ (S/B = 10, ppb)	1750	1150	1450

Tableau III-III-1 : LOD et LOQ obtenues en MEKC pour les trois « quats ». Le bruit (B) a été estimé en mesurant ses variations trente secondes avant et après le pic du composé considéré (S).

### III.III.3.2. *FESI-Sweep-MEKC*

#### III.III.3.2.1. *Ajustement de la conductivité et du pH de l'eau de distribution.*

La première étape de la méthode de préconcentration envisagée est une longue injection électrocinétique. Ce type d'injection est très sensible aux variations de conductivité de l'échantillon. Ainsi, la conductivité de l'eau de distribution a été mesurée sur deux semaines afin de connaître son évolution et ces mesures ont montré qu'elle variait entre 0,065 et 0,072 S/m. Sa conductivité n'étant donc pas suffisamment stable, un traitement de l'eau par acidification en utilisant de l'acide phosphorique a été envisagé, afin d'obtenir des conductivités plus répétables. L'acide phosphorique a été utilisé afin d'avoir des échantillons proches des échantillons modèles utilisés dans les deux chapitres précédents.

En FESI, la conductivité de l'échantillon joue aussi un rôle important sur les quantités d'analytes injectés pour des durées d'injection données. En outre, en *FESI-Sweep-MEKC*, la durée d'injection est limitée, pour un capillaire de dimensions données, par la longueur

## Partie III - FESI-Sweep-MEKC- Chapitre III- Application

qu'occupe le HCB dans le capillaire ainsi que par la mobilité électrophorétique de l'ion la plus élevée, ici le paraquat (les mesures de mobilité ont été faites en électrophorèse de zone avec le tampon de séparation ne contenant ni micelles ni acétonitrile ; les données ne sont pas montrées) ; en effet, ce dernier doit rester « piégé » dans la zone de HCB pendant toute la durée de l'injection. Ainsi, afin d'obtenir les LOD les plus faibles possibles, il a donc été indispensable d'optimiser pour une eau de conductivité donnée la durée d'injection maximale et la longueur du HCB. Aussi, avec les conclusions tirées du chapitre précédent, le mode d'injection à courant constant (20  $\mu$ A) a été choisi. Ceci entraîne une autre limitation du fait de la tension maximale applicable par le système CE qui est de +/- 30 kV. Ainsi, en procédant par essai-erreur, les quantités de PQ injecté pour différentes combinaisons de conductivité de l'eau/durée du temps d'injection/longueur de HCB ont été mesurées en exploitant les aires des profils de concentration obtenus après mobilisation par pression de la zone du HCB. La longueur du HCB a été ajustée à chaque fois de telle sorte que le front du PQ corresponde au front du HCB. Les résultats sont présentés dans le Tableau III-III-2.

Conductivité (S/m)	pH	Ajout H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ( $\mu$ L) (pour 20 mL d'eau)	Longueur HCB (% capillaire)	t <sub>inj</sub> max (s)	Aire (s.mAU)
0.070	7.8	0	20	400	1952 $\pm$ 170
0.060	6.8	20	15	250	1406 $\pm$ 44
0.070	4.2	60	20	400	1915 $\pm$ 74
0.080	3.2	75	30	1000	2672 $\pm$ 167

Tableau III-III-2 : Aires mesurées après l'injection électrocinétique (courant constant, 20  $\mu$ A) du paraquat, suivi de la mobilisation par pression des zones jusqu'au détecteur. Dilution du paraquat à 1 ppm dans l'eau de distribution acidifiée (20 mL) avec une solution d'acide phosphorique (1,4 M). Les longueurs du HCB (introduction à 50 mbars) ont été déterminées, par essai-erreur, de telle sorte que le paraquat reste totalement piégé dans cette zone. La durée d'injection a été limitée par la valeur maximale de tension accessible (+ 30 kV). Composition du HCB : phosphate de sodium 457 mM (pH 1,6 ;  $\kappa$  = 2.09 S/m). Les volumes d'acide phosphorique ajoutés sont ceux pour 20 mL d'eau du robinet et sont susceptibles de varier de quelques  $\mu$ L en fonction du jour. Chaque expérience a été répétée trois fois.

Tout d'abord, l'ajout d'acide phosphorique entraîne tout normalement une diminution progressive du pH et la conductivité de l'eau diminue avant d'augmenter. Cette diminution a été attribuée à la neutralisation des carbonates eu égard au pH légèrement basique. Les aires mesurées, qui résultent des limites énoncées préalablement, montrent que c'est avec une

conductivité de 0,080 S/m que la quantité injectée de PQ est la plus élevée. Ainsi, dans notre cas, quand la conductivité augmente, la durée d'injection maximale, et donc la quantité en PQ, augmente aussi. Ceci résulte de la limitation en tension ; en effet, quand la conductivité de l'eau augmente, la tension au cours de l'injection est plus faible et donc la limitation en tension apparaît plus tardivement. Ce résultat est très intéressant, car il montre qu'avec une injection à courant constant, avec toutes les limitations énoncées préalablement, une meilleure sensibilité peut être obtenue avec une conductivité plus élevée, alors qu'il est généralement admis, pour une injection à tension constante, qu'il est préférable de travailler avec les conductivités les plus faibles [2,35,36]. Ceci ouvre une perspective intéressante pour l'application de cette méthode à des eaux de plus grande conductivité.

### ***III.III.3.2.2. Optimisation de la méthode FESI-Sweep-MEKC***

La composition de l'électrolyte développé pour la *MEKC* et les conditions d'injection précédemment optimisées (conductivité de l'eau, longueur du HCB et durée d'injection) ont été appliquées à l'analyse d'eau de distribution dopée avec les composés d'intérêt afin de vérifier si ceux-ci restent bien séparés après l'étape de préconcentration par *FESI-Sweep* (Voir Figure III-III-3). Des blancs, c'est-à-dire l'eau de distribution acidifiée non dopée, ont été également analysés, afin de vérifier s'il n'y a pas de pics interférents aux temps de détection des composés ciblés. Comme il est montré sur la Figure III-III-3, les analytes sont bien séparés avec un retour à la ligne de base entre eux et aucun pic interférent n'a été observé.

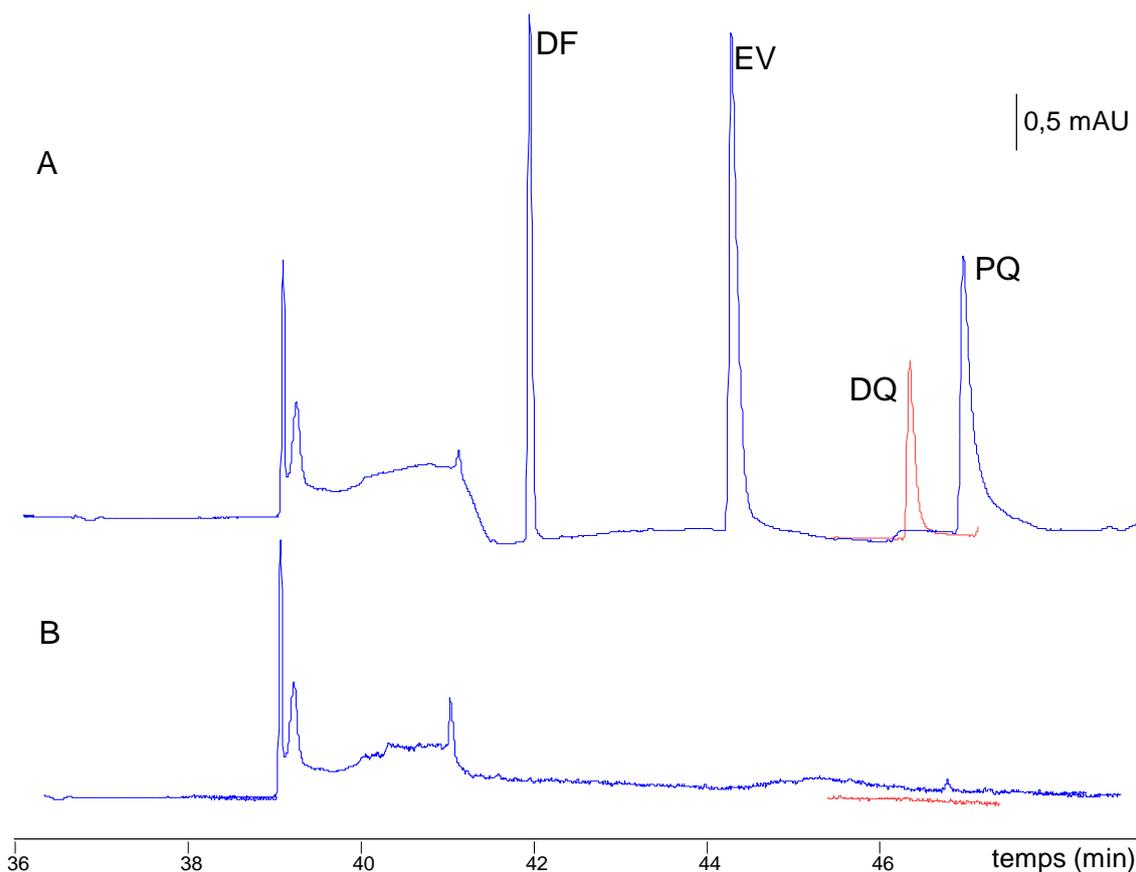


Figure III-III-3 : Electrophorégrammes obtenus pour l'analyse de (A) l'eau de distribution acidifiée ( $\kappa = 0,080$  S/m, pH = 3,2) avec de l'acide phosphorique (1,4 M) dopée avec du DF (5,1 ppb), de l'EV (6,8 ppb), du PQ (5,7 ppb) et du DQ (6,9 ppb) et (B) l'eau de distribution acidifiée ( $\kappa = 0,080$  S/m, pH = 3,2) non dopée. Conditionnement du capillaire : électrolyte sans micelles, puis introduction du HCB sous 50 mbars pendant 244 s (30 % du volume du capillaire). Injection des analytes pendant 1000 s sous intensité constante (20  $\mu$ A). Détection par absorbance UV à 254 nm pour DF, EV et PQ et à 305 nm pour DQ. Autres conditions, voir Figure III-III-2.

A ce stade, des problèmes sérieux de répétabilité ont été rencontrés, comme le montre le Tableau III-III-3. Avec un simple conditionnement du capillaire avec l'électrolyte sans micelles entre chaque injection et des électrolytes préparés chaque matin, des coefficients de variation variant entre 26 et 46 % ont été obtenus pour les hauteurs normalisées. Lorsque les électrolytes ont été fraîchement préparés (conditions B) les coefficients de variation sur les hauteurs normalisées sont devenus inférieurs à 10 % pour le DQ et le PQ. Cette amélioration a été attribuée à l'évaporation partielle de l'ACN présent dans les électrolytes quand ceux-ci sont préparés le matin même. Pour le DF, aucune amélioration de la répétabilité n'a été remarquée : ceci pourrait être dû au fait que le DF est sensible aux variations des temps de

## Partie III - FESI-Sweep-MEKC- Chapitre III- Application

migration (et donc sûrement à l'état de surface du capillaire), car des composés sont susceptibles d'interférer avec son signal (voir Figure III-III-3). C'est pourquoi, en dernier lieu, une étape de réactivation du capillaire par la soude 0,1 M a été ajoutée entre chaque analyse (conditions C). Le coefficient de variation de la hauteur normalisée pour le DF est alors devenu inférieur à 10 %.

		Hauteur de pic normalisée			
		Difenzoquat	Viologène d'éthyle	Diquat	Paraquat
Conditions A	Moyenne	0,64	1,00	0,38	0,66
	CV (%)	31,70	N.A.	25,60	46,20
Conditions B	Moyenne	1,17	1,00	0,34	0,62
	CV (%)	45,20	N.A.	4,30	6,80
Conditions C	Moyenne	1,03	1,00	0,40	0,73
	CV (%)	8,10	N.A.	3,80	5,80

Tableau III-III-3 : Moyennes et coefficients de variation des hauteurs normalisées (par le viologène d'éthyle) des pics des herbicides pour différentes conditions opératoires de la méthode *FESI-Sweep-MEKC* développée (voir Figure 3). Conditions A : entre chaque injection le capillaire est conditionné par l'électrolyte sans micelles (16 volumes de capillaire). Conditions B : identiques au A, mais avec des électrolytes sans et avec micelles préparés juste avant chaque injection. Conditions C : identiques au B, mais avec un rinçage préalable du capillaire avec de la soude 0,1 M (16 volumes de capillaire), puis de l'eau UP (16 volumes de capillaire). Chaque expérience a été répétée trois fois. N.A. pour Non Applicable.

### III.III.3.2.3. Prévalidation de la méthode *FESI-Sweep-MEKC*

Tous les travaux présentés ci-dessus ont été réalisés sur un seul niveau de concentration. Ainsi, pour évaluer le potentiel de ce travail pour une éventuelle application, il a été indispensable d'examiner la gamme d'application de cette méthode. Pour cela, cinq niveaux de concentration ont été testés pour chaque composé et répétés trois fois aléatoirement. Ces niveaux sont : 0,35, 0,70, 3,50, 7,00 et 10,35 ppb pour le DF ; 0,51, 1,28, 2,55, 5,10 et 7,64 ppb pour le DQ ; 0,34, 0,68, 1,70, 3,40, 6,80, 10,16 ppb pour le PQ. A cause du temps conséquent de chaque manipulation, les répétabilités inter et intra journalières n'ont pu être calculées, puisqu'il a été impossible d'effectuer tous les points en un seul jour. Les LOD et les LOQ ont été calculées pour chacun des composés en se basant sur la mesure du bruit de fond 30 s avant et après chaque pic (voir Tableau III-III-4).

## Partie III - FESI-Sweep-MEKC- Chapitre III- Application

Le Tableau III-III-4 montre que la méthode développée ci-dessus est applicable pour l'analyse des « quats » à des teneurs très faibles. Les LOD du DF et du PQ sont inférieures à 0,1 ppb, tandis que celle du DQ est juste au-dessus (0,13 ppb). Enfin, en ce qui concerne les LOQ, à part pour le DF, la méthode ne permet pas d'atteindre les limites fixées en Europe.

	Difenzoquat	Diquat	Paraquat
Capillaire cylindrique (50 µm de diamètre interne à la détection)			
Gamme testée (ppb)	0,35 - 10,35	0,51 - 7,64	0,34 - 10,16
CV (%) niveau bas (n=3)	13,3	11,3	13,2
CV (%) niveau haut (n=3)	3,9	2,5	4,4
Linéarité ( $r^2$ )	0,97	0,97	0,98
LOD (ppb)	0,03	0,13	0,05
LOQ (ppb)	0,09	0,42	0,16
Gains en sensibilité	19440	2740	9065
Capillaire à bulle (150 µm de diamètre interne à la détection)			
LOD (ppb)	0,015	0,070	0,025
LOQ (ppb)	0,05	0,20	0,09
Gains en sensibilité	35000	5750	16110

Tableau III-III-4 : Evaluation des paramètres de qualité de la méthode développée sur l'analyse d'eau de distribution acidifiée et dopée avec les composés d'intérêt. Les gains en sensibilité correspondent au rapport :  $LOQ_{MEKC}/LOQ_{FESISWEEP}$ .

A titre de comparaison, les résultats obtenus avec le *FESI-Sweep-MEKC* développé dans cette étude et qui font suite aux travaux de compréhension du mécanisme de cette méthode de préconcentration, ont été comparés à ceux de Núñez et coll. [32]. Dans leurs travaux, avec les conditions développées (durée d'injection 400 s à tension constante + 22 kV), pour l'analyse d'une eau de distribution japonaise de conductivité plus faible que la nôtre ( $\kappa = 0,015$  S/m), ils ont obtenu des LOD de 0,5 ppb pour le PQ, 1,0 ppb pour le DQ et 3,3 ppb pour le DF. Les LOD dans nos travaux sont donc environ cent fois plus faibles et sont meilleures que celles rapportées dans des travaux où une étape d'extraction sur phase solide a été utilisée avant l'analyse en CE [29-31].

Toutefois, comme dans nos travaux les LOQ sont toujours au-dessus des spécifications de l'Union Européenne, sans cependant avoir eu totalement le temps d'évaluer la gamme de linéarité en concentration, la méthode de *FESI-Sweep-MEKC* développée a été appliquée à des échantillons d'eau de distribution avec des capillaires à « bulle ». Les résultats montrent (voir Tableau III-III-4) que, grâce à l'augmentation du chemin optique, les LOD et les LOQ sont améliorées d'un facteur deux environ. Ainsi, les LOQ du DF et du PQ sont en-dessous des spécifications de l'Union Européenne, alors que celle du DQ est toujours légèrement au-dessus (0,20 ppb).

### III.III.4. Conclusion

A partir des travaux théoriques de l'étude du mécanisme du *FESI-Sweep-MEKC*, une méthode très sensible a été développée pour l'analyse des « quats » dans des eaux de distribution avec une simple acidification de celle-ci comme préparation d'échantillon. L'utilisation de capillaire à « bulle » permet d'obtenir pour le difenzoquat et le paraquat des LOQ en-dessous des spécifications, mais celle pour le diquat reste encore légèrement au-dessus (0,20 ppb au lieu de 0,1 ppb). Pour atteindre ce niveau de concentration, il serait intéressant d'utiliser des cellules en Z, puisque la résolution entre les pics semble le permettre. Avec un tel outil des gains en sensibilité de 5 sont attendus par rapport à la méthode développée (capillaire à bulle). Enfin, les avancées réalisées suite à l'étude du mécanisme de cette méthode de préconcentration ont permis d'améliorer sensiblement les performances, puisque des LOD cent fois plus faibles que celles rapportées dans une étude antérieure ont été obtenues. Il serait intéressant d'appliquer cette méthode à d'autres échantillons et d'autres composés pour voir si de telles améliorations sont obtenues.

### III.III.5. Références

- [1] Anres, P., Delaunay, N., Vial, J., Gareil, P., *Electrophoresis*, 2012, 33, 1169-1181
- [2] Anres, P., Thormann, W., Delaunay, N., Vial, J., Gareil, P., *Electrophoresis*, 2012, soumis
- [3] Picó, Y., Font, G., Moltó, J.C., Mañes, J., *J. Chromatogr. A*, 2000, 885, 251-271
- [4] Lidia Maria, R-P., Javier, H-B., Miguel Angel, R-D., *J. Sep. Sci.*, 2006, 29, 2557-2577
- [5] Font, G., Ruiz, M.J., Fernández, M., Picó, Y., *Electrophoresis*, 2008, 29, 2059-2078
- [6] Buchberger, W., Schöftner, R., *Electrophoresis*, 2003, 24, 2111-2118
- [7] Kuster, M., López de Alda, M., Barceló, D., *J. Sep. Sci.*, 2011, 34, 901-924
- [8] Jones, G.M., Vale, J.A., *Clin. Toxicol.*, 2000, 38, 123-128
- [9] Landrigan, P.J., Sonawane, B., Butler, R.N., Trasande, L., Callan, R., Droller, D., *Environ. Health Perspect.*, 2005, 113, 1230-1233
- [10] McCarthy, S., Somayajulu, M., Sikorska, M., Borowy-Borowski, H., Pandey, S., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2004, 201, 21-31
- [11] Di Monte, D.A., Lavasani, M., Manning-Bog, A.B., *Neurotoxicology*, 2002, 23, 487-502
- [12] Thiruchelvam, M., Prokopenko, O., Cory-Slechta, D.A., Richfield, E.R., Burckley, B., Mirochnitchenko, O., *J. Biol. Chem.*, 2005, 280, 22530-22539
- [13] Dinis-Oliveira, R.J., Remiao, F., Carmo, H., Duarte, J.A., Sanchez Navarro, A., Bastos, M.L., Carvalho, F., *Neurotoxicology*, 2006, 27, 1110-1122
- [14] Purisai, M.G., McCormack, A.L., Cumine, S., Li, J., Isla, M.Z., Di Monte, D.A., *Neurobiol. Dis.*, 2007, 25, 392-400
- [15] European Communities, Judgment of the court of first instance: Plant protection products, paraquat as an active substance, marketing authorization, authorization procedure, protection of human and animal health, Directive 91/4/EEC, July 2007
- [16] European Union, EEC Drinking Water Guidelines 80/779/EEC, EEC No. L229/11-29, EU, Brussels, 1980
- [17] Nadeem Zafar, M., Tasca, F., Gorton, L., Patridge, E.V., Ferry, J.G., Nöll, G., *Anal. Chem.*, 2009, 81, 4082-4088
- [18] Spinks, C.A., Wang, B., Mills, E.N.C., Morgan, M.R.A., *Analyst*, 1999, 124, 847-850
- [19] Tasca, F., Gorton, L., Harreither, W., Haltrich, D., Ludwig, R., Nöll, G., *Anal. Chem.*, 2009, 81, 2791-2798
- [20] Pui-ock, S., Ruchirawat, M., Gascoyne, P., *Anal. Chem.*, 2008, 80, 7727-7734
- [21] Merino, F., Rubio, S., Pérez-Bendito, D., *Anal. Chem.*, 2004, 76, 3878-3886

- [22] Whitehead Jr., R.D., Montesano, M.A., Jayatilaka, N.K., Buckley, B., Winnik, B., Needham, L.L., Barr, D.B., *J. Chromatogr. B*, 2010, 878, 2548-2553
- [23] Zougagh, M., Bouabdallah, M., Salghi, R., Hormatallah, A., Rios, A., *J. Chromatogr. A*, 2008, 1204, 56-61
- [24] Bassarab, P., Williams, D., Dean, J.R., Ludkin, E., Perry, J.J., *J. Chromatogr. A*, 2011, 1218, 673-677
- [25] Martínez Vidal, J.L., Belmonte Vega, A., Sánchez López, F.J., Garrido Frenich, A., *J. Chromatogr. A*, 2004, 1050, 179-184
- [26] Cai, J.Y., El Rassi, Z., *J. Liq. Chromatogr.*, 1992, 15, 1193-1200
- [27] Galceran, M.T., Carneiro, M.C., Diez, M., Puigrou, L., *J. Chromatogr. A*, 1997, 782, 289-295
- [28] Carneiro, M.C., Puignou, L., Galceran, M.T., *Anal. Chim. Acta*, 2000, 408, 263-269
- [29] Rodríguez-Gonzalo, E., Domínguez-Álvarez, J., Ruano-Miguel, L., Carabias-Martínez, R., *Electrophoresis*, 2008, 29, 4066-4077
- [30] Carneiro, M.C., Puignou, L., Galceran, M.T., *Anal. Chim. Acta*, 2000, 408, 263-269
- [31] Acedo-Valenzuela, M.I., Galeano-Díaz, T., Mora-Díez, N., Silva-Rodríguez, A., *Anal. Chim. Acta*, 2004, 519, 65-71
- [32] Núñez, O., Kim, J-B., Moyano, E., Galceran, M.T., Terabe, S., *J. Chromatogr. A*, 2002, 961, 65-75
- [33] Quirino, J.P., Aranas, A.T., *J. Chromatogr. A*, 2011, 1218, 7377-7383
- [34] François, Y., Zhang, K., Varenne, A., Gareil, P., *Anal. Chim. Acta*, 2006, 562, 164-170
- [35] Chien, R.L., Burgi, D.S., *J. Chromatogr.*, 1991, 559, 141-152
- [36] R.L. Chien, D.S. Burgi, *J. Chromatogr.*, 1991, 559, 153-161

### III. CONCLUSION

L'étude menée sur le *FESI-Sweep-MEKC* a permis de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu avec cette méthode de préconcentration et d'évaluer l'impact des paramètres expérimentaux. Ainsi, à la suite de la première étude, un protocole d'optimisation simplifié a été proposé. En effet, en choisissant de manière adéquate la longueur de la zone de haute conductivité (HCB), c'est-à-dire de telle sorte que l'ion le plus mobile reste piégé dans cette dernière ce qui est aussi fonction de la conductivité choisie pour le HCB, et en choisissant une concentration en SDS entre 50 et 90 mM, alors seul le temps d'injection et la conductivité de l'échantillon sont à optimiser. De plus, il a été montré qu'il n'est pas utile d'introduire une courte zone d'eau avant l'injection électrocinétique.

Lors de la deuxième partie de cette étude, nous nous sommes attachés à comprendre les différents profils des pics (Aire et Hauteur) obtenus lorsque l'acide phosphorique ou le phosphate de sodium sont utilisés comme HCB. Grâce à de la simulation, il a été montré que des frontières mobiles, à l'état stationnaire ou non, sont créées à cause des différences de concentration en sodium dans les zones occupant le capillaire. Ceci entraîne des variations différentes du champ électrique et en conséquence une concentration par stacking, suite à l'étape de *FESI*, plus efficace quand le phosphate de sodium est utilisé comme HCB. Pour autant, par unité de temps, la quantité de courant mise en jeu dans ce dernier cas est plus faible que lorsque l'acide phosphorique est utilisé comme HCB et en conséquence moins d'analytes sont injectés. Ainsi, pour profiter de l'avantage du phosphate de sodium il est recommandé de travailler à courant constant lors de l'étape d'injection de l'échantillon.

Enfin, toutes ces conclusions ont été validées en développant une méthode de *FESI-Sweep-MEKC* pour l'analyse des « quats » dans une eau de distribution parisienne. La méthode mise en place a permis d'obtenir des LOD cent fois plus faibles que celles rapportées dans de précédents travaux. Toutefois, les LOQ sont pour deux des quats toujours au-dessus des spécifications européennes ; cependant, avec l'utilisation de capillaire à « bulle » il semblerait que ces spécifications soient respectées.

***PARTIE IV- POTENTIEL DES LIQUIDES  
IONIQUES POUR LA PRECONCENTRATION  
ELECTROCINETIQUE IN-SITU EN  
ELECTROPHORESE CAPILLAIRE***



### IV. INTRODUCTION

En 2009, Quirino a introduit une nouvelle méthode de préconcentration (« *Micelle to Solvant Stacking* », MSS) [1] qui nécessite l'utilisation d'une phase micellaire. A la différence du "*sweeping*", la phase micellaire est présente dans l'échantillon et absente du BGE. Comme pour le "*sweeping*", les gains en sensibilité dépendent des interactions entre les analytes et les micelles, et donc de la nature de celles-ci.

Depuis leur présentation en 1914 et le regain d'intérêt dans les années 1990, les liquides ioniques ont été très largement utilisés en chimie en tant que solvant et catalyseur, ou encore matériaux d'électrolyte, ou molécule extractante, et dans les sciences séparatives. Leur intérêt réside dans le fait qu'ils sont considérés comme des composés verts (pression de vapeur saturante faible, stabilité thermique élevée, peu inflammables et facilement recyclables) et qu'ils sont synthétisables « à la demande », permettant ainsi d'avoir des liquides ioniques développant des interactions spécifiques pour une cible donnée. Parmi les nombreuses possibilités, des liquides ioniques à longue chaîne pouvant former des micelles sont disponibles, ce qui en fait des candidats potentiellement intéressants pour la MSS.

Dans ce chapitre, une preuve de concept de l'utilisation d'un liquide ionique à longue chaîne, le tétrafluoroborate de 1-dodécyl-3-méthylimidazolium ( $C_{12}Mim-BF_4$ ) pour la MSS est présentée en utilisant des composés anioniques modèles (deux anti-inflammatoires non-stéroïdiens et deux herbicides). Enfin, dans les conditions optimales, l'utilisation de ce liquide ionique a été comparée à celle du bromure de cétyltriméthylammonium (CTAB), un tensioactif cationique classiquement utilisé en CE.

Cette étude a été menée en collaboration avec J. Quirino (Université de Tasmanie, Hobart, Australie) lors de son séjour à Chimie ParisTech, en qualité de professeur invité, et avec le Dr J. Sirieix-Plenet (Université Paris 6), qui nous a fourni le liquide ionique à longue chaîne.

[1] J.P. Quirino, J. Chromatogr. A, 2009, 1216, 294-299

**Article- Potentiel des liquides ioniques à longue chaîne pour les méthodes de préconcentration : application à la préconcentration par déplacement d'un équilibre de distribution micellaire par un changement de composition hydroorganique.**

**Potential of long chain ionic liquids for on-line sample concentration techniques:**

**Application to micelle to solvent stacking**

Joselito P. Quirino<sup>a,b</sup>, Philippe Anres<sup>b</sup>, Juliette Sirieix- Plénet<sup>b</sup>, Nathalie Delaunay<sup>b</sup>, Pierre Gareil<sup>b</sup>

Journal of chromatography A, 1218 (2011) 5718-5724

<sup>a</sup> Australian Centre for Research on Separation Science, School of Chemistry, University of Tasmania, Hobart, Tasmania 7001, Australia

<sup>b</sup> Laboratoire Physicochimie des Electrolytes, Colloïdes et Sciences Analytiques (PECSA), Chimie ParisTech, CNRS, UPMC Univ Paris 06.

*Keywords: Capillary zone electrophoresis, On-line sample concentration, Micelle to solvent stacking, Ionic liquids, Profens, Herbicides.*

*Non standard abbreviations: Acetonitrile (ACN), Analyte Focusing by Micelle Collapse (AFMC), BackGround Solution (BGS), Critical Micellar Concentration (CMC), CetylTrimethyl Ammonium Bromide (CTAB), Capillary Zone Electrophoresis (CZE), ElectroOsmotic Flow (EOF), Methanol (MeOH), Micellar ElectroKinetic Chromatography (MEKC), Micelles (MC), Micelle to Solvent Stacking (MSS), Micelle to Solvent Stacking Boundary (MSSB), Sensitivity Enhancement Factor (SEF), Sample solution (S), 1-dodecyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate (C<sub>12</sub>-MIM-BF<sub>4</sub>).*

### IV.1. Abstract

The performance of micelle to solvent stacking (MSS) in capillary zone electrophoresis (CZE) was improved for anionic analytes using the long chain ionic liquid type cationic surfactant 1-dodecyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate ( $C_{12}$ -MIM- $BF_4$ ). The peak heights and corrected peak areas of the test profens and herbicides were enhanced up to 59 and 110-fold, respectively when compared to typical injection. These were up to 10 times better compared to the surfactant cetyltrimethyl ammonium bromide as MSS carrier. This performance was attributed to the properties of  $C_{12}$ -MIM- $BF_4$ . MSS requires micelles in the sample for transport of bound analytes to a stacking boundary that contains an organic solvent for effective electrophoretic mobility reversal. The ionic liquid micelles provided better analyte transport properties that resulted from its hydrophobic and pi–pi interaction capabilities. The good solubility of the ionic liquid in high percentages of organic solvent also facilitated a more effective reversal of mobility. The LODs obtained for the test analytes were from 0.06 to 0.12  $\mu\text{g/mL}$ . The linearity  $R^2$  values in terms of peak height and corrected area were  $\geq 0.99$ . The interday repeatabilities (%RSD,  $n = 10$ ,) were 0.5–2.2% for retention time, 1.9–4.7% for corrected areas and 4.1–6.4% for peak heights.

### IV.2. Introduction

The unique properties of ionic liquids made them useful to separation science [1,2]. For example, the negligible vapor pressure, high density and viscosity made room temperature ionic liquids compatible stationary phases in gas chromatography [3,4]. Ionic liquids added into the mobile phase masked the residual silica silanols and reduced the peak tailing in liquid chromatography [5,6]. The cation of ionic liquids provided a positively charged capillary wall coating for the reproducible, pH independent and reversed electroosmotic flow (EOF) in capillary electrophoresis (CE) [7–9]. Ionic liquids were employed as chiral additives and pseudostationary phases in CE [10–12]. They were also used as sweeping carrier for on-line sample concentration or stacking in micellar electrokinetic chromatography (MEKC) [11].

Stacking techniques have enjoyed considerable success in the last decade and have expanded the use of CE techniques especially to the biological, environmental and forensic fields [13–20]. Long injections were allowed by simple manipulation of the sample solution (S) such that the injected analytes were compressed or focused into narrow zones prior to separation. Please refer to the review articles for discussions on the different stacking techniques [13–17]. One of the newer stacking technique, introduced in 2009 is micelle to solvent stacking (MSS) that works only for charged analytes ( $a'$ ) [21]. In the original configuration of MSS in capillary zone electrophoresis (CZE) [22], the S was prepared in a micellar matrix and the background electrolyte or solution (BGS) contained a sufficient percentage of organic solvent, so that analytes can be strongly desorbed from the micelles and their electrophoretic mobility change sign [21,23]. In addition, the analyte and additive have opposite charges.

The focusing in MSS relies on the  $a'$  transport to, and the reversal of the  $a'$  effective electrophoretic mobility ( $\mu_{ep}(a')$ ) at the boundary (MSS boundary or MSSB) between the S and BGS. The effective electrophoretic mobility at the boundary ( $\mu_{ep}(a')_{MSSB}$ ) was described in Ref. [23].

The  $\mu_{ep}(a')_{MSSB}$  is dependent on the effective electrophoretic mobility of the  $a'$   $\mu_{ep}(a')$ , electrophoretic mobility of the micelle  $\mu_{ep}(mc)$ , and retention factor ( $k$ ). For analyte transport to the MSSB, the  $k$  must be sufficiently high for analyte transport by the micelles. For the reversal in mobility, the amount of organic solvent in the BGS should be high enough to lower the  $k$ . This will lead to the change in the sign of the  $\mu_{ep}(a')_{MSSB}$  (i.e., from positive to negative or vice versa). The mobility reversal can also be facilitated by micelle collapse or  $k=0$  [23].

MSS has been applied to the analysis of cationic [21,24–26] and anionic [23,27] analytes in CZE and cationic [28] analytes in MEKC. It is noted that a plug containing the organic solvent was also shown to perform MSS in MEKC [28] and other variations of MSS might appear in the future. The additives studied so far were surfactant (i.e., sodium dodecyl sulfate (SDS) and cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB)) micelles typically used in MEKC [21,23–28].

Here, use of the long chain ionic liquid type cationic surfactant 1-dodecyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate ( $C_{12}$ -MIM- $BF_4$ ) was evaluated for the MSS of anionic compounds. The compounds chosen were biologically and environmentally important profens and herbicides. Method development parameters including the concentration of ionic liquid and electrolyte in the S, the type and amount of organic solvent in the BGS, as well as the S injection time were optimized. The analytical performance (repeatability, linearity) of the MSS CZE methods for the profens and herbicides were also determined. Moreover, the reversal of the  $\mu_{ep}(a')$  was studied in MEKC using  $C_{12}$ -MIM- $BF_4$  and CTAB in the presence of methanol as organic modifier.

### IV.3. Experimental

#### IV.3.1. Apparatus

Electrophoresis experiments were performed on Agilent 3D or 7100 capillary (when stated) electrophoresis systems (Agilent Technologies, Massy, France). Fused-silica capillary of 50  $\mu\text{m}$  i.d. was obtained from Polymicro (Photonlines, Marly-Le-Roi, France). The effective and total length were described in the text or figures. Detection wavelength was set at 210, 214, and 240 nm. The capillary temperature was controlled at 20°C. Ultra-pure water was delivered by a Direct-Q3 UV system (Millipore, Molsheim, France).

#### IV.3.2. Reagents and solutions

$C_{12}$ -MIM- $BF_4$  ( $\geq 99\%$ ) was synthesized according to procedures previously reported [29].  $C_{12}$ -MIM- $BF_4$  ( $\geq 99\%$ ) was prepared by reaction of 1-methylimidazole and an excess of 1-bromododecane followed by metathesis with  $NaBF_4$  using a procedure adapted from the method described [30]. To a solution of  $C_{12}$ -MIM-Br in acetone at room temperature was

## Partie IV – Les liquides ioniques pour la préconcentration en CE

---

added an excess of  $\text{NaBF}_4$ . The mixture was stirred for four days, and then filtered through celite to remove the precipitated bromide salt and the organic phase reduced in vacuo. This was then re-dissolved in dichloromethane and washed several times with fresh water until the  $\text{AgNO}_3$  test was negative. The organic layer was dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and evaporated in vacuo. The residue was lyophilized and the  $\text{C}_{12}\text{-MIM-BF}_4$  was obtained as white powder in 89% yield and characterized by  $^1\text{H NMR}$ . Purity was at least 99%, as checked by NMR and MS. Stock solution of 25 mM  $\text{C}_{12}\text{-MIM-BF}_4$  was prepared by dissolving with the aid of sonication an appropriate amount in ultra-pure water.

Ammonium acetate was purchased from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Hexadimethrine bromide used as EOF reversal agent [31] was purchased from Sigma–Aldrich (L'Isle d'Abeau, France). The test profens (naproxen and carprofen) and herbicides ((4-chloro-2-methylphenoxy)acetic acid and (R)-2-(2,4-dichlorophenoxy)propanoic acid (dichlorprop)), methanol (MeOH), acetonitrile (ACN), formamide and CTAB were also purchased from Sigma–Aldrich. 1 mg/mL individual profens and herbicides solutions were prepared by dissolution in 50:50 MeOH:ultra-pure water. 1% hexadimethrine bromide solution and stock solutions of 300 mM ammonium acetate and 200 mM CTAB were prepared by dissolving an appropriate amount in ultra-pure water. The BGS and S matrix were prepared by mixing appropriate volumes of MeOH, ACN, ultra-pure water and stock solutions of ammonium acetate, CTAB, and  $\text{C}_{12}\text{-MIM-BF}_4$ . The pH of the BGSs (with and without organic solvent) and Ss was 7. This was because ammonium acetate solutions produce solutions at neutral pH [32,33].

### *IV.3.3. Electrophoretic procedures*

Before first use, capillaries were conditioned by successive flushing with 1 M NaOH (20 min), ultra-pure water (10 min), 1% hexadimethrine bromide solution (60 min) and finally BGS (10 min), each under  $\sim 1$  bar. Between each run, capillaries were rinsed with 1% hexadimethrine bromide solution (2 min), ultrapure water (1 min) and finally BGS (5 min). This regimen ensured a constant EOF and repeatable analyses (more than 100 runs). Injections were performed at 50 mbar or using the flush mode ( $\sim 940$  mbar) of the Agilent systems. Voltages were applied at negative polarity for the stacking and separation. Fresh BGS was used to ensure a constant pH for each run. The running currents were below 20  $\mu\text{A}$ .

This low running current implied that electrolysis which could alter the pH of the BGS within the time frame of the experiments did not occur.

### IV.4. Results and discussion

#### IV.4.1. Effect of $C_{12}$ -MIM- $BF_4$ concentration on MSS CZE

For MSS to occur, the concentration of  $C_{12}$ -MIM- $BF_4$  in the S must be higher than the CMC in order to form micelles. This was assessed by using different concentrations (2.5 (B), 5 (C), 7.5 (D), 10 (E) and 15 (F) mM) of  $C_{12}$ -MIM- $BF_4$  in the S matrix using anionic profens (naproxen: pKa = 4.2 (20 °C), log P = 3.1, MW 230.3 g/mol; carprofen: pKa = 4.3 (20 °C), log P = 4.1, MW 273.71 g/mol. Log P were calculated with Molinspiration software) as test analytes and the results are shown in Figure IV-1. The BGS as matrix was also included for comparison in Figure IV-1A. The BGS was 30 mM (final concentration in the water/methanol mixture) ammonium acetate with 50% MeOH, to induce reversal of  $\mu_{ep}(a')$ . The measured pH of the BGS with methanol was 7.0. Separation was in co-EOF mode where the velocities of analytes and EOF were directed to the anode by dynamic coating of the capillary with hexadimethrine bromide. The capillary length was 50 cm (41.5 cm effective), the on-line UV detection was at the anodic side of the capillary, the long injection of S was for 60 s at 50 mbar (approx. 10.5% of the capillary length) and the applied voltage was at -25 kV.

As shown in Figure IV-1, broad peaks were produced with the BGS (see A), as well as with the 2.5 mM ionic liquid matrix (see B). MSS was effective using 5, 7.5 or 10 mM ionic liquid (see C–E). These results suggest that the CMC of  $C_{12}$ -MIM- $BF_4$  in 15 mM ammonium acetate was between 2.5 and 5 mM. For ionic liquid concentrations that were  $\geq 5$  mM, there were micelles in the S for analyte transport. There were no micelles in the 2.5 mM ionic liquid condition, and thus no MSS focusing was observed. However, the too high concentration of ionic liquid (i.e., 15 mM) did not properly induce MSS (see F), likely because there were no reversal of effective mobility in this latter case, due to too high k. The 7.5 mM condition was then chosen for further study (Figure IV-1D). The sample matrix was detected after 7 min.

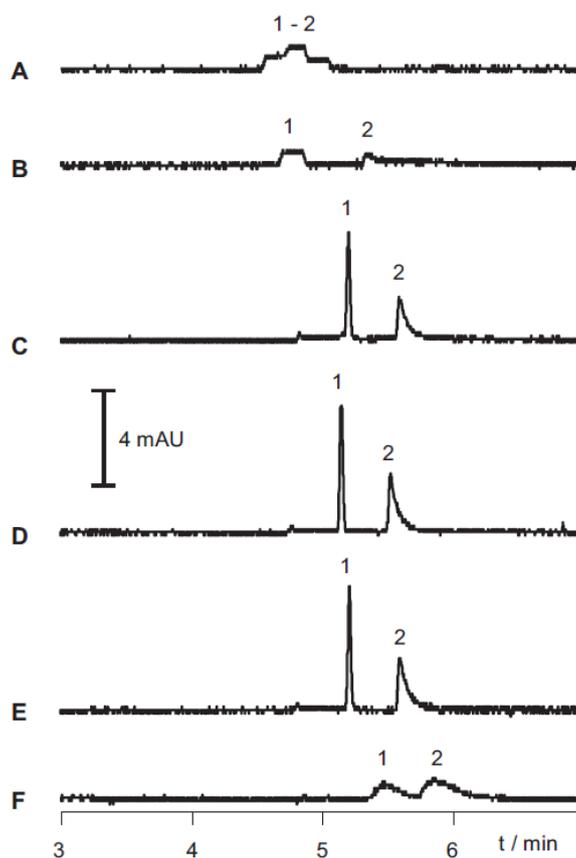


Figure IV-1: Effect of ionic liquid concentration in the *S* on the MSS of profens. BGS: 30 mM ammonium acetate and 50% MeOH (pH 7). *S*: 0.5  $\mu\text{g/mL}$  each of the profens in BGS (A), and in 2.5 (B), 5 (C), 7.5 (D), 10 (E) and 15 (F) mM ionic liquid and 15 mM ammonium acetate (pH 7). *S* injection: 60 s at 50 mbar. Applied voltage:  $-25$  kV. Capillary: hexadimethrine bromide coated fused silica having 50  $\mu\text{m}$  ID and 50 cm total (41.5 cm to the detector). Detection: 240 nm. Peak identity: naproxen (1) and carprofen (2).

### IV.4.2. Elucidation of the $\mu_{ep}(a')$ reversal

In Figure IV-1D, the mobility reversal may be caused by the collapse of the ionic liquid micelles [23]. The reversal was then investigated using hydrocortisone as neutral probe and the results are shown in Figure IV-2.

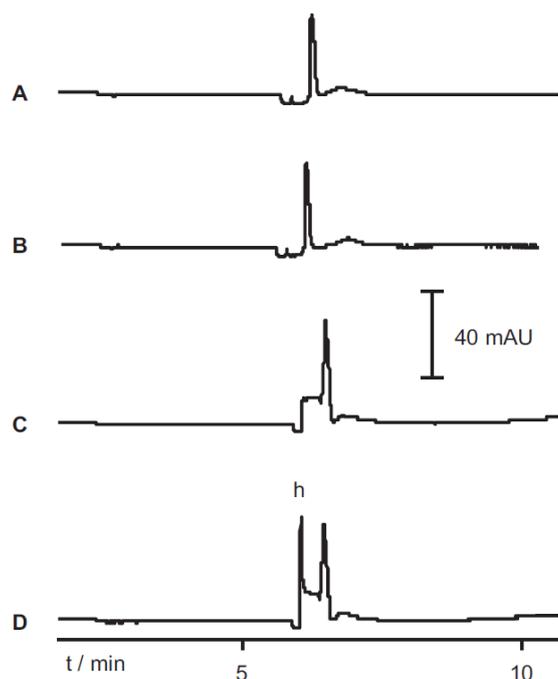


Figure IV-2: MSS and AFMC using ionic liquid. BGS: 30 mM ammonium acetate and 50% MeOH (pH 7). Probe: hydrocortisone (h). MSS S matrix: 7.5 mM ionic liquid and 15 mM ammonium acetate. AFMC S matrix: 7.5 mM ionic liquid and 90 mM ammonium acetate. Injection: 60 s at 50 mbar of MSS S matrix (A), 10 µg/mL of probe in MSS S matrix (B), AFMC S matrix (C), and 10 µg/mL of probe in AFMC S matrix (D). Detection: 210 nm. Applied voltage: -25 kV. Capillary: hexadimethrine bromide; coated fused silica having 50 µm ID and 50 cm total (41.5 cm to the detector).

The conditions were as described in Section 3.1. The injection of S matrix (7.5 mM  $C_{12}$ -MIM- $BF_4$  in 15 mM ammonium acetate) with or without the probe (10 µg/mL) gave the same results (see Figure IV-2A and B). This suggested that collapse did not occur in Figure IV-1D and the mobility reversal was not due to  $k = 0$ . Neutral analyte focusing by micelle collapse (AFMC) [34,35] was however achieved by increasing the concentration of ammonium acetate to 90 mM as shown in Figure IV-2D, where hydrocortisone (h) was detected as a sharp peak. In Figure IV-2D, the concentration of ionic liquid was below the CMC at the dilution boundary between the BGS and S. The micelles collapsed and released the neutral probe at the boundary and continued electrophoresis caused the injected probe molecules to accumulate. The peak for the probe was confirmed by the injection of the matrix used in Figure IV-2D (blank or without the probe) as shown in Figure IV-2C. In addition, the UV spectrum of the sharp peak in Figure IV-2D and of the peak from a typical injection of the probe (at a higher concentration prepared in the BGS) was similar.

### IV.4.3. Effect of type and concentration of organic solvent on MSS CZE

Mobility reversal in MSS using the ionic liquid depends on the amount, as well as the type of organic solvent in the BGS. The effect of different percentages (0, 10, 20, 30, 40 and 50%) of MeOH and ACN were then studied and the results are shown in Figure IV-3. Other conditions were as described in Section 3.1. Broad peaks were observed when there was no organic solvent and MSS occurred when the % of organic solvent was increased. 10% ACN caused MSS of the least hydrophobic analyte naproxen (peak 1) while 20% MeOH was needed to achieve the same focusing. Note that ACN is a less polar solvent compared to MeOH. A higher % of organic solvent (i.e., 30% MeOH and 20% ACN) was needed to focus the more hydrophobic carprofen (peak 2). This was because a higher concentration of organic solvent was needed to effectively reduce the  $k$  of carprofen at the MSSB.

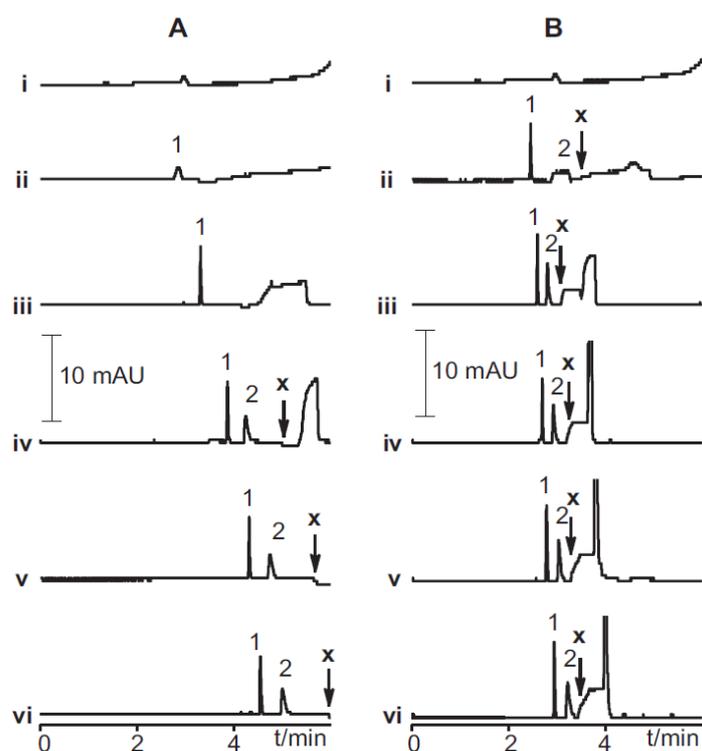


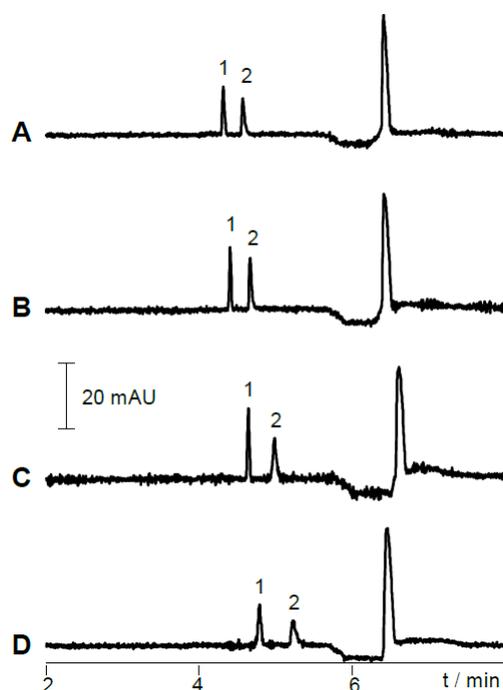
Figure IV-3: Effect of organic solvent (MeOH (A) and ACN (B)) content on the MSS of profens. BGS: 30 mM ammonium acetate and different % (0 (i), 10 (ii), 20 (iii), 30 (iv), 40 (v) and 50 (vi)) of organic solvent. S matrix: 7.5 mM ionic liquid and 15 mM ammonium acetate. The x marks the start of detection of the S matrix. Other conditions and peak ID were the same as in Figure IV-1.

## Partie IV – Les liquides ioniques pour la préconcentration en CE

In addition, the use of MeOH conveniently slowed down the EOF. This caused a larger retention time difference between the focused analytes and the sample matrix (x in Figure IV-3) (see Figure IV-3A). The ionic liquid cation was detected after the sample matrix (not shown). On one hand, when ACN was used as solvent, the sample matrix was detected very close to the focused peaks and thus longer injections of S will not be tolerated (see Figure IV-3B). Further optimization was done using 50% MeOH with the aim of injecting more S.

### IV.4.4. Effect of ammonium acetate concentration in the S

Before optimizing the injection time, the effect of ammonium acetate concentration in the S matrix was considered. In MSS, the conductivity of the S must be matched to a value lower than or equal to that of the BGS to avoid destacking effects [20,22]. Supplementary information Figure IV-1 shows the effect of different concentrations (2.5 (A), 7.5 (B), 15.0 (C) and 30.0 (D) mM) of ammonium acetate in the S on the MSS of the profens. Other conditions were the same as described in Section 3.1 except the injection time was 90 s and the concentration of the profens were increased to 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for improved peak visualization.



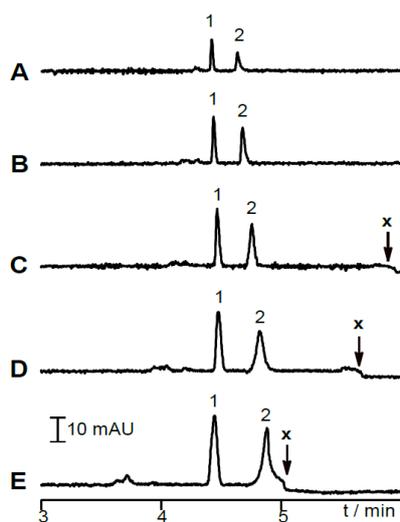
Supplementary information Figure IV-1.: Effect of ammonium acetate concentration in the S on the MSS of profens. BGS: 30 mM ammonium acetate with 50% MeOH (pH 7). S: 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  each of the profens in 7.5 mM IL with 2.5 (A), 7.5 (B), 15.0 (C), and 30.0 (D) mM ammonium acetate. Injection: 90s at 50 mbar. Other conditions and peak ID are the same as is found in Figure IV-1.

## Partie IV – Les liquides ioniques pour la préconcentration en CE

The sharp peaks obtained for all S matrices suggested that there were ionic liquid micelles for analyte transport. The CMC of  $C_{12}$ -MIM- $BF_4$  was below the concentration used (i.e., 7.5 mM). The best results were obtained using 7.5 mM and 10 mM ammonium acetate matrix because the conductivities of these matrices were close to the BGS (e.g., 72% of the BGS with the 7.5 mM matrix). The injection time or length was then optimized using the 7.5 mM matrix.

### IV.4.5. Effect of S injection time

Supplementary information Figure IV-2 shows the effect of injection time (30 (A), 60 (B), 90 (C), 120 (D), and 180 (E) s) at 50 mbar on the MSS of profens (5.3%, 10.5%, 16%, 21.3%, 31.9% of the capillary length, respectively). Other conditions were as described in Section 3.1.



Supplementary Figure IV-2: Effect of S injection time on the MSS of profens. BGS: 30 mM ammonium acetate with 50% MeOH (pH 7). S: 0.5 g/mL each of the profens in 7.5 mM IL with 7.5 mM ammonium acetate. Injection at 50 mbar: 30 (A), 60 (B), 90 (C), 120 (D), and 180 (E) s. The x marks the start of detection of the S matrix. Other conditions and peak ID are the same as is found in Figure IV-1.

The signals improved when the injection was increased from 30 to 90 s (see A–C). When the injection was increased beyond 90 s (see D–E), the peaks broadened with no further increase in peak height. The detection of the S matrix (x in Supplementary information Figure IV-2) also became closer to the focused peaks. This means that the effective separation length after

## Partie IV – Les liquides ioniques pour la préconcentration en CE

focusing decreased with the increase in injection time. It is noted that for quantitation, the focused analytes must be detected in the BGS zone and before this could happen the focused analytes must migrate through the S matrix zone. The optimum injection time for the test profens was chosen at 90 s.

### IV.4.6. MSS of herbicides

Another set of compounds (i.e., herbicides (4-chloro-2-methylphenoxy)acetic acid:  $pK_a = 3.7$  (25 °C),  $\log P = 2.3$ , MW 200.6; dichlorprop:  $pK_a = 3.0$  (25 °C),  $\log P = 2.9$ , MW 235) were tested using the conditions developed for the profens. The electrophoretic mobilities of the herbicides were higher than the profens and thus a longer 75 cm capillary was used in order to extend the capillary separation length. The applied voltage was also increased to  $-30$  kV. Figure IV-4 shows the effect of injection time (10 s (A), 20 (B), 30 (C), 35 (D), and 40 (E) s) at  $\sim 950$  mbar, flush mode of the Agilent CE (23%, 45%, 67%, 78%, 89% of the capillary length, respectively). Flush mode was used to reduce the analysis time.

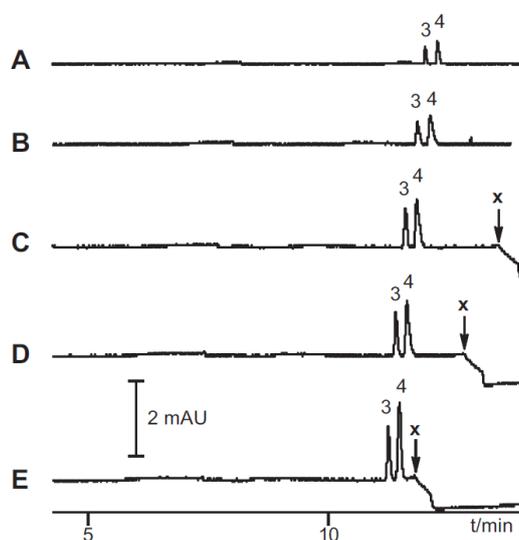


Figure IV-4: Effect of S injection time on the MSS of herbicides. S: 0.5  $\mu\text{g/mL}$  each of the herbicides in 7.5 mM ionic liquid and 7.5 mM ammonium acetate. Injection (flush at  $\sim 1$  bar): 10 (A), 20 (B), 30 (C), 35 (D), and 40 (E) s. The x marks the start of detection of the S matrix. Peak ID: (4-chloro-2-methylphenoxy)acetic acid (3) and dichlorprop (4). Capillary length: 75 cm total (66.5 cm to the detector). Other conditions were the same as in Figure IV-1.

## Partie IV – Les liquides ioniques pour la préconcentration en CE

Similar to the profens results, the effective separation length was reduced by the injection of S. This is shown in Figure IV-4C–E, where the gap between the elution of the sample matrix (x in Figure IV-4) and the focused analytes narrowed when the injection time was increased from 30 (C), 35 (D) to 40 (E) s. Injections longer than 40 s lead to the detection of analytes in the S matrix zone (data not shown). However, the peak heights and corrected peak areas (peak area/retention time) continued to increase up to an injection time of 40 s. This injection created a much longer plug of S and thus better signal improvements when compared to the profens. The reversal in mobility is easier for the less hydrophobic analytes (log P values) and this explained the better results obtained for the herbicides.

### IV.4.7. Analytical performance

The sensitivity enhancement factors (SEFs) were determined using Eq. (1).

$$SEF = \frac{\text{peak response in MSS}}{\text{peak response in typical injection}} \times \frac{[\text{concentration typical injection}]}{[\text{concentration MSS injection}]} \quad (1)$$

where the peak response was peak height or corrected peak area. Figure IV-5 shows representative typical (A and C) and optimized MSS (B and D) CZE electropherograms for the test profens (A and B) and herbicides (C and D). The profens and herbicides in typical injections were 25 and 50 times more concentrated, respectively compared to the MSS injections. The SEFs (height) for the profens naproxen (peak 1) and carprofen (peak 2) were 27 and 24, respectively.

The SEFs (area) were higher at 40 and 29, correspondingly. For the herbicides (4-chloro-2-methylphenoxy)acetic acid (peak 3) and dichlorprop (peak 4), the SEFs (height) were 50 and 35, respectively. SEFs (area) were again higher at 92 and 79, correspondingly. For the herbicides, the analytical performance of the MSS injection shown in Figure IV-4D (35 s at ~1 bar) was used. This was because in the longer injection shown in Figure IV-4E (40 s at ~1 bar), the S matrix zone was detected close to peak 4. If the 40 s MSS injection (Fig.4E) was compared to the typical injection (Figure IV-5C), the SEFs (height) were 59 and 49 for (4-chloro-2-methylphenoxy)acetic acid and dichlorprop, respectively. The SEFs (area) were 110 and 93, correspondingly.

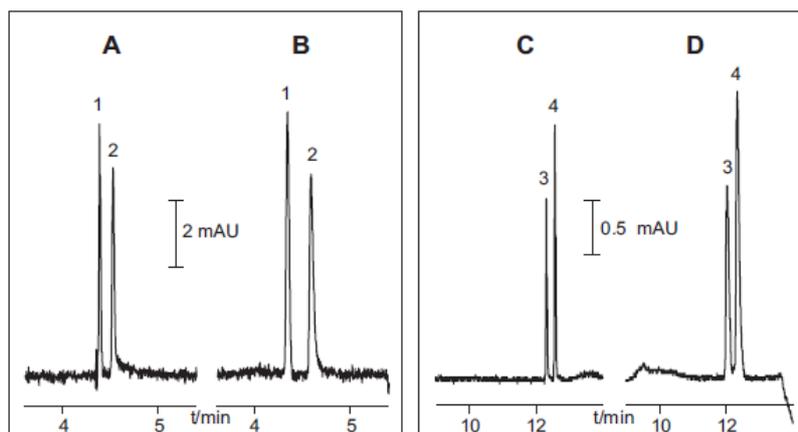


Figure IV-5: Typical (A and C) versus optimum MSS (B and D) injection of profens (A and B) and herbicides (C and D). Profen concentration (each): 12.5 (A) and 0.5 (B)  $\mu\text{g/mL}$ . Herbicide concentration (each): 25 (C) and 0.5 (D). S matrix: 7.5 mM ionic-liquid and 7.5 mM ammonium acetate. Injection: 3 (A), 90 (B) and 5 (C) s at 50 mbar and 35 s at  $\sim 1$  bar. Capillary length: 50 cm total and 41.5 cm effective (A and B) and 75 cm total and 66.5 cm effective (C and D). Instrument: Agilent 3D (A and B) and Agilent 7100 (C and D) Other conditions and peak ID were the same as in Figures IV-1 and IV-4.

Table IV-1 lists the linearity (concentration range, equation of the line for peak height and corrected peak area,  $R^2$ ), LOD, and repeatability (intraday and interday for retention time, corrected peak area and peak height) results for typical and MSS injections in Figure IV-5. The  $R^2$  (area and height) of  $\geq 0.99$  for both typical and MSS injections were notable. The intraday and interday repeatabilities (%RSD  $n = 10$ , for retention time, area and height) obtained in typical injection were  $\leq 6.9\%$  and  $\leq 6.5\%$ , respectively. The values obtained in the MSS injections were comparable at  $\leq 5.6\%$  and  $\leq 6.4\%$ , correspondingly. The LODs obtained from the MSS injection compared to typical injection were 29, 28, 63, and 46 times better for naproxen, carprofen, (4-chloro-2-methylphenoxy)acetic acid and dichlorprop, respectively. The LODs obtained for the herbicides (i.e., 0.11–0.12  $\mu\text{g/mL}$ ) were higher than the profens (i.e., 0.06–0.07  $\mu\text{g/mL}$ ) because of the lower UV extinction coefficient of the herbicides.

## Partie IV – Les liquides ioniques pour la préconcentration en CE

	Peak 1	Peak 2	Peak 3	Peak 4
<b>Typical injection</b>				
Linearity				
<i>Range</i>	2.5-50	2.5-50	10-100	10-100
<i>Equation of line (height)</i>	y= 0.486x + 0.370	y= 0.440x + 0.620	y= 0.031x + 0.044	y= 0.042x + 0.105
<i>R<sup>2</sup></i>	0.997	0.997	0.999	1.000
<i>LOD (S/N=3) µg/mL</i>	1.75	1.94	7.37	5.07
Repeatability (%RSD, n=10)				
<i>Intraday (RT, corr, area, height)</i>	0.2, 2.1, 3.1	0.3, 1.1, 3.9	0.2, 6.9, 6.3	0.2, 5.3, 4.6
<i>Interday (RT, corr, area, height)</i>	0.1, 4.4, 3.5	0.2, 2.9, 4.9	0.7, 4.9, 6.2	0.7, 6.5, 5.8
<b>MSS</b>				
Linearity				
<i>Range</i>	0.125-2	0.125-2	0.25-2	0.25-2
<i>Equation of line (height)</i>	y= 12.938x + 1.533	y= 11.078x + 1.154	y= 1.378x + 0.204	y= 2.003x + 0.197
<i>R<sup>2</sup></i>	0.997	0.996	0.995	0.985
<i>Equation of line (height)</i>	y= 7.500x + 0.592	y= 7.489x + 0.843	y= 0.872x + 0.061	y= 1.327x + 0.127
<i>R<sup>2</sup></i>	0.992	0.994	0.998	0.999
<i>LOD (S/N=3) µg/mL</i>	0.06	0.07	0.12	0.11
Repeatability (%RSD, n=10)				
<i>Intraday (RT, corr, area, height)</i>	0.3, 3.5, 4.4	0.4, 3.9, 5.0	1.0, 2.5, 3.2	1.0, 2.9, 5.6
<i>Interday (RT, corr, area, height)</i>	0.5, 4.3, 5.1	0.6, 4.7, 6.4	2.1, 2.2, 4.1	2.2, 1.9, 4.2

Table IV-1: Analytical performance of typical and MSS injection CZE. (Conditions are found in Figure V-5.

### IV.4.8. C<sub>12</sub>-MIM-BF<sub>4</sub> versus CTAB as micelle carriers for MSS

#### IV.4.8.1. $\mu_{ep}(a')$ reversal in MEKC using C<sub>12</sub>-MIM-BF<sub>4</sub> and CTAB

The use of C<sub>12</sub>-MIM-BF<sub>4</sub> and CTAB as micelle carriers for MSS was compared. First, the reversal of  $\mu_{ep}(a')$  was studied in MEKC mode using C<sub>12</sub>-MIM-BF<sub>4</sub> and CTAB as pseudostationary phases and MeOH as organic modifier in the BGS. The four analytes were tested and the results are shown in Figure IV-6A and B using CTAB and C<sub>12</sub>-MIM-BF<sub>4</sub> in the BGS, respectively. The current optimum MSS conditions were obtained with 10 mM CTAB and 7.5 mM C<sub>12</sub>-MIM-BF<sub>4</sub>, and thus these concentrations were used for this study. It is emphasized that with these concentrations of CTAB or C<sub>12</sub>-MIM-BF<sub>4</sub>, there were micelles in the Ss for analyte transport. The ammonium acetate concentration in the BGS was kept at 7.5

## Partie IV – Les liquides ioniques pour la préconcentration en CE

---

mM that was the same as the concentration used in the optimized S matrix (see Figure IV-5). The MeOH content in the BGS was varied at 10 (i), 20 (ii), 30 (iii), 40 (iv), 50 (v) and 60 (vi) %.

The analytes were detected after the EOF at low % MeOH and were detected before the EOF when the % MeOH was increased. The reversal in the  $\mu_{ep}(a')$  was given by the detection of the charged analytes after the EOF with low % MeOH to the detection before the EOF with higher % MeOH. The decrease in the  $k$  that reversed the  $\mu_{ep}(a')$  could be due to the absence of the micelles in the separation solution.

With CTAB in the BGS, the test analytes were detected after the EOF (arrow) when MeOH was <50% (see Figure IV-6A, i–iv). The direction of the effective mobility was to the cathode or driven by the cationic CTAB micelles. Note that UV detection was at the anodic side since the overall velocity was to the anode because of the strong anodic EOF produced by the cationic surfactant. The retention time of the analytes increased when the % MeOH was increased from 10 to 30 (see Figure IV-6A, i–iii). This cannot be fully explained by the decrease in the EOF velocity (see arrows in Figure IV-6A) and the cathodic velocity of the analytes seemed to increase with the increase in % MeOH. This may be due to the effect of organic solvent on the structure of the micelles [36].

The interaction between micelles and analytes weakened when the % MeOH was increased to 50 and caused the detection of analytes closer to the EOF (see Figure IV-6A, iv). These interactions weakened further when MeOH was >50% (see Figure IV-6A, v and vi). The analytes were detected before the EOF and this indicated the reversal of the  $\mu_{app}(a')$ s. The reversal of the  $\mu_{app}(a')$ s was most probably due to the absence of CTAB micelles at this high % MeOH. The migration order of the analytes obtained without CTAB was similar to that with CTAB containing >50% MeOH. The interaction between negatively charged analytes and CTAB monomers was not strong enough to afford detection of analytes after the EOF. Note that only positively charged molecules or those that significantly interact with the cationic CTAB will be detected after the EOF.

A different scenario was observed with the ionic liquid in the MEKC BGS. The analytes were not detected as peaks when the MeOH concentration was <30% (see Figure IV-6B, i and ii). No peaks were found even after 30 min of electrophoresis. Stable baselines were produced and peaks were observed when MeOH was  $\geq 30\%$ . The stability was attributed to the improved solubility of the ionic liquid at higher amounts of MeOH [35]. With 30% MeOH, the effective mobilities of the faster analytes (peaks 3, 4 and 1) were reversed as evidenced by

## Partie IV – Les liquides ioniques pour la préconcentration en CE

these peaks eluting before the EOF (arrow). The mobility of the most hydrophobic analyte (peak 2) did not reverse and thus this analyte eluted after the EOF. The mobilities of all the analytes reversed when MeOH was >30% (see Figure IV-6B, iv–vi). The migration order of the analytes obtained without ionic liquid was similar to that with ionic liquid containing >30% MeOH.

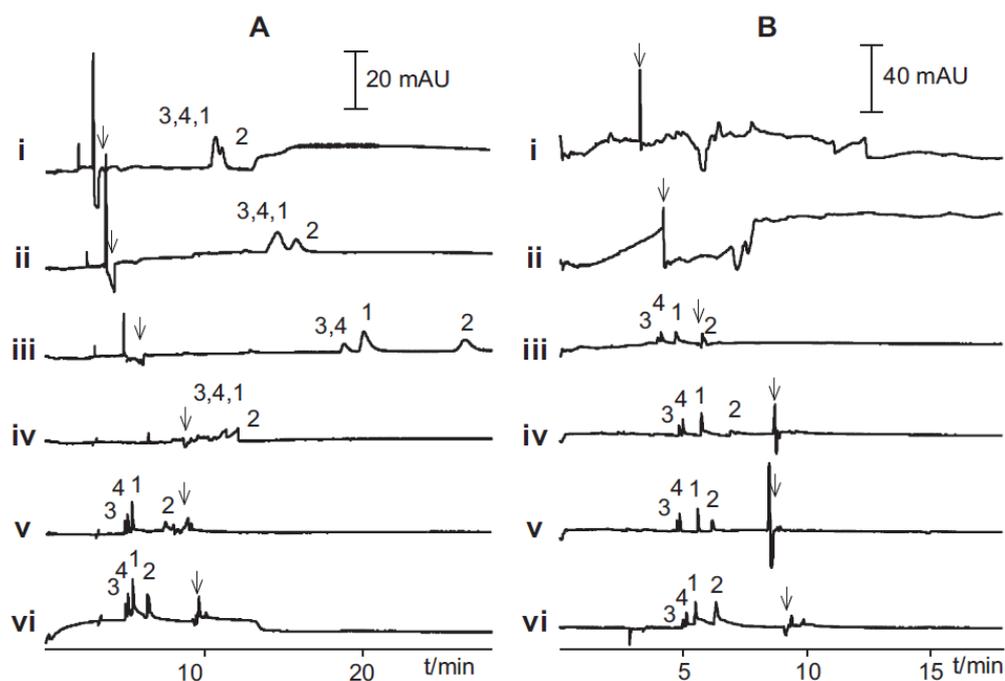
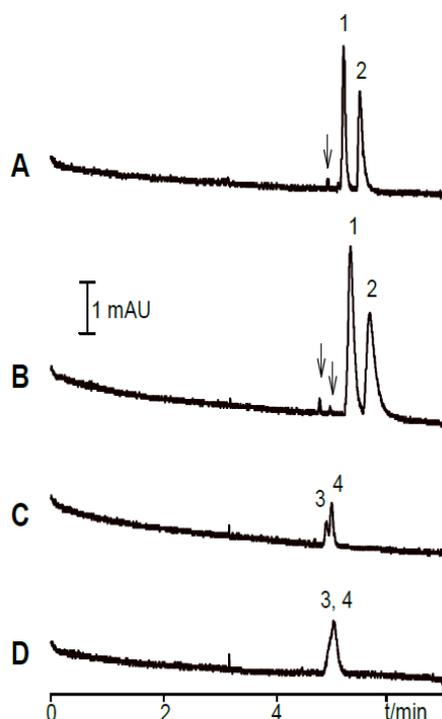


Figure IV-6: MEKC profiles of the test analytes using a BGS that contained 10 mM CTAB (A) and 7.5 mM ionic liquid (B) and 7.5 mM ammonium acetate. The MeOH content was 10 (i), 20 (ii), 30 (iii), 40 (iv), 50 (v) and 60 (vi) %. S: 50  $\mu$ g/mL of each test analyte in 10 mM CTAB, 7.5 mM ammonium acetate, 30% MeOH (A) or in 7.5 mM ionic liquid and 7.5 mM ammonium acetate and 30% MeOH (B). The pH of all solutions were neutral. Injection at 50 mbar: 3 s. Detection: 214 nm. Capillary length: 50 cm total and 41.5 cm effective. Applied voltage: -25 kV. Peak ID: see Figure IV-5. Arrow denotes the EOF which was monitored by addition of formamide to the S.

### IV.4.8.2. MSS using CTAB

MSS of the four test analytes were studied using 10 mM CTAB and 7.5 mM ammonium acetate as S matrix and the results are shown in Supplementary Information Figure IV-3. The CZE BGS contained 60% MeOH for efficient reversal of the mobility (see Figure IV-6A, vi). There was no significant improvement in peak heights when the injection time was increased from 30 (A and C) to 60 (B and D) s (50 mbar) for both profens (A and B) and herbicides (C

and D). The peaks broadened (B and D) and even overlapped (D) when the injection was increased. The SEFs obtained with the 30 s injection were <10.



Supplementary information Figure IV-3: MSS injection of profens (A and B) and herbicides (C and D) using CTAB as micelle forming agent. BGS: 30 mM ammonium acetate with 60% MeOH (pH 7). Concentration (each): 0.5  $\mu\text{g/mL}$  profens and 2  $\mu\text{g/mL}$  herbicides. S matrix: 10 mM CTAB with 7.5 mM ammonium acetate. Injection: 30 (A and C) and 60 (B and D) s at 50 mbar. Capillary length: 50 cm total and 41.5 cm effective. Applied voltage: -25 kV. Detection: 240 nm. Peak ID: see Figure IV-1 and IV-4 (main manuscript). The arrows denote the profen molecules that were not transported to the MSS boundary for focusing.

### IV.4.8.3. $C_{12}$ -MIM- $\text{BF}_4$ and CTAB comparisons

Longer injections were tolerated with  $C_{12}$ -MIM- $\text{BF}_4$  (i.e., 90 s at 50 mbar) as MSS carrier and thus the SEFs obtained were at least 6 times better compared to CTAB (i.e., 30 s at 50 mbar). In addition, the small peaks from the injected analyte molecules that were not transported to the MSSB for focusing (see Supplementary Information Figure IV-3A and B) were not observed using the ionic liquid. The better performance was due to the properties of the ionic liquid. The imidazolium ring and the long chain of  $C_{12}$ -MIM- $\text{BF}_4$  served as targets for  $\pi$ - $\pi$  and hydrophobic interaction, respectively. The former interaction was absent with CTAB and

this interaction improved the transport of analytes to the MSSB in the presence of the ionic liquid. Second, the reversal in  $\mu_{ep}(a')$  was easier with the ionic liquid since it occurred at lower % of MeOH (see Section 3.8.1). Finally, the reversal in  $\mu_{ep}(a')$ s was enhanced by the good solubility of the ionic liquid in organic solvents [37]. This solubility reduced the  $k$  or interaction between the analytes and ionic liquid micelles at the MSSB.

### IV.4. Conclusion

The long chain ionic liquid type cationic surfactant C<sub>12</sub>-MIM-BF<sub>4</sub> was successfully employed as MSS carrier for the on-line sample concentration of test anionic small molecule profens and herbicides in CZE. The performance of C<sub>12</sub>-MIM-BF<sub>4</sub> was found better than CTAB due to the ionic liquid's unique properties. It will be interesting to test other ionic liquids and charged surfactants for the MSS of cationic and anionic solutes.

### Acknowledgements

JPQ thanks Prof. Paul R. Haddad, ACROSS and the University of Tasmania for the support and the Australian Research Council for a Future Fellowship (FT100100213). JPQ is also grateful to Chimie ParisTech for providing a two-month invited professor position and supporting his research stay in Paris.

### IV.5. References

- [1] S.A. Shamsi, N.D. Danielson, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 1729.
- [2] P.P. Sun, D.W. Armstrong, *Anal. Chim. Acta* 661 (2010) 1.
- [3] C.F. Poole, K.G. Furton, B.R. Kersten, *J. Chromatogr. Sci.* 24 (1986) 400.
- [4] F. Pacholec, H.T. Butler, C.F. Poole, *Anal. Chem.* 54 (1982) 1938.
- [5] W. Zhang, L.-J. He, Y. Gu, X. Liu, S. Jiang, *Anal. Lett.* 36 (2003) 827.
- [6] W. Zhang, L.-J. He, X. Liu, S. Jiang, *Chin. J. Chem.* 22 (2004) 549.
- [7] E.G. Yanes, S.R. Gratz, M.J. Baldwin, S.E. Robison, A.M. Stalcup, *Anal. Chem.* 73 (2001) 3838.
- [8] T.-F. Jiang, Y.-L. Gu, B. Liang, J.-B. Li, Y.-P. Shi, Q.-Y. Ou, *Anal. Chim. Acta* 479 (2003) 249.
- [9] T.-F. Jiang, Y.-H. Wang, Z.-H. Lv, *J. Anal. Chem.* 61 (2006) 1108.
- [10] Y. Francois, A. Varenne, E. Juillerat, P. Gareil, *J. Chromatogr. A* 1155 (2007) 134.
- [11] H. Su, M. Lan, Y. Hsieh, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5313.
- [12] V.P. Schnee, G.A. Baker, E. Rauk, C.P. Palmer, *Electrophoresis* 27 (2006) 4141.
- [13] S.L. Simpson Jr., J.P. Quirino, S. Terabe, *J. Chromatogr. A* 1184 (2008) 504.
- [14] K. Sueyoshi, F. Kitagawa, K. Otsuka, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 2650.
- [15] A.T. Aranas, A.M. Guidote Jr., J.P. Quirino, *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (2009) 175.
- [16] Z. Mala, A. Slampova, P. Gebauer, P. Bocek, *Electrophoresis* 30 (2009) 215.
- [17] M.C. Breadmore, M. Dawod, J.P. Quirino, *Electrophoresis* 32 (2011) 127.
- [18] M. Lagarrigue, A. Bossée, A. Bégos, N. Delaunay, A. Varenne, P. Gareil, B. Bellier, *Electrophoresis* 30 (2009) 1522.
- [19] M. Lagarrigue, A. Bossée, A. Bégos, N. Delaunay, A. Varenne, P. Gareil, B. Bellier, *J. Chromatogr. A* 1178 (2008) 239.
- [20] C. Sarazin, N. Delaunay, A. Varenne, J. Vial, C. Costanza, V. Eudes, J.-J. Minet, P. Gareil, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 6971.
- [21] J.P. Quirino, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 294.
- [22] J.W. Jorgenson, K.D. Lukacs, *Science* 222 (1983) 266.
- [23] A.M. Guidote Jr., J.P. Quirino, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 6290.
- [24] J.P. Quirino, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 7776.
- [25] H.-D. Zhu, C.-L. Ren, S.-Q. Hu, X.-M. Zhou, H.-L. Chen, X.-G. Chen, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 733.

## Partie IV – Les liquides ioniques pour la préconcentration en CE

---

- [26] X.-F. Yin, Z. Li, S.-H. Zhang, C.-X. Wu, C. Wang, Z. Wang, *Chin. Chem. Lett.* 22 (2011) 330.
- [27] J.P. Quirino, A.M. Guidote Jr., *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 1004.
- [28] L. Liu, X. Deng, X. Chen, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 175.
- [29] L. Gaillon, J. Sirieix-Plénet, P. Letellier, *J. Solution Chem.* 33 (2004) 1333.
- [30] P.A.Z. Suarez, J.E.L. Dullius, S. Einloft, R.F. De Souza, J. Dupont *Polyhedron* 15 (1996) 1217.
- [31] M.T. Galceran, L. Puignou, M. Diez, *J. Chromatogr. A* 732 (1996) 167.
- [32] R.J. Williams, C.M. Lyman, *J. Am. Chem. Soc.* 54 (1932) 1911.
- [33] C.J. Schollenberger, *J. J. Am. Chem. Soc.* 54 (1932) 2568.
- [34] J.P. Quirino, P.R. Haddad, *Anal. Chem.* 80 (2008) 6824.
- [35] J.P. Quirino, *Electrophoresis* 30 (2009) 875.
- [36] C.P. Palmer, S. Terabe, *Anal. Chem.* 69 (1997) 1852.
- [37] M. Vaher, M. Koel, M. Kaljurand, *J. Chromatogr. A* 979 (2002) 27.

### IV. CONCLUSION

Cette étude a permis d'évaluer le potentiel d'un liquide ionique à longue chaîne,  $C_{12}Mim-BF_4$ , en tant qu'agent micellaire pour la MSS. Les paramètres influençant le mécanisme de changement de signe de la mobilité électrophorétique, à savoir la concentration en  $C_{12}Mim-BF_4$ , la nature et la concentration du solvant organique présent dans le BGE, la conductivité de l'échantillon et la durée d'injection ont été optimisées. Ainsi pour des eaux ultra-pures dopées, des LOD de 60 et 70 ppb ont été obtenues pour le naproxène et le carprofène ; pour l'acide 4-chloro-2-méthylphénoxyacétique et le dichlorprop, des LOD de 120 et 110 ppb ont été obtenues. En comparaison des LOD atteintes avec la CZE, des gains en sensibilité allant de 27 à 61 ont été obtenus avec la MSS.

Cette méthode de préconcentration a aussi été développée et optimisée pour les mêmes composés, mais cette fois-ci avec comme tensioactif le CTAB. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus avec le  $C_{12}Mim-BF_4$  et il a été montré qu'avec ce liquide ionique les gains en sensibilité sont plus élevés d'un facteur 10 environ. Ceci a été attribué aux propriétés du liquide ionique, à savoir une meilleure solubilité dans le BGE (à cause du solvant organique) et à des affinités plus fortes pour les analytes grâce aux interactions  $\pi$ - $\pi$ .

Bien que cette méthode n'ait pas été appliquée à des échantillons réels, elle permet toutefois d'envisager des applications où des liquides ioniques permettant de développer des interactions plus spécifiques pour les analytes seraient utilisés. Ainsi, des composés d'intérêt pourraient être sélectivement préconcentrés puis analysés.

***PARTIE V- FAISABILITE DE L'UTILISATION  
D'APTAMERE POUR LA PRECONCENTRATION  
ELECTROCINETIQUE IN-SITU SELECTIVE***



# PRECONCENTRATION ELECTROKINETIQUE *IN SITU* SELECTIVE PAR SWEEPING PAR UN APTAMERE : PREUVE DE CONCEPT AVEC L'ANALYSE DE TRACE D'OCHRATOXINE A DANS LE VIN

Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Professeur Eric Peyrin (Département de Pharmacochimie Moléculaire, Université Joseph Fourier, Grenoble).

*Abbréviations : AFB1 : Aflatoxine B1. APT : aptamère anti-OTA. BB : Binding Buffer. OTA : Ochratoxine A. OTB : Ochratoxine B.*

## V.1. Introduction

Le *sweeping*, qui peut être défini comme l'accumulation de proche en proche d'un soluté grâce à un balayage de la zone échantillon par un agent micellaire ou complexant, est à ce jour la méthode de préconcentration électrocinétique *in-situ* la plus utilisée [1]. Les gains en sensibilité dépendent fortement des interactions du soluté pour l'agent de préconcentration. Ainsi, une manière d'améliorer ces gains est d'utiliser des agents micellaires ou complexants sélectifs qui développent de fortes interactions pour une cible donnée. Dans ce sens, les anticorps et plus récemment les aptamères sont des candidats idéaux, puisqu'ils peuvent présenter de grandes sélectivités et de grandes affinités pour des cibles données. De plus, à notre connaissance, il n'y a aucun article publié qui relate l'utilisation d'anticorps ou d'aptamères pour la préconcentration par *sweeping*.

Les aptamères sont des oligonucléotides de longueur le plus souvent comprise entre 20 et 60 nucléotides. Ils sont synthétisés par une méthode combinatoire de sélection *in-vitro* appelée « *Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment (SELEX)* » en fonction de leur aptitude à reconnaître une cible à partir d'une banque aléatoire contenant jusqu'à  $10^{15}$  séquences différentes (ADN ou ARN) [2]. Ils présentent plusieurs avantages par rapport aux

## Partie V – Les aptamères pour la préconcentration en CE

---

anticorps puisqu'ils ont, de manière générale, de meilleures affinités et spécificités pour les cibles sélectionnées, ils résistent mieux aux solvants, leur synthèse est bien plus rapide, leur régénération ne prend que quelques minutes (plusieurs heures pour les anticorps) [3,4,5] et ils peuvent être générés contre n'importe quelle cible, petite ou macromolécule [6,7].

Parmi les aptamères disponibles commercialement, celui dirigé contre l'ochratoxine A (OTA) a été décrit en 2008 par Cruz-Aguado et Penner [8]. Ils ont montré que cet aptamère développe de fortes affinités pour l'OTA ainsi qu'une grande spécificité et ils l'ont utilisé pour l'analyse de l'OTA via un capteur bioanalytique fluorescent [9].

L'Ochratoxine A (Figure V-1) est une mycotoxine produite par plusieurs champignons microscopiques (espèces *Penicillium* et *Aspergillus*) et est naturellement présente dans de nombreux produits végétaux (céréales, vin, café, cacao) que l'espèce humaine consomme [10-16]. Selon le Centre International de Recherche sur le Cancer, elle est génotoxique, tératogène, immunotoxique, neurotoxique et cancérigène avec pour cible le rein [17,18]. Ainsi, pour limiter l'exposition humaine, l'Union Européenne a fixé des concentrations limites dans les fruits secs (10 ppb), le café torréfié et les produits du café (5 ppb) et du raisin (2 ppb) [19].

Comme l'OTA est naturellement fluorescente, les méthodes analytiques, dans la majorité des cas, utilisent la fluorescence comme détection. Différentes stratégies ont été développées telles que des tests ELISA avec des anticorps anti-OTA [20,21] ou des biocapteurs [22-27]. Ces méthodes bioanalytiques sont intéressantes car elles peuvent être mises en oeuvre avec des systèmes portables, mais des effets de matrice apparaissent souvent, ce qui peut entraîner des faux positifs. En conséquence, les méthodes séparatives sont des alternatives particulièrement intéressantes et la chromatographie en phase liquide couplée avec la détection de fluorescence [28,29,30] ou la spectrométrie de masse [31,32] sont les méthodes les plus répandues. L'électrophorèse capillaire (CE), à bien moindre mesure, a aussi été utilisée, avec des travaux préliminaires en 1995 [33]. En 1998, Corneli et Maragos utilisèrent la CE avec une détection par fluorescence induite par laser (LIF) pour l'analyse de l'OTA [34] et depuis cette stratégie a été appliquée à différentes matrices (vin, sang) [35,36]. Pour abaisser les limites de détection (LOD), différents auteurs ont utilisé des méthodes de préconcentration électrocinétique *in-situ* [36,37].

Toutefois, pour (i) atteindre les concentrations fixées par l'Union Européenne, (ii) s'affranchir des problèmes de matrices et (iii) préserver la durée de vie des colonnes (en HPLC), une étape d'extraction/purification est nécessaire, que ce soit en CE [35-41] ou en HPLC [42-44]. La préparation d'échantillon la plus répandue est sans doute l'extraction sur

## Partie V – Les aptamères pour la préconcentration en CE

---

phase solide avec des colonnes d'immunoaffinité, puisqu'elle permet, grâce à l'utilisation des anticorps, d'obtenir des spécificités élevées [45-48]. Cependant, ces colonnes coûtent chères, ont des durées de vie limitées, et parfois, un manque de spécificité a été observé [49].

C'est pourquoi des colonnes d'oligoadsorbants avec des aptamères ont été développées pour la préparation d'échantillon [50-53] et des LOD de 1 ppb pour l'OTA dans de la bière ont été obtenues [52]. Bien que cette approche soit très intéressante et ouvre de belles opportunités pour l'analyse de l'OTA dans les matrices réelles, il demeure, toutefois, quelques désavantages inhérents à ce type de support, à savoir une durée de vie limitée et le temps nécessaire à l'élaboration d'un tel outil.

Nous avons donc considéré le concept d'une nouvelle alternative qui utilise les avantages des aptamères (grandes affinités pour l'OTA, spécificité élevée, stabilité en milieu libre) pour l'analyse d'OTA par électrophorèse capillaire. Pour cela, l'aptamère anti-OTA a été utilisé comme agent de *sweeping* combiné avec une détection par LIF. La spécificité de cette approche a été vérifiée en utilisant deux toxines très recherchées, l'ochratoxine B (OTB) qui ne diffère de l'OTA que par un atome de chlore et l'Aflatoxine B1 (AFB1), qui n'est pas ionisable.

### V.2. Matériels et procédures électrophorétiques

#### V.2.1. Produits et solutions

Le trizma base (> 99,9 %), l'ochratoxine A (> 98 %), l'aflatoxine B1 (> 98 %), l'ochratoxine B en solution dans l'acétonitrile (11,3 µg/mL), le CaCl<sub>2</sub> et le KCl ont été achetés à Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France). L'acétonitrile (ACN) de qualité HPLC et le méthanol (MeOH) ont été achetés à VWR (Fontenay-sous-Bois, France). L'aptamère anti-OTA (> 85 %, APT) a été acheté chez Eurogentec (Angers, France). L'eau ultra-pure (UP) a été délivrée par un système Direct-Q3 UV (Millipore, Molsheim, France).

La composition du tampon de capture (*Binding Buffer*, BB) utilisé est la suivante : tampon tris 10 mM (pH 8,5 ajusté avec du HCl 0,1 M), KCl 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 20 mM (force ionique 75 mM). Des solutions mères d'ochratoxine A dans le MeOH (2,40 g/L) et d'aflatoxine B1 dans l'ACN (0,68 g/L) ont été préparées en dissolvant les quantités nécessaires dans le solvant organique et conservées au congélateur (-20°C). Le tampon était

## Partie V – Les aptamères pour la préconcentration en CE

---

préparé chaque jour et filtré sur des membranes disque de 0,20 µm (Polytétrafluoroéthylène, VWR) avant utilisation.

L'aptamère a été livré sous la forme d'aliquot de 763 µg. Ces aliquots ont été utilisés en préparant au fur et à mesure des solutions à 1,348 mM dans le tampon, stockées au congélateur (-20°C). Avant chaque utilisation de ces solutions, l'aptamère devait être renaturé en le chauffant pendant 5 min au bain marie (80-90°C) puis refroidi à température ambiante pendant 45 min.

### ***V.2.2 Matériels***

Toutes les expériences ont été réalisées avec un appareil d'électrophorèse capillaire d'Agilent Technologies HP 3DCE (Massy, France) équipé soit d'un DAD (lampe au deutérium) programmé à 200 nm pour la détection de l'aptamère (bande passante de 20 nm, référence à 350 nm et une bande passante de 80 nm) soit d'un laser Melles Griot LC-500 à 325 nm (Voisins-le-Bretonneux, France) avec un détecteur ZETA-LIF Evolution de Picometrics (Toulouse, France). Les paramètres du détecteur étaient les suivants : temps de montée (rise time) de 0,02 s et photomultiplicateur à 750 V. La température au sein du capillaire a été fixée à 25°C. Un ordinateur équipé du logiciel HP 3D Chemstation a permis de contrôler l'appareil de CE et d'analyser les données. Les séparations ont été faites avec des capillaires de silice greffée avec du polyacrylamide linéaire de 45,5 cm (longueur effective 30 cm) x 50 µm de diamètre interne (Photonlines, Marly-le-Roi, France).

### ***V.2.3 Procédures électrophorétiques***

Les capillaires ont été greffés par du polyacrylamide linéaire (LPA) selon la procédure décrite dans la Partie II (Cf p 71). La qualité du greffage a été vérifiée en LIF selon la procédure de Vigh avec l'AFB1 à 1 ppm comme marqueur neutre dans le tampon [54].

Les mobilités de l'OTA et de l'OTB ont été mesurées selon la procédure suivante : premièrement, une zone étroite d'OTA (500 ppb dans le tampon) ou d'OTB (565 ppb dans le tampon) a été injectée hydrodynamiquement (50 mbars, 5 s), puis simultanément, une tension de -15 kV et une pression de 20 mbars ont été appliquées jusqu'à la détection en LIF de l'OTA ou de l'OTB ; deuxièmement, la même procédure a été appliquée mais la mobilisation s'est fait uniquement par l'application d'une pression (20 mbars). Les mobilités de l'OTA et

## Partie V – Les aptamères pour la préconcentration en CE

---

de l'OTB ont ainsi pu être mesurées par différence entre les deux temps de migration. La mobilité de l'aptamère a été mesurée en déterminant, avec une détection UV, le temps de migration obtenu suite à l'injection d'une solution à 5  $\mu\text{M}$  dans le tampon (50 mbars, 5 s) et application d'une tension de -15 kV.

Pour vérifier si les complexes APT/OTA et APT/OTB fluoresçaient à 325 nm, la procédure suivante a été appliquée : un créneau large d'OTA à 500 ppb ou d'OTB à 565 ppb dans le tampon a été injecté (50 mbars, 30 s, 7 % du volume du capillaire) puis mobilisé sous pression (50 mbars) et la hauteur du signal a été mesurée ; la même procédure a été répétée, mais avec l'injection d'un créneau d'une solution contenant l'OTA à 500 ppb (1,2  $\mu\text{M}$ ) ou l'OTB à 565 ppb (1,5  $\mu\text{M}$ ) et l'APT à 5  $\mu\text{M}$  dilués dans le tampon.

L'aptitude de l'APT à concentrer par *sweeping* l'OTA et la sélectivité de ce processus ont été vérifiées par la procédure suivante : le capillaire a été conditionné par le BB contenant une concentration en aptamère variant de 0 à 40  $\mu\text{M}$ , puis une solution d'OTA (500 ppb dans le BB, 1,2  $\mu\text{M}$ ), d'OTB (565 ppb dans le BB, 1,5  $\mu\text{M}$ ) ou d'AFB1 (1 ppm dans le BB, 3,2  $\mu\text{M}$ ) a été injectée (50 mbars, 30 s). Ensuite, une tension de -15 kV et une pression de 20 mbars ont été appliquées en même temps avec le BB contenant une concentration en aptamère variant de 0 à 40  $\mu\text{M}$  à l'entrée du capillaire.

L'analyse du vin blanc (Gros Plant sur lie, 2010) a été réalisée de la manière suivante : le vin a été dopé avec différentes concentrations d'OTA (500, 50 et 0 ppb), puis le pH a été ajusté en le diluant six fois avec le BB deux fois plus concentré (20 mM de Tris, 40 mM de  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM de KCl ajusté à pH 8,5) ; ensuite, la conductivité de ce vin dilué et dopé avec l'OTA a été ajustée à celle du BB en le diluant avec de l'eau UP et une dilution finale de 10 par rapport au vin de départ a été atteinte ; enfin, cette solution a été analysée par électrophorèse capillaire en l'injectant (50 mbars, 60 s) dans le capillaire préalablement conditionné par le BB contenant 40  $\mu\text{M}$  d'aptamère, puis une tension de -15 kV a été appliquée jusqu'à la détection du complexe APT/OTA.

### V.3. Résultats et discussions

La séquence de l'aptamère anti-OTA décrite par Cruz-Aguado et Penner est représentée en Figure V-1. D'après leurs travaux [8], il présente une grande affinité pour l'OTA, avec une constante de dissociation ( $K_D$ ) de 50 nM dans le tampon suivant : Tris 10 mM, pH 8,5, NaCl 120 mM, KCl 5 mM et  $\text{CaCl}_2$  20 mM. De plus, la spécificité de

## Partie V – Les aptamères pour la préconcentration en CE

l'aptamère est très élevée puisque l'OTB, une molécule de structure très proche de l'OTA (seule la présence d'un chlore diffère, voir Figure V-1), ne présente, dans ces conditions, qu'un  $K_D$  de 5  $\mu\text{M}$ . Cependant, ce tampon n'étant pas adéquat pour l'électrophorèse capillaire à cause de sa force ionique très élevée (195 mM), il a dû être légèrement modifié en supprimant le NaCl. En effet, le  $\text{CaCl}_2$ , étant indispensable pour la formation du complexe OTA/APT et le KCl primordial pour la conservation de la géométrie antiparallèle de l'aptamère n'ont pas pu être supprimés. La force ionique de l'électrolyte est ainsi de 75 mM seulement.

A 5'-GATCGGGTGTGGGTGGCGTAAAGGGAGCATCGGACA-3'

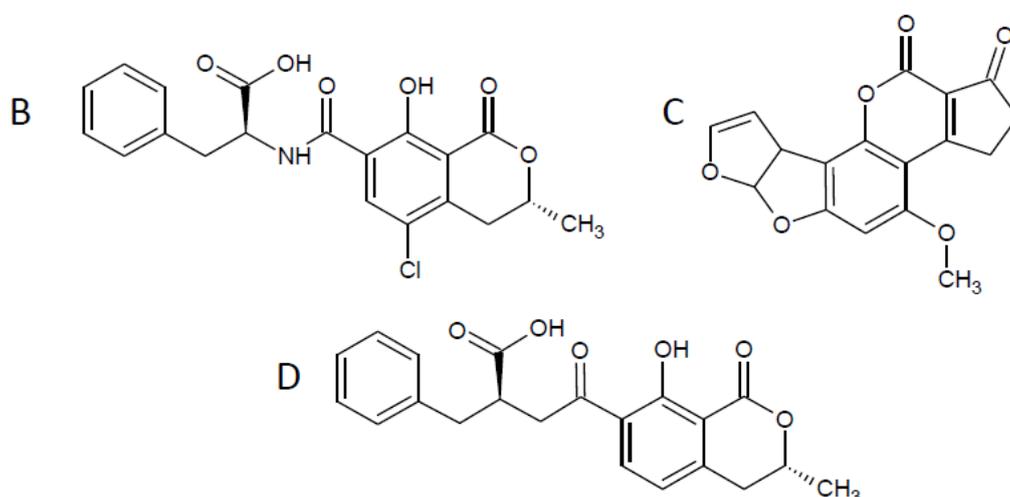


Figure V-1 : A, séquence de l'aptamère anti-ochratoxine A ; B, structure de l'ochratoxine A (pKa 4,3 et 7,2); C, structure de l'aflatoxine B1 ; D, structure de l'ochratoxine B (pKa 4,3 et 7,2).

### V.3.1. Mobilités électrophorétiques

Le *sweeping* peut être défini comme l'accumulation de proche en proche du soluté par une molécule extractante qui pénètre dans la zone échantillon. Il est donc nécessaire qu'il y ait une différence de mobilité électrophorétique entre l'agent extractant (ici l'aptamère) et les molécules cibles (l'OTA, l'OTB et l'AFB1). C'est pourquoi il a fallu mesurer les différentes mobilités des espèces dans le BB.

L'AFB1 est une molécule neutre ne possédant aucune fonction acido-basique et donc sa mobilité électrophorétique est nulle (Figure V-1). Bien que l'OTA et l'OTB soient, dans les

## Partie V – Les aptamères pour la préconcentration en CE

conditions données, doublement chargées négativement, leurs mobilités électrophorétiques sont faibles dans ce milieu, en raison de la présence des ions  $\text{Ca}^{2+}$ , susceptibles de complexer ces deux molécules. C'est pourquoi leurs mobilités électrophorétiques ont été déterminées selon la procédure indiquée dans le paragraphe 2.3 et les résultats sont donnés dans le Tableau V-1. La mobilité de l'aptamère a pu quant à elle être mesurée sans difficulté avec une détection UV, car il n'émet aucun signal en fluorescence (Tableau V-1). Là aussi, la mobilité électrophorétique est plus faible que celle attendue en général pour un oligomère, ce qui peut s'expliquer par une complexation avec l'ion  $\text{Ca}^{2+}$ .

	Ochratoxine A	Ochratoxine B	Aptamère
Mobilité électrophorétique ( $10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )	$- 3 \pm 0,5$	$- 4 \pm 0,5$	$- 15 \pm 0,5$

Tableau V-1 : mobilités électrophorétiques de l'ochratoxine A, de l'ochratoxine B et de l'aptamère anti-ochratoxine A, mesurées dans le tampon suivant : Tris 10 mM, pH 8,5,  $\text{CaCl}_2$  20 mM, KCl 5 mM. Capillaire de silice greffé LPA, avec un écoulement électroosmotique mesuré nul.

La mobilité de l'écoulement électroosmotique dans ces conditions a aussi été mesurée dans un capillaire de silice vierge et celle-ci est d'environ  $+ 15 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Celle-ci étant de même amplitude que celle de l'aptamère, mais de signe opposé, il a donc fallu travailler dans des conditions sans écoulement électroosmotique. C'est pourquoi nous avons utilisé des capillaires greffés par du polyacrylamide linéaire. Ainsi, il est possible d'envisager la configuration proposée à savoir la pénétration de l'aptamère dans la zone échantillon qui va entraîner une concentration par *sweeping*, puisque la mobilité de l'aptamère est environ trois fois plus grande que celle de l'OTA et de l'OTB.

### V.3.2. Fluorescence du complexe aptamère/ochratoxine

Dans la configuration envisagée, suite à l'avancement de l'aptamère dans la zone échantillon un complexe APT/OTA se forme. C'est donc sous la forme complexée avec l'aptamère que l'OTA est ensuite détectée par fluorescence. Il était donc primordial de vérifier si ce complexe émet de la fluorescence dans les conditions envisagées. Comme montré sur la Figure V-2, le signal de fluorescence de l'OTA est deux fois plus important que celui du complexe OTA/APT. En effet, pour une excitation à 325 nm, une hauteur de signal de 1,1 RFU est observée pour l'OTA seul (1,2  $\mu\text{M}$ ), alors que celle-ci est de 0,6 RFU quand

## Partie V – Les aptamères pour la préconcentration en CE

elle est complexée avec l'aptamère. Il y a donc une atténuation du signal par rapport à l'OTA libre ; de plus, comme attendu, l'atténuation du signal dépend de la concentration en aptamère dans une gamme de concentration donnée en relation avec le  $K_D$ .

La même procédure a été appliquée pour le complexe APT/OTB et une atténuation du signal beaucoup moins élevée a été observée (les données ne sont pas présentées), ce qui est cohérent avec une constante de formation du complexe plus faible.

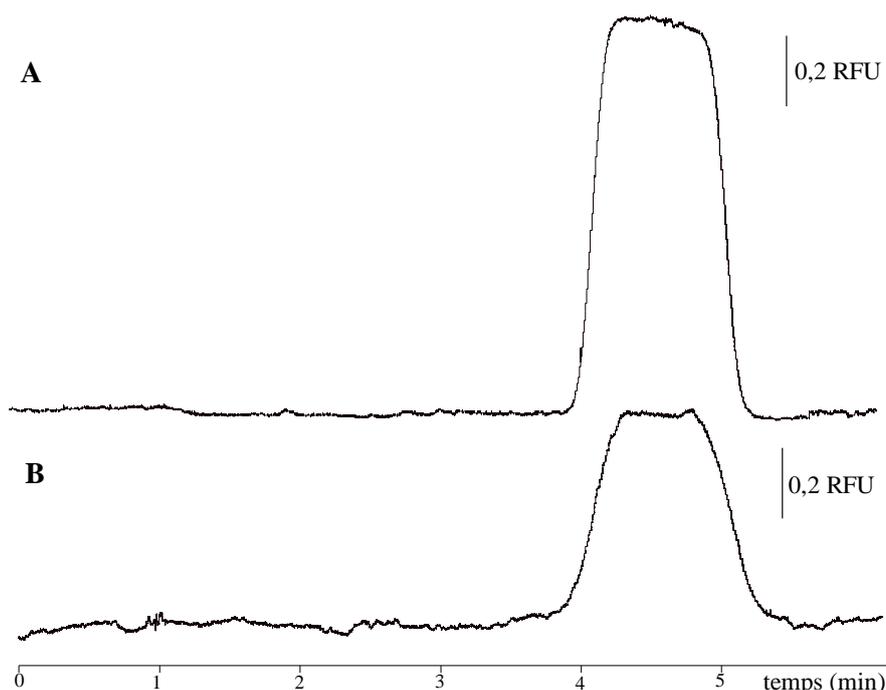


Figure V-2 : Comparaison des signaux de fluorescence de l'OTA libre et du complexe APT/OTA dans le tampon de capture, BB (Tris 10 mM, pH 8,5, CaCl<sub>2</sub> 20 mM, KCl 5 mM). A, injection de l'OTA à 500 ppb dans le BB (50 mbars, 30 s) puis mobilisation par pression (50 mbars) avec le BB. B, injection d'une solution contenant l'OTA à 500 ppb (1,2  $\mu$ M) et l'aptamère à 5  $\mu$ M dans le BB (50 mbars, 30 s) puis mobilisation par pression (50 mbars) avec le BB.

### V.3.3 *Sweeping de l'ochratoxine A par l'aptamère*

Dès lors que la détection du complexe APT/OTA par fluorescence est possible, le potentiel de l'aptamère à concentrer par *sweeping* l'OTA a été testé. Pour cela, le capillaire a été préalablement conditionné avec le BB contenant de l'aptamère, puis une large zone d'OTA (7 % du volume du capillaire) a été introduite à l'entrée du capillaire, et enfin une tension a été appliquée, simultanément à une pression, avec à l'entrée du capillaire un réservoir contenant le BB avec la même concentration d'aptamères. Les signaux de

## Partie V – Les aptamères pour la préconcentration en CE

fluorescence obtenus sont représentés en Figure V-3. La pression a été appliquée en même temps que la tension afin de pouvoir visualiser plus rapidement la zone d'analyte injecté.

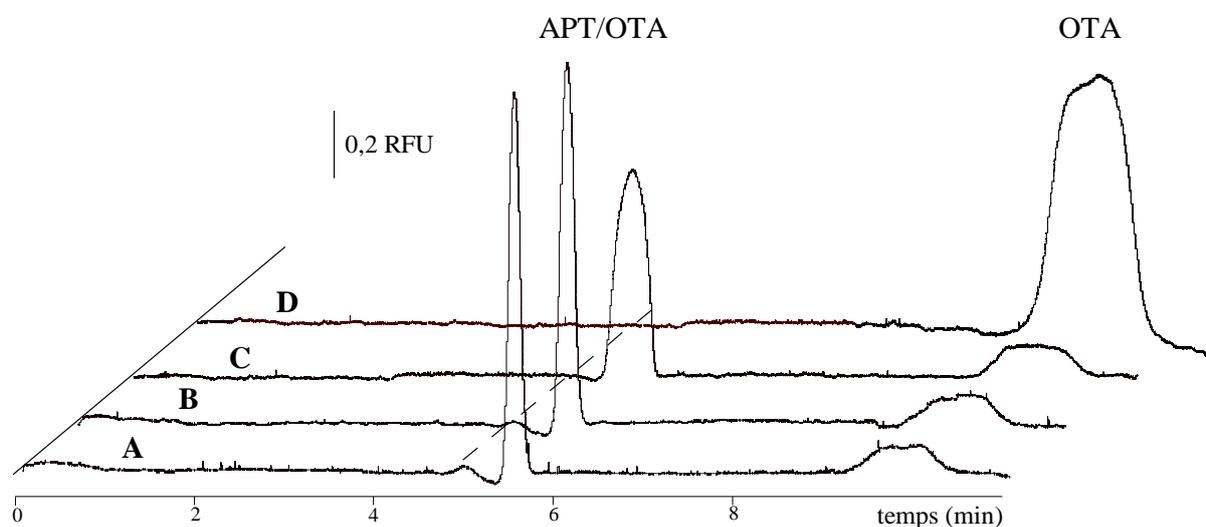


Figure V-3 : Mise en évidence du *sweeping* de l'ochratoxine A par l'aptamère anti-ochratoxine A et influence de la concentration en aptamère présent dans le tampon. Capillaire conditionné par le tampon de capture (composition voir Figure 2) contenant différentes concentrations en aptamère, puis injection de l'ochratoxine A à 500 ppb (1,2  $\mu\text{M}$ ) dans le tampon sans aptamère (50 mbars, 30 s), puis mobilisation par pression (20 mbars) et tension (-15 kV) simultanées. Concentration de l'aptamère dans le tampon : 40  $\mu\text{M}$  (A), 30  $\mu\text{M}$  (B), 10  $\mu\text{M}$  (C) et 0  $\mu\text{M}$  (D).

La Figure V-3 montre qu'à partir d'une concentration en aptamère de 10  $\mu\text{M}$  dans le BB, un pic, celui de l'OTA entraîné par l'aptamère, apparaît vers 5,5 min et que ce même pic s'affine avec l'augmentation de la concentration en aptamère. On remarque également, que quelle que soit la concentration en aptamère, un second massif détecté vers 9 min subsiste et que la largeur de ce massif reste constante. Il est difficile de relier de façon quantitative les aires et les hauteurs des signaux aux concentrations en OTA leur correspondants, car l'amplitude du signal de fluorescence dépend de la concentration en aptamère. Le premier pic correspond logiquement au complexe APT/OTA formé pendant le *sweeping*. Le fait que ce pic soit détecté à un temps indépendant de la concentration en aptamère laisse penser que ce pic migre avec la mobilité absolue du complexe et que, dans cette zone, la formation du complexe est totale. Néanmoins, un massif migrant à la vitesse de l'OTA libre est détecté. Sa présence pourrait s'expliquer par une concentration insuffisante d'aptamère pur ou ayant la bonne configuration. Pour lever ce doute, en partant de la valeur du  $K_D$  de Cruz-Aguado et

## Partie V – Les aptamères pour la préconcentration en CE

---

Penner, la concentration en ochratoxine A libre non complexée en assimilant que la complexation se fait dans un réacteur fermé a été calculée comme montré ci-dessous :

$$[OTA] = \frac{K_D \times [APT / OTA]}{[APT]} \quad (1)$$

avec [OTA] la concentration en ochratoxine A libre, [APT/OTA] la concentration en ochratoxine A complexée avec l'aptamère (1,2 µM parce que la complexation est supposée totale) et [APT] la concentration en aptamère (10 µM car le calcul a été fait pour la concentration en aptamère la plus faible).

En faisant ce calcul, une concentration résiduelle d'ochratoxine A libre non complexée de 6 nM est trouvée lorsqu'une concentration de 10 µM d'aptamère est utilisée. Bien que l'on ne puisse pas calculer la concentration en OTA libre à partir des expériences, vu l'intensité des signaux observés on peut conclure qu'il reste bien plus que 6 nM d'OTA libre. C'est pourquoi, il est envisageable que la constante de dissociation soit plus élevée que celle rapportée par Cruz-Aguado et Penner, car le tampon de séparation est légèrement différent et donc une optimisation de celui-ci semble indispensable. En outre, la température fixée à 25°C diminue peut-être le  $K_D$  du complexe, d'autant plus que la température d'équilibre au sein du capillaire est probablement plus élevée que celle fixée, du fait de l'effet Joule. Enfin, l'utilisation d'une tension pour la mobilisation est peut-être une source de dénaturation de l'aptamère. Toutefois, l'utilisation d'une telle stratégie, à savoir la pénétration de l'aptamère dans la zone échantillon pour concentrer par *sweeping* l'OTA grâce à une tension, est favorable à la formation du complexe, puisque l'on se retrouve dans la même configuration que les réacteurs à piston. En effet, lorsque la formation du complexe est considérée de manière dynamique, il faut alors non plus considérer les concentrations, comme dans l'équation (1), mais les flux qui sont le produit des vitesses par les concentrations. En prenant les mêmes valeurs de concentration que dans l'équation (1), on trouve une concentration en ochratoxine A libre de 3 nM, soit deux fois plus faible qu'avec le calcul fait en mode statique.

### V.3.4 Sélectivité du processus de *sweeping*

La sélectivité du processus de *sweeping* par l'aptamère anti-ochratoxine A a été vérifiée en effectuant les mêmes expériences présentées dans le paragraphe précédent, mais en utilisant comme composé cible soit l'OTB soit l'AFB1.

## Partie V – Les aptamères pour la préconcentration en CE

La Figure V-4 présente les résultats obtenus avec l'OTB. Tout d'abord, de manière étonnante, un créneau n'a pas été observé lorsque l'OTB a été introduite dans le capillaire et ensuite mobilisée par pression et tension.

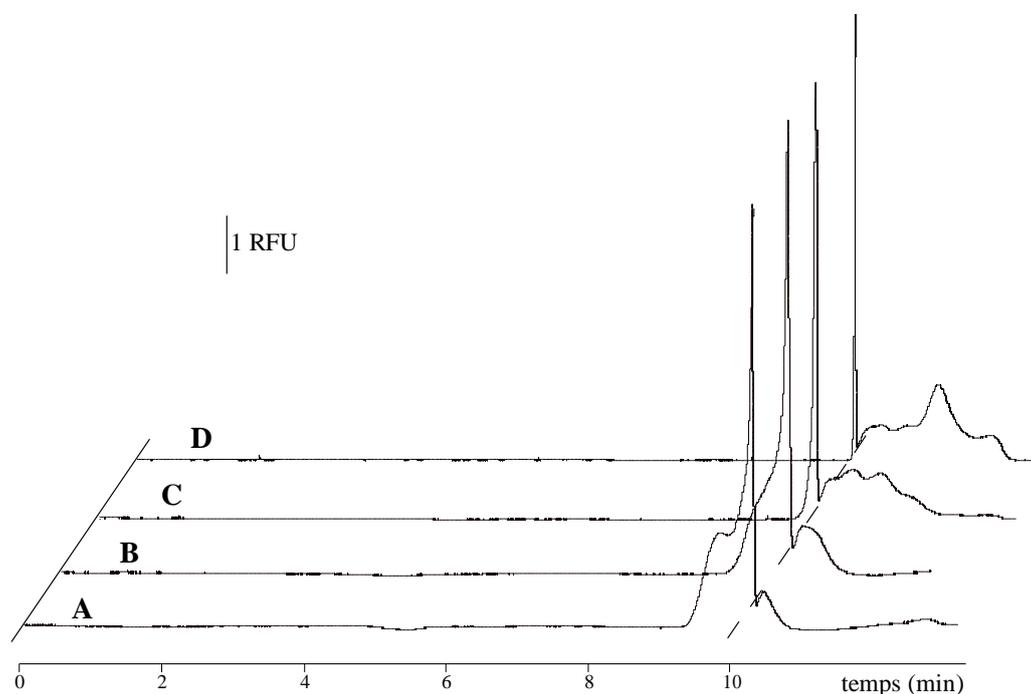


Figure V-4 : Evaluation de la sélectivité du *sweeping* par l'aptamère anti-ochratoxine A sur l'ochratoxine B en fonction de la concentration en aptamère anti-OTA présent dans le tampon. Capillaire conditionné par le tampon de capture (composition, voir Figure 2) contenant différentes concentrations en aptamère. Injection de l'Ochratoxine B à 565 ppb (1,5 µM) dans le tampon (50 mbars, 30 s). Mobilisation par pression (20 mbars) et tension (-15 kV), appliquées simultanément. Concentration de l'aptamère dans le tampon : 40 µM (A), 30 µM (B), 10 µM (C) et 0 µM (D).

En absence d'aptamère dans le tampon (Figure V-4 D), un profil constitué d'un pic fin émergeant d'un massif déformé est observé. Ce comportement est d'autant plus surprenant que lorsqu'uniquement une pression est utilisée, un profil ayant la forme d'un créneau est observé, comme attendu. On peut donc mettre en cause la pureté de l'OTB car l'OTB a été fournie en solution avec une pureté non spécifiée. Toutefois, les Figures V-4A-D montrent également que l'étalement de ce profil se réduit lorsque la concentration de l'aptamère augmente et le profil est détecté de plus en plus tôt. Ce phénomène traduit un léger effet de *sweeping*. Enfin, en comparaison avec la Figure V-3 sur laquelle le pic du complexe APT/OTA était observé vers 5,5 min, aucun pic n'est observé à ce temps et donc son signal ne serait pas perturbé.

## Partie V – Les aptamères pour la préconcentration en CE

La Figure V-5 présente les résultats de l'étude de sélectivité similaire menée avec l'AFB1. Un seul niveau de concentration en aptamère dans le BB (40  $\mu\text{M}$ ) a été réalisé. Le profil de l'AFB1 libre, obtenu en absence d'aptamère anti-OTA dans le tampon, n'est pas du tout modifié quand l'aptamère est ajouté dans le BB. De plus, aucun pic potentiellement interférent n'est observé vers 5,5 min, au temps de migration du complexe APT/OTA. Tout comme pour l'OTB, ces expériences montrent la sélectivité de l'aptamère anti-OTA pour concentrer sélectivement cette toxine.

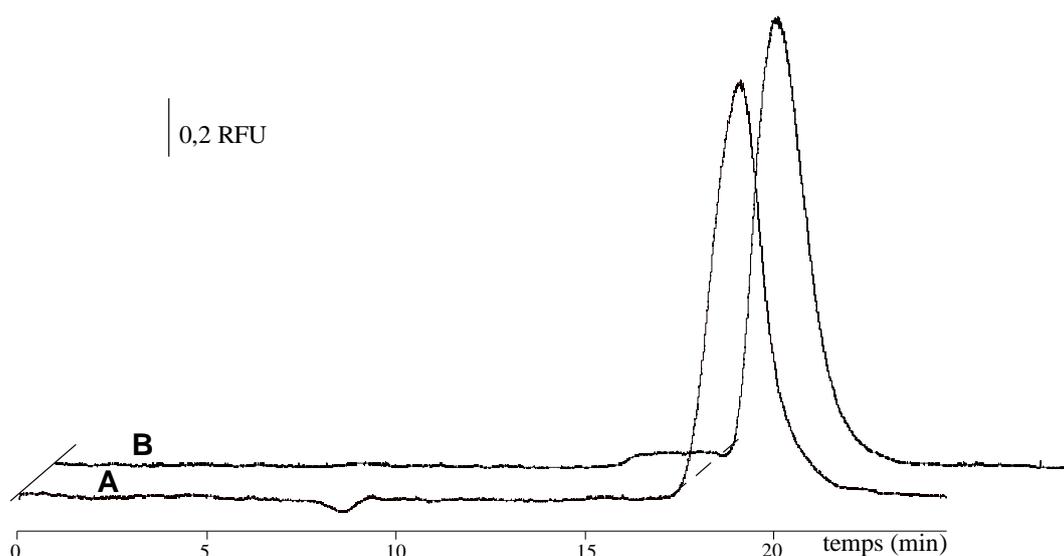


Figure 5 : Evaluation de la sélectivité du *sweeping* par l'aptamère anti-ochratoxine A présent dans le tampon sur l'Aflatoxine B1. Capillaire conditionné par le tampon de capture contenant 40  $\mu\text{M}$  (A) ou 0  $\mu\text{M}$  d'aptamère (B). Injection de l'Aflatoxine B1 à 1 ppm dans le tampon, 3,2  $\mu\text{M}$  (50 mbars, 30 s), puis mobilisation par pression (20 mbars) et tension (-15 kV) appliquées simultanément.

### V.3.5 Analyse d'un vin dopé avec de l'ochratoxine A

Pour valider le concept de préconcentration électrocinétique sélective *in-situ* par un aptamère et pour évaluer son potentiel avec une matrice réelle complexe, un vin blanc dopé avec de l'OTA a été analysé avec l'ébauche de méthode développée.

Comme l'ont souligné Cruz-Aguado et Penner dans leur article [8], la constante de dissociation du complexe APT/OTA dépend beaucoup du pH et ils recommandent de travailler à un pH au dessus de 8. Le pH du vin a donc été mesuré et celui-ci était de 2,9 ; il a donc dû être augmenté en le diluant avec du BB plus concentré (deux fois plus) que celui utilisé pour la séparation. Au final, avec un facteur de dilution de 10, un pH de 8,35 a été

## Partie V – Les aptamères pour la préconcentration en CE

obtenu. C'est donc cette solution (dopée avec différentes concentrations d'OTA avant l'ajustement du pH) qui a été analysée en injectant un grand volume dans le capillaire conditionné par le BB contenant 40  $\mu\text{M}$  d'aptamère, puis en appliquant une tension uniquement pour la mobilisation. Le volume d'injection (14 % du volume du capillaire) correspond au volume maximal injectable, c'est-à-dire qu'au-dessus de ce volume, l'aire du pic augmente mais la hauteur non. Les résultats sont présentés sur la Figure V-6.

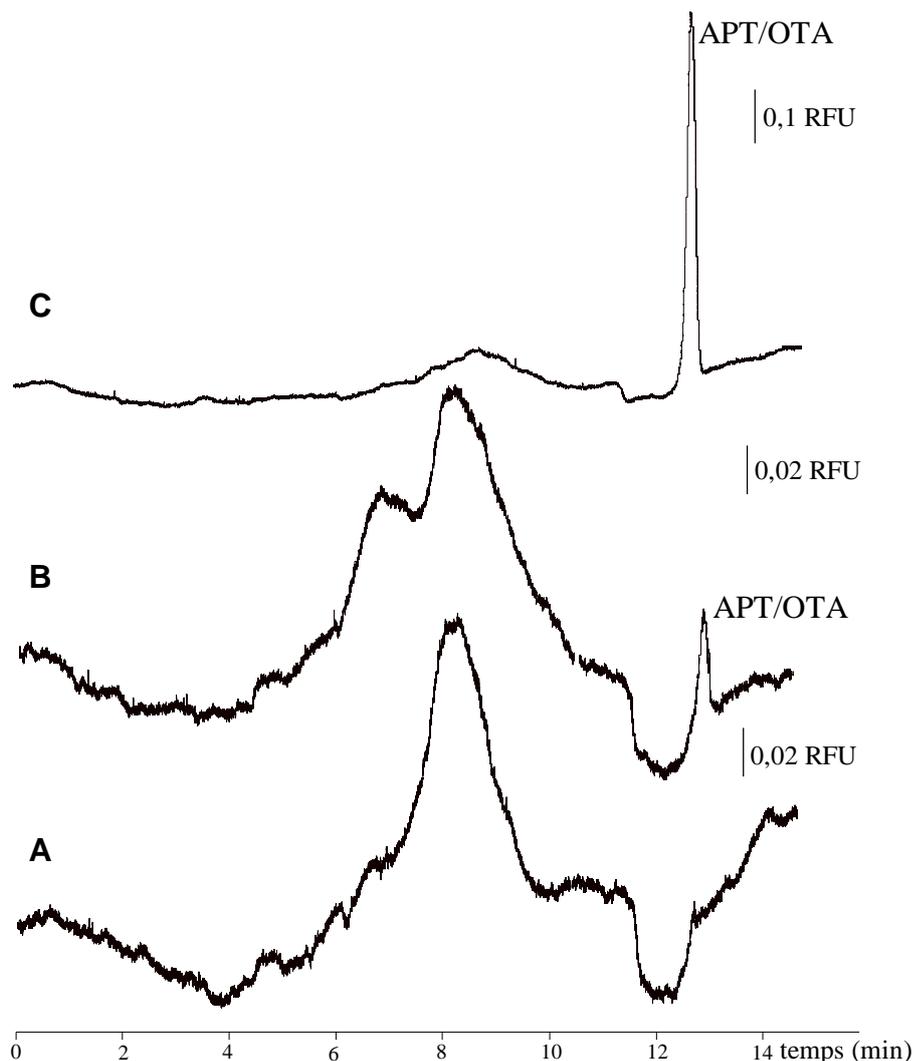


Figure V-6 : Analyse d'un vin blanc dopé avec différentes concentrations en ochratoxine A. Tampon de séparation contenant 40  $\mu\text{M}$  d'aptamère anti-OTA. Injection du vin : 50 mbars, 60 s. Mobilisation par tension à -15 kV. (A) Aucun ajout d'Ochatoxine A, (B) vin dopé avec 50 ppb d'ochratoxine A et (C) vin dopé avec 500 ppb d'ochratoxine A.

Le vin non dopé avec de l'OTA (trace A) présente un large pic de faible intensité entre 6 et 10 min, mais celui-ci n'interfère pas avec le pic du complexe APT/OTA puisque ce

## Partie V – Les aptamères pour la préconcentration en CE

---

dernier sort à un temps différent (voir vin dopé avec 500 ppb d'OTA, C). Pour un dopage avec 500 ppb d'OTA, un pic fin pour le complexe APT/OTA avec une hauteur de signal de 0,7 RFU environ est observé. Afin d'évaluer le potentiel de ce processus, la concentration en OTA a été réduite à 50 ppb. Comme on peut le remarquer dans la trace B, l'OTA est toujours détectée à cette concentration, mais à un niveau proche de la LOQ ici calculée à 45 ppb (1,1  $\mu\text{M}$ ) en mesurant le bruit de fond avant et après le pic.

### V.4. Conclusion

Ces travaux exploratoires montrent que l'OTA peut être détectée dans du vin à l'état de trace en mettant en œuvre un mode de préconcentration sélective par l'aptamère anti-OTA et un mode de détection sélective grâce à la détection LIF. La LOQ, qui est aux alentours de 45 ppb, est en l'état trop élevée par rapport à la législation fixée par l'Union Européenne (2 ppb). Toutefois, de nombreuses pistes d'amélioration sont envisageables. Tout d'abord, la dilution initiale de l'échantillon doit pouvoir être pratiquement supprimée. Ensuite, un capillaire plus long pourra être utilisé afin d'augmenter le volume d'injection. Une investigation plus approfondie du mécanisme de *sweeping* avec l'aptamère anti-OTA, doit également conduire à une optimisation du tampon de capture et de séparation (pH, concentration en sel et en aptamère), dont la composition influence également les mobilités électrophorétiques, ainsi que les paramètres de tension et de température. Enfin, pour abaisser le coût de cette méthode, il serait intéressant de réduire le volume de solution d'aptamère consommé en introduisant directement l'aptamère dans le capillaire après la zone de vin avant l'application de la tension. Ceci étant, la preuve de concept réalisée laisse entrevoir une nouvelle perspective d'utilisation des aptamères pour la préconcentration sélective de composés cibles. Dans le cas présent de l'analyse de l'OTA dans le vin, ce processus est prometteur, dans la mesure où, comparé aux processus classiques de préconcentration sur phase solide, la stratégie envisagée ici nécessite une préparation d'échantillon très minime et rapide, à savoir une filtration un simple ajustement du pH.

### V.5. Références

- [1] J.P. Quirino, S. Terabe, *Science*, 1998, 282, 465-468
- [2] A.D., Ellington, J.W., Szostak, *Nature*, 1990, 346, 818-822
- [3] S. Song, L. Wang, J. Li, J. Zhao, C. Fan, *Trends Anal. Chem.*, 2008, 27, 108-117
- [4] S. Tombelli, M. Minunni, M. Mascini, *Biosensors and Bioelectronics*, 2005, 20, 2424-2434
- [5] H.Z. Senyuva, J. Gilbert, *J. Chromatogr. B*, 2010, 878, 115-132
- [6] L. Barthelmebs, J. Jonca, A. Hayat, B. Prieto-Simon, J.L Marty, *Food Control*, 2011, 22, 737-743
- [7] F. Chapuis-Hugon, V. Pichon, *Annales de toxicologie analytiques*, 2010, 22, 97-101
- [8] J.A. Cruz-Aguado, G. Penner, *J. Agric. Food. Chem.*, 2008, 56, 22, 10456-10461
- [9] J.A Cruz-Aguado, G. Penner, *Anal. Chem.*, 2008, 22, 8853-8855
- [10] B. Kabak, *Food and Chem. Toxicol.*, 2009, 47, 348-35
- [11] C. Zaied, S. Abid, L. Zorgui, C. Bouaziz, S. Chouchane, M. Jomaa, H. Bacha, *Food Control*, 2009, 20, 218-222
- [12] D. Flajs, A.M. Domijan, D. Ivic, B. Cvjetkovic, M. Peraica, *Food Control*, 2009, 20, 590-592
- [13] G.J. Soleas, J. Yan, D.M. Goldberg, *J. Agric. Food Chem.*, 2001, 49, 2733-2740
- [14] A. Napolitano, V. Fogliano, A. Tafuri, A. Ritieni, *J. Agric. Food Chem.*, 2007, 55, 10499-10504
- [15] N.E. Ahmed, M.M. Farag, K.M. Soliman, A.K.M. Abdel-Samed, K.M. Naguib, *J. Agric. Food Chem.*, 2007, 55, 9576-9580
- [16] J. Serra Bonvehi, *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52, 6347-6352
- [17] K. Muñoz, M. Vega, G. Rios, S. Muñoz, R. Madariaga, *Food Chem. Toxicol.*, 2006, 44, 1884-1889
- [18] P. Mosesso, S. Cinelli, J. Pinifero, R. Bellacima, G. Pepe, *Chem. Res. Toxicol.*, 2008, 21, 1235-1242
- [19] Communauté Européenne, Règlement n°123/2005 de la commission du 26 janvier 2005 modifiant le règlement (CE) n°466/2001 en ce qui concerne l'Ochratoxine A, texte présentant de l'intérêt pour l'EEE. *Journal officiel n°L 338 du 17/12/2008 p 0130-0134*
- [20] M. Angel Pavon, I. Gonsalez, R. Martin, T. Garcia, *Food Agricu. Immunol.*, 2012, 23, 83-91

- [21] A. Zhang, Y. Ma, L. Feng, Y. Wang, C. He, X. Wang, H. Zhang, *Food Control*, 2011, 22, 1723-1728
- [22] A.E. Radi, X. Muñoz-Berbel, V. Lates, J.L. Marty, *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, 24, 1888-1892
- [23] A.E. Radi, X. Muñoz-Berbel, M. Cortina-Puig, J.L. Marty, *Electrochim. Acta*, 2009, 54, 2180-2184
- [24] B. Prieto-Simón, M. Campàs, J.L. Marty, T. Noguer, *Biosensors and Bioelectronics*, 2008, 23, 995-1002
- [25] M.A. Alonso-Lomillo, O. Dominguez-Renedo, L. del Torno-de Roman, M.J. Arcos-Martinez, *Anal. Chim. Acta*, 2011, 688, 49-53
- [26] C.S. Ah, C.W. Park, J.H. Yang, J.S. Lee, W.J. Kim, K.H. Chung, Y.H. Choi, I.B. Baek, J. Kim, G.Y. Sung, *Biosensors and Bioelectronics*, 2012, 33, 233-240
- [27] G. Castillo, I. Lamberti, L. Mosiello, T. Hianik, *Electroanalysis*, 2012, 24, 512-520
- [28] H. Valenta, *J. Chromatogr. A*, 1998, 815, 75-92
- [29] N.W. Turner, S. Subrahmanyam, S.A. Piletsky, *Anal. Chim. Acta*, 2009, 632, 168-180
- [30] C. Brera, J.M. Soriano, F. Debegnach, M. Miraglia, *Microchem. J.*, 2005, 79, 109-113
- [31] L. Campone, A.L. Piccinelli, L. Rastrelli, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, 399, 1279-1286
- [32] J. Rubert, C. Soler, J. Manes, *Food Control*, 2012, 25, 374-379
- [33] B. Böhs, V. Seidel, W. Lindner, *Chromatographia*, 1995, 41, 631-637
- [34] S. Corneli, C.M. Maragos, *J. Agric. Food. Chem.*, 1998, 46, 3162-3165
- [35] S. Almeda, L. Arce, M. Valcárcel, *Electrophoresis*, 2008, 29, 1573-1581
- [36] G. Köller, G. Wichmann, U. Rolle-Kampczyk, P. Popp, O. Herbarth, *J. Chrom. B*, 2006, 840, 94-98
- [37] G. Köller, U. Rolle-Kampczyk, I. Lehmann, P. Popp, O. Herbarth, *J. Chrom. B*, 2004, 804, 313-317
- [38] R. Peña, M.C. Alcaraz, L. Arce, A. Ríos, M. Valcárcel, *J. Chromatogr. A*, 2002, 967, 303-314
- [39] S. Almeda, L. Arce, F. Benavente, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa, M. Valcárcel, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, 394, 609-615
- [40] C-Y. Hong, Y-C. Chen, *J. Chrom. A*, 2007, 1159, 250-255
- [41] J. Chamieh, C. Faye, V. Dugas, T. Moreau, O. Vandenabeele-Trambouze, C. Demesmay, *J. Chromatogr. A*, 2012, 1232, 93-100
- [42] R. Vatinno, A. Aresta, C.G. Zambonin, F. Palmisano, *J. Chromatogr. A*, 2008, 1187, 145-150

## Partie V – Les aptamères pour la préconcentration en CE

---

- [43] M.C. Spanjer, P.M. Rensen, J.M. Scholten, *Food Addit. Contam.*, 2008, 25, 472-489
- [44] X. Zhang, E. Cudjoe, D. Vuckovic, J. Pawliszyn, Janusz, *J. Chromatogr. A*, 2009, 1216, 7505-7509
- [45] L. Sibanda, S. De Saeger, I. Barna-Vetro, C. Van Peteghem, *J. Agric. Food. Chem.*, 2002, 50, 6964-6967
- [46] M.W. Trucksess, C.M. Weaver, C.J. Oles, F.S. Fry, G.O. Noonan, J.M. Betz, J.I. Pader, *J. AOAC Int.*, 2008, 91, 511-523
- [47] M. Solfrizzo, G. Panzarini, A. Visconti, *J. Agric. Food. Chem.*, 2008, 56, 11081-11086
- [48] Y.L. Wang, T.J. Chai, G.Z. Lu, C.S. Quan, H.Y. Duan, M.L. Yao, B.A. Zucker, G. Schlenker, *Environ. Res.*, 2008, 107, 139-144
- [49] A. Aresta, R. Vatinno, F. Palmisano, C.G. Zambonin, *J. Chromatogr. A*, 2006, 1115, 196-201
- [50] F. Chapuis-Hugon, A. du Boisbaudry, B. Madru, V. Pichon, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, 400, 1199-1207
- [51] X. Wu, J. Hu, B. Zhu, L. Lu, X. Huang, D. Pang, *J. Chromatogr. A*, 2011, 1218, 7341-7346
- [52] A. Rhouati, N. Paniel, Z. Meraihi, J-L. Marty, *Food Control*, 2011, 22, 1790-1796
- [53] A. de Girolamo, M. McKeague, J.D. Miller, M.C. DeRosa, A. Visconti, *Food chemistry*, 2011, 127, 1378-1384
- [54] B.A. Williams, G. Vigh, *Anal. Chem.*, 1996, 68, 1174-1180

## ***CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES***



## **CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES**

Au cours de ces travaux de thèse, nous nous sommes intéressés aux méthodes de préconcentration électrocinétique *in situ* en électrophorèse capillaire, avec pour objectif d'améliorer les gains en sensibilité de certaines d'entre elles.

Dans une première partie, le potentiel du greffage covalent des capillaires de silice avec du polyacrylamide linéaire selon la procédure de Hjerten pour la suppression de l'écoulement électroosmotique en milieu acide a été examiné, puisqu'il est préférable de travailler, pour les techniques d'amplification du champ électrique, en absence d'écoulement électroosmotique. Il a été montré que cette stratégie de greffage, qui est simple et rapide à mettre en place, permet en milieu acide, en présence de solvant organique et/ou de tensioactif (anionique ou cationique), de réduire plus efficacement l'écoulement électroosmotique qu'avec des capillaires de silice vierge ou des capillaires greffés avec de l'hydroxypropylcellulose. Ainsi, pour une partie des travaux ultérieurs, des capillaires greffés avec du polyacrylamide linéaire ont été utilisés.

Dans une deuxième partie, nous nous sommes intéressés à l'étude détaillée du mécanisme du couplage de la préconcentration par amplification du champ électrique avec une injection électrocinétique (*FESI*) et de l'extraction dynamique par une phase micellaire (*sweeping*). Une première étude a permis d'élucider l'impact des paramètres expérimentaux influençant cette technique et de proposer un protocole d'optimisation simplifié : pour une injection à tension constante, une faible conductivité de l'échantillon et une longue durée d'injection favorisent les gains en sensibilité. Il faut noter toutefois que la longueur de la zone de haute conductivité doit être choisie afin que l'ion d'intérêt le plus mobile reste piégé dans cette zone. De plus il a été montré qu'une courte zone d'eau introduite avant l'injection n'améliore pas les gains en sensibilité. Dans une deuxième étude, nous nous sommes efforcés de comprendre les différences observées lorsque l'acide phosphorique seul ou un mélange acide phosphorique/phosphate de sodium sont utilisés comme zone de haute conductivité. Grâce à l'outil de simulation SIMUL 5, il a été montré qu'à cause des concentrations différentes en sodium dans les zones occupant le capillaire, des frontières mobiles de profils différents (diffuses ou stationnaires) sont créées. Ces différences entraînent une préconcentration plus efficace lors de l'étape d'injection avec le phosphate de sodium. Nous nous sommes aperçus aussi qu'une injection à courant constant était alors indispensable, sans quoi la quantité d'analytes injectés est plus faible que lorsque l'acide phosphorique est utilisé,

et les gains en sensibilité finaux qui en résultent sont plus faibles car l'efficacité du *sweeping* est proportionnelle à la quantité d'analyte injectée. Enfin, les conclusions tirées de ces deux premières études ont été mises à profit lors de l'application de cette méthode de préconcentration à l'analyse de traces de cations ammonium quaternaires (les « quats ») dans une eau de distribution parisienne. Bien qu'il reste encore du travail pour la validation de cette méthode, nous avons montré qu'avec toutes les recommandations précédentes, les « quats » peuvent être quantifiées aux teneurs spécifiés par l'Union Européenne (100 ppt) après une simple acidification et filtration comme préparation de l'échantillon.

Nous avons enfin voulu explorer également des voies de préconcentration électrocinétiques plus sélectives. Ainsi, nous nous sommes intéressés au potentiel des liquides ioniques à longue chaîne pour la préconcentration électrocinétique *in situ*. Pour cela, un liquide ionique (le 1-dodécyl-3-méthylimidazolium) a été utilisé comme agent micellaire pour la préconcentration par déplacement d'un équilibre de distribution micellaire par un changement de composition hydro-organique. Les résultats ont permis de montrer que grâce aux interactions  $\pi$ - $\pi$  que développe ce liquide ionique des gains en sensibilité plus élevés sont obtenus par rapport à un tensioactif classiquement utilisé. Ceci ouvre une nouvelle perspective quand à l'utilisation de liquides ioniques présentant des interactions plus fortes et/ou plus sélectives.

Dans la perspective d'utiliser des agents de *sweeping* qui présentent des interactions fortes et sélectives pour une cible donnée, nous nous sommes intéressés enfin, et dans une optique de preuve de concept, à l'utilisation de l'aptamère anti-OTA pour la préconcentration sélective par *sweeping* de l'ochratoxine A présent à l'état de trace dans une matrice complexe telle que le vin. Nous avons démontré la sélectivité d'une telle approche puisque l'aptamère semble concentrer uniquement cette toxine. Afin d'évaluer son potentiel, du vin a été analysé et après une simple dilution avec le tampon de capture puis une filtration comme étape de traitement de l'échantillon. Une limite de quantification d'environ 45 ppb a été obtenue. Cette limite de quantification devra encore être abaissée d'un facteur 20 environ, mais ceci semble tout à fait envisageable après une optimisation du processus.

Ces derniers résultats ouvrent une perspective intéressante pour la préconcentration sélective d'espèces recherchées à des teneurs très faibles dans des matrices complexes. En effet, grâce à la sélection de nouvelles séquences d'aptamères sélectifs, on peut imaginer d'utiliser en même temps plusieurs aptamères afin de préconcentrer puis séparer des cibles spécifiques. Cette stratégie présente l'avantage d'être réalisable en milieu libre, un avantage certain dans la construction de systèmes miniaturisés, tel que des puces.

## RESUME

L'électrophorèse capillaire, quoiqu'étant une technique analytique très puissante, souffre d'un manque en sensibilité avec les détecteurs spectrophotométriques. Pour palier ce problème il est possible d'utiliser des méthodes de préconcentration électrocinétiques *in-situ*. Les travaux menés au cours de cette thèse se sont attachés à développer de nouvelles méthodologies de préconcentration électrocinétique. Tout d'abord, il a été montré que le greffage des capillaires de silice avec du polyacrylamide linéaire permet en milieu acide complexe de réduire fortement l'écoulement électroosmotique ce qui favorise la mise en œuvre des techniques de préconcentration. Ensuite, le couplage de deux méthodes de préconcentration, l'amplification de champ électrique avec une injection électrocinétique et du *sweeping* a été examiné. En étudiant le mécanisme grâce à des plans d'expérience et de la simulation, l'influence des paramètres expérimentaux ainsi que leurs rôles ont été éclaircis et la procédure d'optimisation simplifiée. A la suite de ces résultats, une procédure d'analyse d'herbicides présents dans des eaux de distribution a été développée, permettant leur détection à un niveau proche de celui spécifié par l'Union Européenne sans étape préalable d'extraction. Ensuite, l'utilisation de liquides ioniques à longue chaîne pour améliorer la sensibilité d'une méthode appelée « Micelle to Solvent Stacking » a été étudiée et des améliorations d'un facteur 10 ont été obtenues par rapport aux gains obtenus avec des surfactants classiques (application à des herbicides et des anti-inflammatoires). Enfin, pour améliorer les gains en sensibilité avec de plus une spécificité élevée, une preuve de concept a été développée en utilisant un aptamère pour l'analyse sélective d'Ochratoxine A à l'état de trace dans le vin, ce qui ouvre de nouvelles perspectives pour l'utilisation de cet outil biologique en électrophorèse capillaire.

**Mots clés :** analyse de traces, aptamère, électrophorèse capillaire, liquides ioniques, plan d'expériences, préconcentration électrocinétique *in-situ*, simulation.

---

### **Development of new methodologies of in-situ electrokinetic preconcentration techniques in capillary electrophoresis for trace analyses**

Capillary electrophoresis is a powerful separation technique, but it suffers from a lack of sensitivity when optical detectors are used. In order to resolve this problem, *in-situ* electrokinetic preconcentration techniques are available. During these researches, some of these techniques had been investigated. First of all, it was shown the coating of silica capillary walls by linear polyacrylamide reduced efficiently the electroosmotic flow even in complex acidic media which improve the electrokinetic preconcentration yields. Secondly, the hyphenation of field amplification with electrokinetic injection and "*sweeping*" was examined. The mechanism of this technique was deeply studied thanks to chemometric approaches and simulation. The results allowed to clarify the influence of experimental parameters and to simplify the optimization procedure. Following these results, an analytical procedure for the analyses of herbicides in tap water was developed and detection near to the specified level of European Union was obtained without any extraction procedure. Thirdly, it was shown the utilization of ionic liquids in the so-called technique "Micelle to Solvent Stacking" provided sensibility enhancements of 10 by comparison with classical surfactants (application to herbicides and anti-inflammatory drugs). Finally, thanks to the use of a specific aptamer, a proof of concept was developed for the selective preconcentration of Ochratoxine A in wine. This last work open new perspectives for the utilization of these biological tools in capillary electrophoresis.

**Key words:** aptamers, capillary electrophoresis, design of experiments, *in-situ* electrokinetic preconcentration, ionic liquids, simulation, trace analyses.