



Mise au point d'un microsysteme électrophorétique pour l'analyse des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les huiles alimentaires

Ludivine Ferey

► To cite this version:

Ludivine Ferey. Mise au point d'un microsysteme électrophorétique pour l'analyse des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les huiles alimentaires. Biochimie, Biologie Moléculaire. AgroParis-Tech, 2013. Français. NNT : 2013AGPT0066 . pastel-01057098

HAL Id: pastel-01057098

<https://pastel.hal.science/pastel-01057098>

Submitted on 21 Aug 2014

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.



Doctorat ParisTech

THÈSE

pour obtenir le grade de docteur délivré par

L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech)

Spécialité : Chimie Analytique

Présentée par

Ludivine FEREY

Soutenue le 31 octobre 2013

Mise au point d'un microsystème électrophorétique pour l'analyse des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les huiles alimentaires

Directeur de thèse : **Douglas RUTLEDGE**
Co-encadrement de la thèse : **Nathalie DELAUNAY**

Jury

Mme Claire DEMESMAY, Professeur, Université Claude Bernard Lyon1
Mme Claire ELFAKIR, Professeur, Université d'Orléans
Mme Florence LACOSTE, Chercheur, ITERG
Mme Michelle SERGENT, Professeur, Université d'Aix-Marseille
Mme Sylvie BRETON, Lesieur
Mme Nathalie DELAUNAY, Chercheur, CNRS
M. Douglas RUTLEDGE, Professeur, AgroParisTech

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Co-directrice de Thèse
Directeur de Thèse

Remerciements

Ce travail de thèse s'est inscrit dans le cadre d'une collaboration entre deux partenaires industriels, les groupes Sofiprotéol et Lesieur, et trois partenaires académiques, le laboratoire Physicochimie des Electrolytes, Colloïdes et Sciences Analytiques (PECSA) de Chimie ParisTech et de l'ESPCI ParisTech, le laboratoire Ingénierie Analytique pour la Qualité des Aliments (IAQA) d'AgroParisTech et le laboratoire Génie Enzymatique et Cellulaire de l'Université de Technologie de Compiègne (UTC).

Je remercie le Professeur Douglas RUTLEDGE, mon directeur de thèse, de m'avoir fait confiance en me proposant ce projet de thèse et de m'avoir accueillie au sein de son équipe à AgroParisTech.

Je tiens particulièrement à remercier le Docteur Nathalie DELAUNAY pour la confiance qu'elle m'a témoignée en acceptant de collaborer dans ce projet de recherche. Sa disponibilité et son aide ont rendu ce travail de thèse très enrichissant sur les plans scientifiques et humains. Je la remercie vivement pour son soutien moral, indispensable pour faire face aux difficultés rencontrées et pour conserver une motivation sans faille. Je lui adresse ma sincère amitié.

Je tiens également à remercier le Professeur Pierre GAREIL pour son accueil chaleureux au sein de son équipe de Chimie ParisTech, pour sa grande disponibilité et ses précieux conseils. Je le remercie également pour le temps qu'il a consacré à la relecture de ce manuscrit.

J'adresse mes plus sincères remerciements aux Professeurs Claire DEMESMAY et Claire ELFAKIR pour avoir accepté d'examiner et de juger ce travail en qualité de rapporteur. Je tiens également à remercier le Docteur Florence LACOSTE, le Professeur Michelle SERGENT et le Docteur Sylvie BRETON d'avoir accepté d'être membres de mon jury de thèse et de contribuer à l'évaluation de ce travail en qualité d'examinateur.

Je souhaite vivement remercier Monsieur Yann RAOUL de Sofiprotéol, Monsieur Alain HUERTAS, Madame Sylvie BRETON et Monsieur Mickaël WATIEZ de Lesieur pour avoir financé ce projet de recherche passionnant, pour m'avoir offert la possibilité de participer à de nombreux congrès et pour la liberté qu'ils m'ont accordée.

Je remercie très sincèrement le Professeur Karsten HAUPT et le Docteur Aude CORDIN de l'UTC, ainsi que leurs stagiaires, pour la synthèse des MIP. Un grand merci aux Docteurs Jérôme VIAL et Isabelle RIVALS pour leurs précieux conseils lors des études chimiométriques. Elles ont apporté une réelle valeur ajoutée à ce travail de thèse. Je souhaite aussi remercier le Professeur Valérie PICHON pour m'avoir accueillie au sein de

son équipe de l'ESPCI et pour son implication dans l'étude des MIP. Merci également au Docteur Christophe CORDELLA d'avoir monté ce projet très enrichissant et de me l'avoir confié. Merci au Docteur Hervé THIS pour sa collaboration lors de la mise en place du projet.

J'adresse mes remerciements aux membres du laboratoire PECSA de l'ESPCI, particulièrement José DUGAY pour m'avoir fait confiance en tant que monitrice et pour m'avoir permis de goûter aux joies de l'enseignement de TP, mais aussi Patrick pour ses compétences techniques souvent indispensables. Je remercie aussi Delphine, Nathalie et Stéphane d'AgroParisTech. Ils ont contribué par leur gentillesse et leur bonne humeur à tisser des liens d'amitiés.

Merci également à Nolwenn, Lorena, Isabelle et Samia, stagiaires qui ont travaillé sur la caractérisation des MIP et à Rita et Anne-Sophie, stagiaires qui ont travaillé en électrophorèse capillaire.

Je remercie chaleureusement tous mes ami(e)s thésards et post-doc de l'ESPCI et Chimie Paris, notamment Lilia, Elodie, Philippe, Cédric et Manel pour leur sympathie et leurs encouragements.

Enfin, un grand merci à tous mes proches et plus particulièrement à mes parents et à ma sœur pour leur soutien sans faille tout au long de ma thèse, leurs encouragements dans les moments difficiles et leurs précieux conseils. Je tiens à exprimer ma plus profonde affection et reconnaissance à Johan, mon conjoint, avec qui j'ai pu partager mes joies, mes doutes et mes peines durant ces trois années. Sans son soutien et son écoute, ce projet n'aurait jamais pu être mené à bien.

Liste des publications et des communications

Publications :

“Optimizing separation conditions of nineteen polycyclic aromatic hydrocarbons by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis and applications to edible oils”.

Ludivine Ferey, Nathalie Delaunay, Douglas N. Rutledge, Christophe B.Y. Cordella, Hervé This, Alain Huertas, Yann Raoul, Pierre Gareil, Talanta, soumise en juillet 2013.

“Use of response surface methodology to optimize the simultaneous separation of eight polycyclic aromatic hydrocarbons by capillary zone electrophoresis with laser-induced fluorescence detection”.

Ludivine Ferey, Nathalie Delaunay, Douglas N. Rutledge, Alain Huertas, Yann Raoul, Pierre Gareil, Jérôme Vial, Journal of Chromatography A, 1302 (2013) 181-190.

“An experimental design based strategy to optimize a capillary electrophoresis method for the separation of 19 polycyclic aromatic hydrocarbons”.

Ludivine Ferey, Nathalie Delaunay, Douglas N. Rutledge, Alain Huertas, Yann Raoul, Pierre Gareil, Jérôme Vial, Isabelle Rivals, Analytica Chimica Acta, soumise en septembre 2013.

“Capillary and microchip electrophoretic analyses of polycyclic aromatic hydrocarbons”.

Ludivine Ferey, Yann Raoul, Alain Huertas, Douglas N. Rutledge, Nathalie Delaunay, Separation and Purification Reviews, soumise en septembre 2013.

“Microchip capillary electrophoresis devices for food analysis”.

Ludivine Ferey, Nathalie Delaunay, Yann Raoul, Alain Huertas, Douglas N. Rutledge, Trends in Analytical Chemistry, soumise en septembre 2013.

Communications orales :

“Intérêt des cyclodextrines dans les techniques de séparation électrophorétique”.

Ludivine Ferey, Nathalie Delaunay, Pierre Gareil, Hervé This, Douglas N. Rutledge, Christophe B.Y. Cordella, 14^{ème} Journées du Club Français des Cyclodextrines, Ecole Normale Supérieure, Paris (75), France, 24-25 janvier 2012.

“An experimental design based strategy to optimize a capillary electrophoresis method for the separation of 19 polycyclic aromatic hydrocarbons”.

Ludivine Ferey, Nathalie Delaunay, Douglas N. Rutledge, Alain Huertas, Yann Raoul, Pierre Gareil, Isabelle Rivals, Jérôme Vial, Chimométrie 2012, Lille, France, 5-6 décembre 2012.

“Utilisation d’une stratégie basée sur les plans d’expériences pour l’analyse en électrophorèse capillaire de 19 hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les huiles alimentaires”.

Ludivine Ferey, Nathalie Delaunay, Douglas N. Rutledge, Alain Huertas, Yann Raoul, Pierre Gareil, Isabelle Rivals, Jérôme Vial, sessions jeunes SEP 2013, Paris, France, 4-7 juin 2013.

“Capillary and microchip electrophoretic analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils”.

Ludivine Ferey, Nathalie Delaunay, Douglas N. Rutledge, Alain Huertas, Yann Raoul, Isabelle Rivals, Jérôme Vial, Pierre Gareil, ITP 2013, Puerto de la Cruz, Ténérife, Iles Canaries, Espagne, 6-9 octobre 2013.

Communications par affiche :

“Analysis of PAHs for environmental and food samples by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection”.

Ludivine Ferey, Nathalie Delaunay, Pierre Gareil, Hervé This, Douglas N. Rutledge, Christophe B.Y. Cordella, MSB 2012, Genève, Suisse, 12-15 février 2012.

“Use of response surface design methodology to optimize the separation of 8 PAHs in capillary zone electrophoresis with laser-induced fluorescence detection”.

Ludivine Ferey, Nathalie Delaunay, Douglas N. Rutledge, Alain Huertas, Yann Raoul, Pierre Gareil, Jérôme Vial, Chimiométrie 2012, Lille, France, 5-6 décembre 2012.

“Analyse d’Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques en présence de cyclodextrines par électrophorèse capillaire couplée à une détection de fluorescence induite par laser”.

Ludivine Ferey, Nathalie Delaunay, Douglas N. Rutledge, Alain Huertas, Yann Raoul, Pierre Gareil, Isabelle Rivals, Jérôme Vial, 1^{er} colloque Défis Analytiques et Société organisé par le DIM Analytics, Paris, France, 18-19 avril 2013.

“Utilisation d’une stratégie basée sur les plans d’expériences pour l’optimisation de la séparation de 19 Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques par électrophorèse capillaire en présence de cyclodextrines”.

Ludivine Ferey, Nathalie Delaunay, Douglas N. Rutledge, Alain Huertas, Yann Raoul, Pierre Gareil, Jérôme Vial, Isabelle Rivals, SEP 2013, Paris, France, 4-7 juin 2013.

“Caractérisation de polymères à empreintes moléculaires pour l’analyse d’hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les huiles alimentaires”.

Nolwenn Prache, Lorena Cuccia, Ludivine Ferey, Cédric Sarazin, Nathalie Delaunay, Alain Huertas, Yann Raoul, Aude Cordin, Karsten Haupt, Valérie Pichon, SEP 2013, Paris, France, 4-7 juin 2013.

“Experimental design based strategies to optimize capillary electrophoresis methods for the separation of polycyclic aromatic hydrocarbons”.

Ludivine Ferey, Nathalie Delaunay, Douglas N. Rutledge, Alain Huertas, Yann Raoul, Pierre Gareil, Isabelle Rivals, Jérôme Vial, HPLC 2013, Amsterdam, Pays-Bas, 16-20 juin 2013.

Abbreviations

AAs: amino acids	DACC: donor-acceptor complex chromatography
ACN: acetonitrile	DBaeP: dibenzo(ae)pyrene
ACP: acenaphthene	DBahA: dibenzo(ah)anthracene
ACY: acenaphthylene	DBahP: dibenzo(ah)pyrene
AIBN: azobisisobutyronitrile	DBaiP: dibenzo(ai)pyrene
AMP: acryloylmorpholine	DBaIP: dibenzo(al)pyrene
AMPS: 2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid	DCM: dichloromethane
ANT: anthracene	DMAEM: 2-dimethyl(aminoethyl) methacrylate
BaA: benzo(a)anthracene	DMF: dimethylformamide
BaP: benzo(a)pyrene	DMSO: dimethylsulfoxide
BbFA: benzo(b)fluoranthene	DOSS: sodium dioctyl sulfosuccinate
BcFLR: benzo(c)fluorene	DS: degree of substitution or dextran sulfate
BeP: benzo(e)pyrene	DVB: divinylbenzene
BGE: background electrolyte	EC: électrophorèse capillaire
BghiP: benzo(ghi)perylene	ED: electrochemical detection
BjFA: benzo(j)fluoranthene	EFSA: European Food Safety Authority
BkFA: benzo(k)fluoranthene	EGDMA: ethylene glycol dimethacrylate
BMA: benzylmethacrylate	EI: étalon interne
BSA: bovine serum albumin	EKC: electrokinetic chromatography
C⁴D: capacitively coupled contactless conductivity detector	EOF: electroosmotic flow
CCD: central composite design	ETMOS: ethyltrimethoxysilane
CD: cyclodextrin	FA: fluoranthene
CD-CZE: cyclodextrin-modified capillary zone electrophoresis	FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations
CE: capillary electrophoresis	FITC: fluorescein isothiocyanate
CEC: capillary electrochromatography	FLR: fluorene
CHR: chrysene	Fluo: fluorescence detection
CIRC: Centre International de Recherche sur le Cancer	GC: gaz chromatography
CM-β-CD: carboxymethyl-β-CD	GM: genetically modified
cmc: critical micellar concentration	GMO: genetically modified organisms
CNT: carbon nanotube	GNPs: gold nanoparticles
COC: cyclo-olefin copolymer	GO: graphene oxide
CONTAM: Groupe scientifique sur les contaminants de la chaîne alimentaire de l'EFSA	HAP: hydrocarbure aromatique polycyclique
COR: coronene	HP-β-CD: hydroxypropyl-β-CD
CPcdP: cyclopenta(cd)pyrene	HPLC: high-performance liquid chromatography
CSEID: class-selective electrochemical index determination	IAD: individual antioxidant determination
CSPE: carbon screen-printed electrode	IEF: isoelectrofocusing
C₁₈-TMS: N-octadecyldimethyl[3-(trimethoxysilyl)propyl]ammonium chloride	IF: imprinting factor
Cu(II)-MPS: copper (3-mercaptopropyl) trimethoxysilane	IL: ionic liquid
CV: coefficient de variation	IP: indeno(1,2,3-cd)pyrene
CZE: capillary zone electrophoresis	IS: internal standard
	ISO: International Organization for Standardization
	ITERG: Institut des Corps Gras
	ITP: isotachophoresis
	JECSA: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives

LE: leading electrolyte
LIDF: laser-induced dispersed fluorescence
LIF: laser-induced fluorescence detection
LLE: liquid/liquid extraction
LOAC: lab-on-a-chip
LOD: limit of detection
LOQ: limit of quantitation
MAA: methacrylic acid
MBA: monomethylbenzo(a)anthracene
MCH: 5-methylchrysene
McMOA: Multichannel Mars Organic Analyzer
Me- β -CD: methyl- β -CD
MEKC: micellar electrokinetic chromatography
MePYR: 1-methylpyrene
MES: 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
MFA: monofluoroacetate
MIP: molecularly imprinted polymer
MIS: molecularly imprinted silicas
MOA: Mars Organic Analyzer
MS: mass spectrometry
m- μ CEC: monolithic electrochromatography on-chip
N: efficiency
NACE: nonaqueous capillary electrophoresis
NBD-F: 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole
NIP: non-imprinted polymer
NPH: naphthalene
ODS: octadecylsilane
OPA: o-phthalaldehyde
OT-CEC: open-tubular capillary electrochromatography
OT- μ CEC: open-tubular electrochromatography on-chip
Pe: perylene
PAH: polycyclic aromatic hydrocarbon
PCR: polymerase chain reaction
PCR-RFLP: PCR-restriction fragment length polymorphism
PDMS: polydimethylsiloxane
PEO: poly(ethylene oxide)
PFSG: programmed field strength gradient
PHE: phenanthrene
PheDMS: phenyldimethylsilane
PMMA: polymethyl methacrylate
PMT: photomultiplier tube
Poly-SUS: sodium polyundecenyl sulfate
PS: polystyrene
PTMS: phenyltrimethylsiloxane
PVA: poly(vinyl alcohol)
Pyr: pyrene
RMSE: root mean square error value

R_s: resolution
RSD: relative standard deviation
RT-PCR: reverse transcription-PCR
SA: serum albumin
SBE- β -CD: sulfobutyl ether- β -CD
SC: sodium cholate
SCF: Scientific Committee on Food of the European Commission
SDBS: sodium dodecylbenzenesulfonate
SDS: sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SIM: single ion monitoring
SPE: solid-phase extraction
SPME: solid-phase microextraction
Sty: styrene
TAA⁺: tetraalkyl ammonium ions
TEOS: tetraethoxysilane
TFMAA: trifluoromethacrylic acid
THA⁺: tetrahexyl ammonium ions
THF: tetrahydrofuran
THFMA: tetrahydrofurfurylmethacrylate
t-ITP: transient isotachophoresis
TMOS: tetramethoxysilane
TRIM: trimethylolpropane trimethacrylate
Tris: tris(hydroxymethyl)aminomethane
UHPLC: ultra-high performance liquid chromatography
US-EPA: United States Environmental Protection Agency
 μ TAS: micro-total analysis systems
UV: ultraviolet
4-VP: 4-vinylpyridine
WHO: World Health Organization

SOMMAIRE

INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
PARTIE I – ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	5
CHAPITRE I : Analyse des HAP dans les huiles	7
1. Présentation des HAP.....	7
1.1 Qu'est-ce que les HAP ?	7
1.2 Les propriétés physico-chimiques des HAP	7
1.3 Origines des HAP	8
1.4 Toxicité et réglementation des HAP.....	9
2. Les HAP dans les huiles alimentaires	12
2.1 Origines des HAP dans les huiles.....	12
2.2 Le raffinage comme outil d'élimination des HAP	12
2.3 Réglementation des HAP dans les huiles	16
2.4 Méthodes normalisées pour l'analyse des HAP dans les corps gras	17
3. Analyse des HAP dans les huiles	18
3.1 Préparation de l'échantillon	19
3.2 Techniques chromatographiques et systèmes de détection.....	21
CHAPITRE II : Analyse des HAP par électrophorèse en formats capillaire et microsystème (article)	37
1. Introduction	39
2. Analysis of PAHs by capillary electrophoresis	42
2.1 Micellar electrokinetic chromatography in the presence of an organic modifier	43
2.2 Micellar electrokinetic chromatography modified with cyclodextrins	50
2.3 Cyclodextrin-modified capillary zone electrophoresis.....	52
2.4 Capillary electrochromatography	62
3. Analysis of PAHs in electrophoretic microsystems.....	72
3.1 Microchip based electrochromatography	73
3.2 Microchip based cyclodextrin-modified capillary zone electrophoresis	76
4. Conclusion.....	81
CHAPITRE III : Analyse de matrices alimentaires sur microsystèmes électrophorétiques (article)	85
1. Introduction	87
2. CE-microchips in food analysis: review of applications	88
2.1 Food Quality and Food authenticity	90
2.2 Food Safety	107
3. Conclusion.....	119
CONCLUSION	135

PARTIE II – ANALYSE DES HAP PAR ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE 139

INTRODUCTION 141

CHAPITRE I : Développement d'une méthode de séparation des HAP par électrophorèse capillaire et application aux huiles alimentaires (article) 143

1. Introduction	145
2. Materials and methods	150
2.1 Chemicals	150
2.2 Apparatus and software	151
2.3 Electrophoretic procedures	151
2.4 Real samples preparation	151
3. Results and Discussion	152
3.1 Migration times	152
3.2 Peak area repeatability	153
3.3 Selectivity	155
3.4 Application to real samples	163
4. Conclusions	166

CHAPITRE II : Utilisation de stratégies multivariées pour l'optimisation de méthodes de séparation des HAP par électrophorèse capillaire 169

1. Utilisation d'un plan d'expériences pour l'optimisation d'une méthode de séparation de huit HAP par électrophorèse capillaire (article) 169

1. Introduction	171
2. Materials and methods	173
2.1 Standards and electrolytes	173
2.2 Instrumentation	174
2.3 Electrophoretic conditions	174
2.4 Electroosmotic flow time	175
2.5 Statistical analysis software	175
2.6 Real samples preparation	175
3. Experimental design	176
3.1 Choice of the factors and responses	176
3.2 Selection of the experimental design	177
3.3 Matrix of experiments	177
3.4 Factor levels	178
3.5 Desirability analysis	179
3.6 Robustness evaluation	180
4. Results and Discussion	180
4.1 Effects of factors on PAH migration	180
4.2 Optimization of PAH separation	182
4.3 Experimental validation and evaluation of resolution robustness	188
4.4 Application to a real sample	191
5. Conclusions	193

2. Utilisation d'une stratégie basée sur un plan d'expériences pour l'optimisation d'une méthode de séparation de dix-neuf HAP par électrophorèse capillaire (article). 195

1. Introduction	197
------------------------	------------

2. Materials and methods	198
2.1 Reagents, standard samples and electrolytes	198
2.2 Apparatus	199
2.3 Electrophoretic conditions	200
2.4 Experimental design	200
2.5 Real samples preparation	201
3. Results and Discussion	201
3.1 Choice of the factors, variation domains and responses	201
3.2 Central composite design: optimization design	202
3.3 Optimization of PAH separation	208
3.4 Experimental validation	209
3.5 Application to a real sample	211
4. Conclusions	213
CONCLUSION	215
 <i>PARTIE III – VERS UN TRANSFERT DES MÉTHODES DÉVELOPPÉES EN ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE AU FORMAT MICROSYSTÈME</i>	
<i>219</i>	
CHAPITRE I : Les microsystemes séparatifs	221
1. Introduction	221
2. Les microsystemes séparatifs électrophorétiques	223
CHAPITRE II : Analyse des HAP sur microsystemes	229
1. Optimisation de la séparation des HAP en capillaire en vue d'un transfert au format microsysteme	229
1.1 Détermination de l'optimum par modélisation	229
1.2 Validation expérimentale de l'optimum	230
2. Prise en main du dispositif expérimental dédié à l'analyse sur microsystemes et problèmes rencontrés	232
2.1 Présence de bulles et de particules dans les micro-canaux	233
2.2 Instabilités de l'écoulement électroosmotique	234
2.3 Ecoulements hydrodynamiques	235
3. Optimisation de l'injection	237
3.1 Etude du retrait	238
3.2 Etude du temps dynamique	239
4. Optimisation de la sensibilité de la détection	243
4.1 Optimisation de la valeur du temps d'exposition du capteur	243
4.2 Optimisation de la valeur du gain électronique	245
5. Transposition des conditions de séparation des HAP optimisées sur capillaire au format microsysteme	247
5.1 Etude du retrait	247
5.2 Etude de l'écoulement électroosmotique	250
5.3 Séparation et détection des HAP	252
CONCLUSION	257

PARTIE IV – DÉVELOPPEMENT D'UN MIP POUR L'EXTRACTION DES HAP DES HUILES ALIMENTAIRES.....	261
CHAPITRE I : Les polymères à empreintes moléculaires	263
1. Introduction	263
2. Synthèse des MIP.....	264
2.1 Principe de l'impression moléculaire.....	264
2.2 Choix des réactifs	266
2.3 Techniques de polymérisation	269
3. Evaluation de la sélectivité des MIP	270
3.1 Mesures chromatographiques	270
3.2 Tests de fixation	271
3.3 Etude des profils d'élution en SPE.....	272
4. Applications des MIP en SPE.....	273
4.1 Principe	274
4.2 Extraction sélective d'une famille de molécules	275
4.3 Développement d'une procédure SPE sélective	276
5. Applications des MIP aux HAP	276
CHAPITRE II : Synthèse et caractérisation d'un MIP pour l'extraction des HAP des huiles alimentaires (article).....	285
1. Introduction	287
2. Experimental.....	292
2.1 Chemicals.....	292
2.2 Instruments and analytical conditions	293
2.3 Synthesis of the MIPs	293
2.4 Characterization of the imprinted sorbents.....	294
2.5 Clean-up of oil samples	295
3. Results and Discussion.....	295
3.1 Choice of the MIP synthesis conditions	295
3.2 Selectivity of the MIPs toward the eight PAHs	297
3.3 Extraction of PAHs from oil samples.....	301
4. Conclusions.....	303
CONCLUSION	305
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	307
ANNEXES	313

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Depuis une vingtaine d'années, dans un souci croissant de protéger notre environnement et notre santé, les substances toxiques font l'objet de réglementations de plus en plus strictes. L'analyse de contaminants fait donc partie intégrante des activités de contrôle qualité que doit réaliser l'industrie des corps gras.

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des contaminants universels de notre environnement et de notre chaîne alimentaire. Ils se forment principalement lors de combustions incomplètes ou de la pyrolyse de matières organiques à partir de sources naturelles ou anthropogéniques. La voie majeure d'exposition de l'homme aux HAP est la consommation de denrées alimentaires. Les aliments peuvent être contaminés par des sources environnementales, des procédés technologiques ou un contact avec des huiles minérales. Concernant les huiles végétales, la principale source de contamination par les HAP est le procédé industriel de séchage des graines pendant lequel les gaz de combustion entrent en contact direct avec la matière première.

Il y a trente ans, un avis de toxicité des HAP a été émis par le centre international de recherche sur le cancer. Depuis, l'agence de protection de l'environnement des Etats-Unis et l'agence européenne de sécurité sanitaire des aliments ont chacune établi une liste de seize HAP à surveiller en priorité dans les matrices environnementales et alimentaires. De son côté, la Commission européenne a réglementé la concentration de quatre HAP jugés représentatifs d'une contamination globale des aliments.

Pour répondre à cette réglementation, les industriels des corps gras doivent disposer d'outils analytiques performants au sein de leurs laboratoires de contrôle qualité. Aux laboratoires de contrôle qualité du groupe Lesieur, une extraction sur phase solide (SPE) couplée en ligne avec une séparation par chromatographie en phase liquide à ultra-haute performance (UHPLC) et une détection par fluorescence est la technique privilégiée pour analyser les HAP dans les huiles. Compte tenu de l'encombrement du système d'UHPLC, les analyses s'effectuent au sein des laboratoires et seulement deux points de contrôle sont réalisés par lot d'huile. Une première analyse de l'huile brute permet d'adapter la teneur en charbon actif à utiliser lors du raffinage. Une seconde analyse est réalisée sur l'huile raffinée pour vérifier la conformité à la réglementation des teneurs en HAP.

Le groupe Lesieur a souhaité développer un nouveau système d'analyse leur permettant de réaliser des analyses sur sites. L'objectif est de pouvoir multiplier les contrôles tout au long de la chaîne de production et ainsi améliorer le suivi de la qualité des huiles. En particulier,

l'industriel souhaite délocaliser l'analyse au plus près de la matière première, c'est-à-dire dans les ports des pays fournisseurs ou directement à bord des péniches. Cela permettrait d'anticiper la quantité de charbon actif à ajouter lors du raffinage et donc de prendre en charge directement l'huile brute à son arrivée dans le port de Dunkerque. Pour répondre aux besoins du groupe Lesieur, ce nouveau système d'analyse doit donc être portable et autonome en énergie.

Ce projet de recherche vise donc à développer un microsystème analytique de type « lab-on-a-chip » intégrant l'ensemble de la chaîne analytique : le traitement de l'échantillon (extraction/pré-concentration), la séparation des composés ciblés et leur détection. En plus de la portabilité et de l'autonomie, les microsystèmes analytiques offrent de nombreux avantages comme les faibles quantités de solvant et d'échantillon utilisées, la possibilité d'analyser plusieurs échantillons en parallèle ou encore la rapidité des analyses. Ils permettent donc de réduire considérablement les coûts. Ce travail de thèse est la première étude à s'inscrire dans le cadre de ce vaste projet de recherche.

L'extraction des HAP sera réalisée avec des polymères à empreintes moléculaires (MIP), qui sont des polymères synthétiques de structure tridimensionnelle, obtenus par impression moléculaire et capables de retenir spécifiquement un ou plusieurs composés d'une même famille. En effet, les MIP se sont imposés comme une alternative de choix aux supports conventionnels qui souffrent d'un manque de sélectivité et par conséquent engendrent des co-extractions de nombreux composés interférents. Des MIP anti-HAP seront donc synthétisés par voie non-covalente par un partenaire du projet (équipe de l'UTC) et leurs potentiels seront étudiés en comparant leur comportement avec celui de polymères non-imprimés. Ces caractérisations seront faites au laboratoire en SPE, tout d'abord en milieu pur afin d'élucider les mécanismes d'interactions et vérifier la présence de cavités spécifiques, puis dans l'huile afin d'étudier les possibles effets de matrice sur l'interaction des HAP avec le support.

Pour la séparation des HAP, le choix s'est porté sur un microsystème électrophorétique, plus adapté à la miniaturisation et donc plus simple à mettre en œuvre que les microsystèmes chromatographiques. En effet, contrairement aux microsystèmes basés sur un mode de séparation chromatographique, les « lab-on-a-chip » électrophorétiques ne requiert pas la microfabrication de valves ou de pompes. En fonction de l'état de charge de la surface du canal et de la composition de l'électrolyte, un écoulement électroosmotique contrôlé peut être facilement généré au sein du microsystème au moyen d'un simple jeu d'électrodes et d'un générateur de haute tension. Par ailleurs, les écoulements électroosmotiques ont un profil de vitesse plan, donc très peu dispersif, ce qui permet d'atteindre de grandes efficacités de séparation. Les méthodes de séparation électrophorétiques des HAP seront

tout d'abord optimisées en format capillaire avant d'être transférées au format microsystème. En effet, l'électrophorèse en format capillaire est plus adaptée pour le développement de méthodes car elle est commercialisée de longue date, donc plus robuste et automatisée. La séparation de mélanges complexes d'HAP sera optimisée en électrophorèse capillaire couplée à une détection de fluorescence induite par laser. Une première approche monovariée, suivie par des stratégies multivariées basées sur l'utilisation de plans d'expériences, permettra d'optimiser les conditions opératoires en format capillaire avant le transfert de la méthode de séparation au format microsystème.

PARTIE I – ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : Analyse des HAP dans les huiles

1. Présentation des HAP

1.1 Qu'est-ce que les HAP ?

D'une façon générale, les hydrocarbures sont des molécules formées uniquement d'atomes de carbone et d'hydrogène. Il existe trois séries distinctes d'hydrocarbures : les hydrocarbures aliphatiques, les hydrocarbures alicycliques et les hydrocarbures aromatiques. Les hydrocarbures aliphatiques sont constitués d'une ou plusieurs chaînes carbonées linéaires qui peuvent être saturées (alcane) ou insaturées (alcène, alcyne). Les hydrocarbures alicycliques sont des composés à la fois aliphatiques et cycliques. Ils peuvent également être saturés ou composés d'une ou plusieurs doubles liaisons (cycloalcanes, cycloalcènes, terpènes). Enfin, les hydrocarbures aromatiques sont composés d'un ou de plusieurs cycles aromatiques. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont une sous-famille des hydrocarbures aromatiques. Ces composés insaturés se caractérisent par la présence de plusieurs cycles aromatiques accolés de façon linéaire (anthracène) ou angulaire (phénanthrène).

Dans la littérature, les HAP sont habituellement classés en deux catégories : « les HAP légers », de faibles masses moléculaires, possédant entre deux et trois cycles benzéniques et les « HAP lourds », de plus grandes masses moléculaires, possédant plus de trois cycles [1]. Selon les travaux, les nombres de noyaux aromatiques caractéristiques de chaque catégorie peuvent différer. En effet, certains auteurs utilisent d'autres classifications. A l'institut des corps gras (ITERG), Florence Lacoste et al. stipulent que les HAP légers possèdent entre deux et quatre cycles tandis que les HAP lourds possèdent plus de quatre cycles [2]. Aussi, Yang et al. définissent trois classes : les HAP de faibles (2 à 3 cycles), moyens (4 cycles) et hauts poids moléculaires (plus de 5 cycles) [3]. D'une manière générale, plus les HAP sont lourds, plus ils sont stables et toxiques.

1.2 Les propriétés physico-chimiques des HAP

Une connaissance précise des propriétés physico-chimiques des HAP est nécessaire pour une bonne interprétation des phénomènes observés lors de l'optimisation d'une méthode analytique.

Les propriétés physico-chimiques des HAP ont déjà fait l'objet de différentes études [4-7]. Elles sont majoritairement gouvernées par leur taille (nombre d'atomes de carbone) et leur forme (symétrie de la structure, disposition spatiale des cycles, etc.). Les HAP sont donc principalement caractérisés par leur hydrophobie. Elle augmente en fonction du nombre de cycles aromatiques présents dans la molécule et est caractérisée par le coefficient de partage octanol-eau (Kow). En effet, ce coefficient de partage représente la répartition du composé entre l'octanol (phase lipophile) et l'eau (phase hydrophile). Plus un HAP aura un coefficient de partage Kow important, plus il aura d'affinité avec les milieux lipophiles (ex : les huiles), mais aussi plus il pénétrera facilement les membranes biologiques (bicouches lipidiques) et s'accumulera dans les organismes vivants. Les HAP ont des logKow, aussi appelés logP, élevés (compris entre 3 et 7) ce qui traduit leur caractère lipophile (Tableau I-I-1).

Une autre propriété physico-chimique à considérer, étroitement liée à l'hydrophobie, est la solubilité en phase aqueuse exprimée en mg/L d'eau. Elle décroît avec la masse moléculaire et par conséquent avec l'hydrophobie. Ainsi, les HAP de hauts poids moléculaires ont des valeurs de solubilité dans l'eau modérées voire très faibles (Tableau I-I-1). Seul le naphthalène présente une solubilité relativement élevée dans l'eau : 31,8 mg/L.

Les HAP sont des composés solides à température ambiante et ont des points de fusion et des points d'ébullition élevés (Tableau I-I-1).

1.3 Origines des HAP

Ces composés sont principalement formés au cours de procédés variés de combustion et de pyrolyse à partir de sources naturelles et anthropogéniques. Un nombre important de HAP est émis lors de la combustion incomplète de matières organiques comme le bois et les produits pétroliers ou encore le charbon [9, 10]. Par conséquent, les émissions industrielles, liées au chauffage domestique et au transport, sont les principales causes de pollution de l'atmosphère par les HAP. L'activité humaine n'est pas la seule source d'émission de HAP dans l'environnement puisque des quantités importantes de HAP sont détectées lors de feux de forêt ou d'éruptions volcaniques [11]. L'homme étant exposé aux HAP à travers l'air qu'il inspire, la présence de HAP dans l'environnement constitue un véritable problème de sécurité sanitaire. Néanmoins, l'une des principales sources d'exposition de l'homme aux HAP sont les produits alimentaires [12-14]. Les origines de la présence des HAP dans les aliments sont essentiellement environnementales et industrielles.

Tableau I-I-1. Propriétés physico-chimiques des 16 HAP les plus étudiés ([8], Fiches INERIS).

HAP	Masse molaire (g/mol)	Solubilité dans l'eau à 25°C (mg/L)	LogP	Point de fusion (°C)	Point d'ébullition (°C)
Naphtalène	128	31,8	3,4	80	218
Acénaphène	154	3,7	3,9	95	279
Acénaphthylène	152	3,9	4,1	93	280
Fluorène	166	2,0	4,2	114	295
Phénanthrène	178	1,2	4,6	101	340
Anthracène	178	1,3	4,5	218	340
Fluoranthène	202	0,2	5,1	107	380
Pyrène	202	0,1	5,3	156	404
Benzo[a]anthracène	228	$1,0 \times 10^{-2}$	5,8	160	420
Chrysène	228	$2,0 \times 10^{-3}$	5,7	255	448
Benzo[b]fluoranthène	252	$1,2 \times 10^{-3}$ (20°C)	6,6	168	481
Benzo[k]fluoranthène	252	$7,6 \times 10^{-4}$	6,8	216	480
Benzo[a]pyrène	252	$3,0 \times 10^{-3}$	6,0	179	475
Dibenzo[a,h]anthracène	278	$5,0 \times 10^{-4}$	6,7	262	524
Benzo[ghi]pérylène	276	$2,6 \times 10^{-4}$	6,7	273	550
Indéno[1,2,3-cd]pyrène	276	$6,2 \times 10^{-2}$	6,6	164	530

Lors d'une contamination environnementale, les cultures peuvent être directement polluées par l'air, mais aussi indirectement par les sols et les eaux après divers processus de transferts [10, 15]. En effet, les HAP peuvent être présents dans les aliments non cuisinés comme les légumes ou les fruits [16].

De plus, les procédés industriels tels que le grillage, le fumage, le séchage ainsi que la torréfaction peuvent introduire des quantités importantes de HAP dans les aliments, soit en favorisant leur formation aux températures élevées, soit en mettant les aliments directement en contact avec les produits de combustion comme c'est le cas lors du séchage des graines pour la production d'huile [13, 14]. Ces procédés technologiques sont donc des sources importantes de pollution en HAP pour les groupes d'aliments suivants : les corps gras, les viandes grillées, les céréales et les produits laitiers [17, 18].

1.4 Toxicité et réglementation des HAP

Il y a bientôt trente ans que les HAP ont été désignés comme composés toxiques par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) [19]. De nombreux travaux ont depuis confirmé le potentiel mutagène et cancérigène de ces substances [12, 19-21]. Les

trois HAP les plus toxiques, à savoir le benzo(a)pyrène (BaP), le benzo(a)anthracène (BaA) et le dibenzo[a,h]anthracène (DBaA) ont été classés par le CIRC comme « cancérigène probable » (groupe 2A). Quatre autres HAP présentant un pouvoir cancérigène possible, le benzo(b)fluoranthène (BbF), le benzo(j)fluoranthène (BjF), le benzo(k)fluoranthène (BkF) et l'indéno[1,2,3,cd]pyrène (IP), appartiennent au groupe 2B. Les risques encourus avec les autres HAP de la liste n'ont pas été évalués [20].

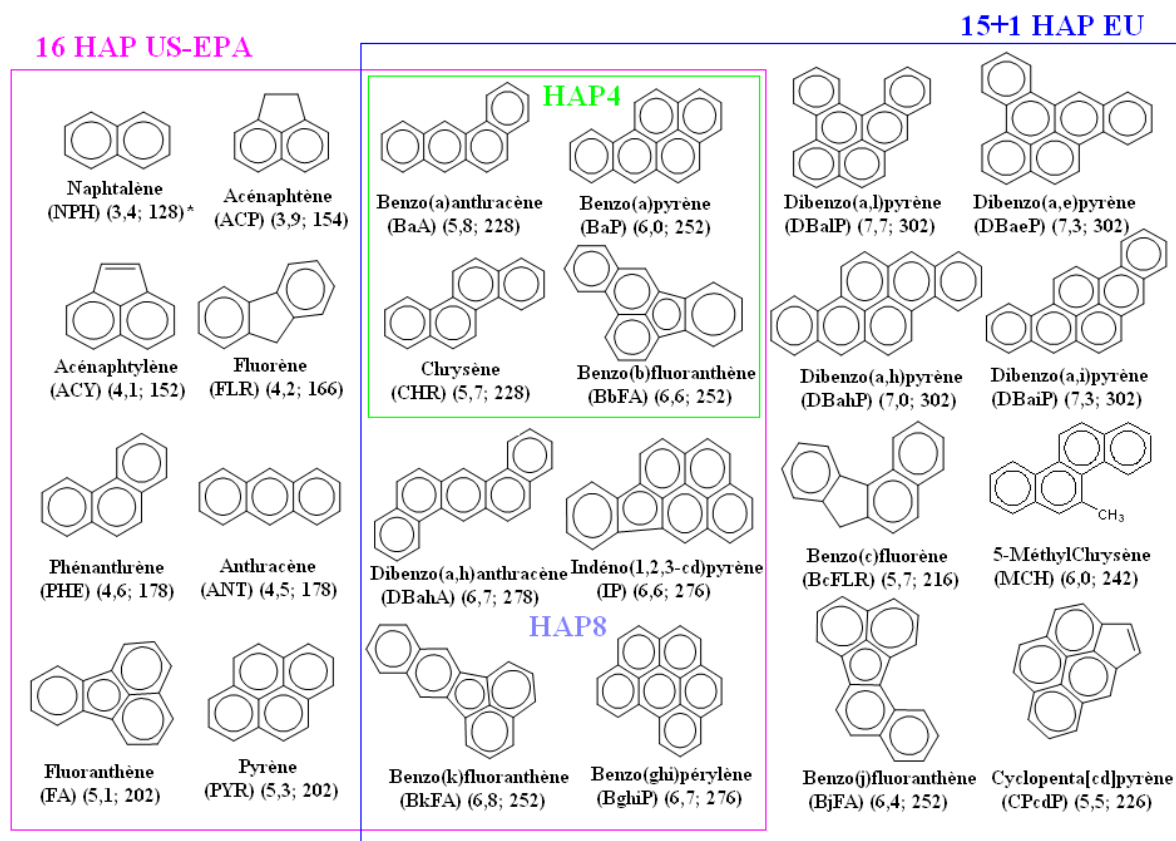
En effet, une fois les molécules d'HAP ingérées par l'organisme, des dérivés époxydes et hydroxylés se trouvent synthétisés au cours de réactions enzymatiques. Ces métabolites, particulièrement réactifs avec l'ADN, l'ARN et les protéines cellulaires engendrent alors des mutations de l'ADN et donc la formation de tumeurs. Etant donnée leur toxicité prononcée, plusieurs organismes ont établi des listes de HAP qu'il est conseillé de surveiller dans les matrices environnementales et alimentaires.

L'agence américaine pour la protection de l'environnement (US-EPA) a établi une liste de 16 HAP classés comme polluants prioritaires dans les échantillons environnementaux, nommée les « 16 HAP US-EPA » (Figure I-I-1) [22].

En 2002, le comité scientifique européen sur les aliments (SCF) (aujourd'hui remplacé par le groupe scientifique de l'agence européenne de sécurité sanitaire des aliments (EFSA)) a défini un groupe prioritaire de 15 HAP en matière d'évaluation des risques sanitaires à long terme consécutifs à une consommation alimentaire de HAP [12]. En effet, ces 15 HAP présentaient une mutagénicité/génotoxicité évidente dans les cellules somatiques chez les animaux de laboratoire in vivo. Ce même comité a recommandé d'utiliser le BaP comme marqueur de la présence et de l'effet toxique des HAP dans les aliments. Le pouvoir carcinogène des HAP totaux était alors estimé à environ dix fois celui du BaP. Ensuite, en 2005, en prenant en compte les évaluations du SCF, le comité mixte (Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture/Organisation Mondiale de la Santé) d'experts sur les additifs alimentaires (JECFA), a recommandé d'ajouter le BcFLR à la précédente liste [23]. Finalement, en 2008, le groupe scientifique sur les contaminants de la chaîne alimentaire (groupe CONTAM) de l'EFSA a officiellement inclus ce composé à la liste des 15 HAP prioritaires [13]. Ces 16 HAP sont communément appelés les « 15+1 HAP EU » afin de les différencier des 16 HAP US-EPA dont huit HAP sont communs (Figure I-I-1). Dans ce même texte, l'EFSA a également conclu que le BaP seul ne permettait pas d'évaluer de façon fiable la contamination des produits alimentaires par les HAP et qu'il était nécessaire d'étendre la surveillance à d'autres HAP. Cette conclusion s'est basée sur l'évaluation de près de 10 000 résultats de taux de HAP réunis par dix-huit Etats membres dans différentes matières premières alimentaires. Le BaP était détecté dans environ 50 % des échantillons. Cependant, dans environ 30 % de l'ensemble des échantillons, d'autres

HAP cancérigènes et génotoxiques ont été détectés malgré des tests négatifs pour le BaP. Le groupe CONTAM de l'EFSA a donc proposé à la Commission européenne de nouveaux indicateurs plus appropriés pour évaluer l'occurrence des HAP dans l'alimentation en se basant sur les données alors disponibles de cancérogénicité par voie orale. Un groupe de 8 HAP (HAP8) et un groupe de 4 HAP (HAP4) ont ainsi été retenus (Figure I-I-1) [13]. Il est à noter que la liste HAP8 est constituée des 8 HAP communs aux listes environnementale (16 HAP US-EPA) et alimentaire (15+1 HAP EU) (Figure I-I-1). La Commission européenne a donc modifié sa réglementation fixant jusqu'alors la concentration maximale en BaP dans certaines denrées alimentaires (Règlement No 1881/2006, [24]). Depuis 2011, de nouvelles teneurs maximales ont été introduites pour le groupe HAP4 tout en maintenant un niveau maximum de BaP seul dans les aliments (Règlement No 835/2011 du 19 août 2011,[25]).

Les abréviations introduites dans la Figure I-I-1 seront utilisées tout au long du manuscrit.



*logP ; masse molaire (g/mol)

Figure I-I-1. Listes des 16 HAP prioritaires de l'US-EPA (16 HAP US-EPA, encadrés en rose), des 16 HAP prioritaires de l'EFSA (15+1 HAP EU, encadrés en bleu), des HAP8 de l'EFSA (communs aux listes US-EPA et EFSA) et des HAP4 de l'EFSA (encadrés en vert).

2. Les HAP dans les huiles alimentaires

2.1 Origines des HAP dans les huiles

Les HAP présents dans les huiles végétales proviennent de différentes origines. Tout d'abord, les graines peuvent être polluées par dépôts de particules atmosphériques elles mêmes contaminées. Les HAP, composés apolaires, se retrouvent alors transférés au produit final et d'autant plus facilement lorsque la matrice est hydrophobe comme les huiles alimentaires. Cependant, pour les corps gras, la source majeure de contamination est due au séchage direct des graines par des gaz de combustion au cours duquel les produits de combustion entrent en contact avec les graines [2, 26, 27]. Cette étape intervient avant celle de trituration des graines et est plus ou moins intense selon le type d'huile. Ainsi, les teneurs les plus élevées en HAP sont généralement retrouvées dans les huiles de pépins de raisin ou encore de grignons d'olive [26]. Enfin, d'autres sources mineures de contamination des huiles par les HAP existent comme l'utilisation d'emballages en polypropylène recyclé pouvant alors contaminer les huiles végétales en HAP par rediffusion [28] ou encore des contaminations accidentelles avec des résidus d'huiles minérales naturellement riches en HAP alkylés pouvant survenir durant les procédés de fabrication des huiles [29, 30].

2.2 Le raffinage comme outil d'élimination des HAP

Le raffinage est un outil technologique incontournable pour la production d'huiles de bonne qualité. Son objectif premier est de garantir les propriétés organoleptiques (goût et odeur neutres, limpidité, couleur jaune, etc.) et nutritionnelles, mais aussi une bonne stabilité des huiles dans le temps. Plusieurs étapes sont donc mises en œuvre afin d'éliminer les composés indésirables majeurs tels que les phospholipides, les acides gras libres, les auxiliaires de fabrication, les composés volatils, etc, mais aussi les contaminants potentiellement présents dans l'huile comme les pesticides, les solvants d'extraction, les HAP ou encore les phtalates et les esters de 3-monochloropropane-1,2-diol, contaminants nouvellement connus [31].

La nature, l'origine, la concentration ainsi que les exigences réglementaires de chaque contaminant sont les principaux éléments pris en compte pour la détermination des conditions optimales de leur élimination par un procédé de raffinage chimique ou physique. Les propriétés physico-chimiques des contaminants doivent être également judicieusement

étudiées pour une bonne compréhension du comportement et du devenir de l'espèce lors des différentes étapes du raffinage.

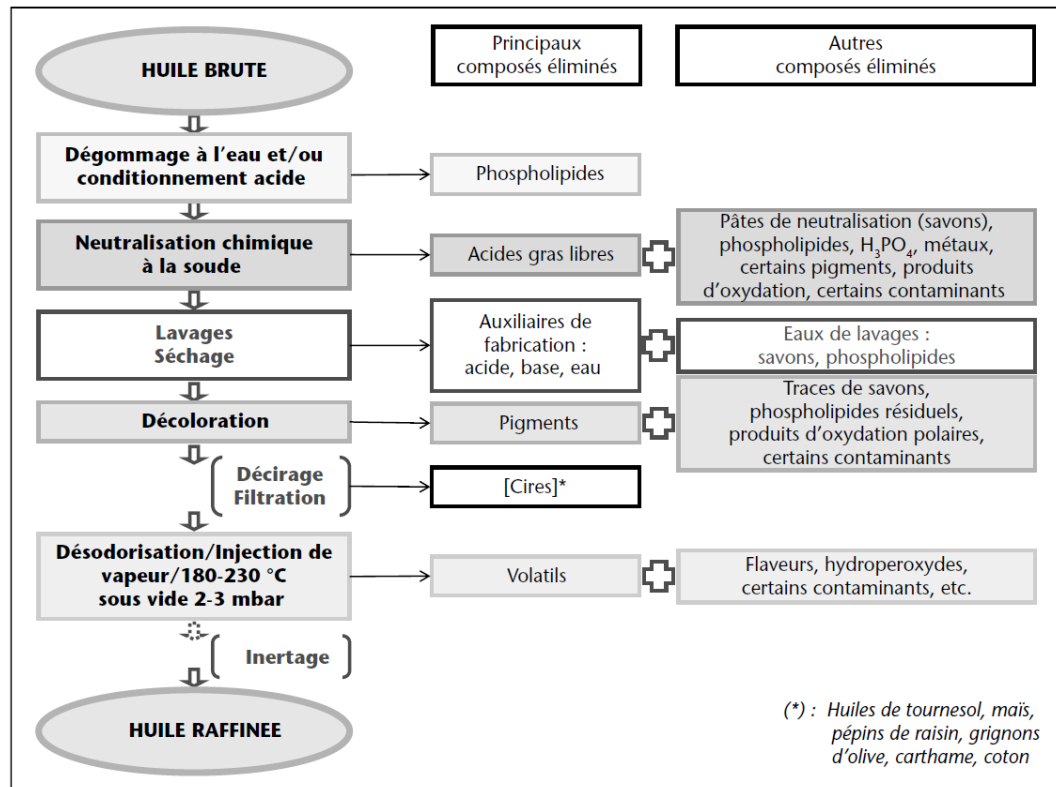
Il existe deux types de raffinage : chimique et physique nommé plus communément « distillation neutralisante ». La principale différence entre ces deux voies de raffinage provient de la méthode d'élimination des acides gras libres. Pour ce faire, le raffinage chimique procède à une étape de neutralisation à la soude tandis que la distillation neutralisante met en œuvre un vide poussé avec injection de vapeurs (Figure I-1-2).

Comme présenté sur la Figure I-1-2 détaillant les deux types de raffinage, chaque étape permet d'éliminer des produits majoritaires comme les acides gras tout en éliminant d'autres composés indésirables tels que les contaminants potentiels ou bien les co-produits formés au cours d'étapes précédentes.

Durant les années 2004, 2005 et 2009, l'ITERG a étudié les conditions d'élimination de quatre HAP (deux HAP légers : PHE et ANT et deux HAP lourds : BaP et DBahA par raffinage chimique et distillation neutralisante à l'aide de leurs installations pilotes [31]. Pour cette étude, des huiles végétales ont été dopées à différents niveaux de concentration en ces quatre HAP : de 600 à 2000 $\mu\text{g/kg}$.

Les étapes de conditionnement acide, de neutralisation chimique, de lavage et de séchage ont eu une faible influence sur la concentration des quatre HAP concernés. En effet, 20 % des HAP ont été éliminés pour un dopage de 600 $\mu\text{g/kg}$ contre 5 % seulement pour un dopage de 2000 $\mu\text{g/kg}$. Ces observations s'expliquent principalement par les propriétés physico-chimiques des HAP qui sont des espèces à fort caractère lipophile ($\log P$ élevés) et donc faiblement solubles dans l'eau. Puisque les premières étapes de ce raffinage utilisent majoritairement des phases aqueuses, elles n'ont donc que très peu d'effet sur l'élimination des HAP qui restent alors solubilisés dans l'huile [31].

(A)



(B)

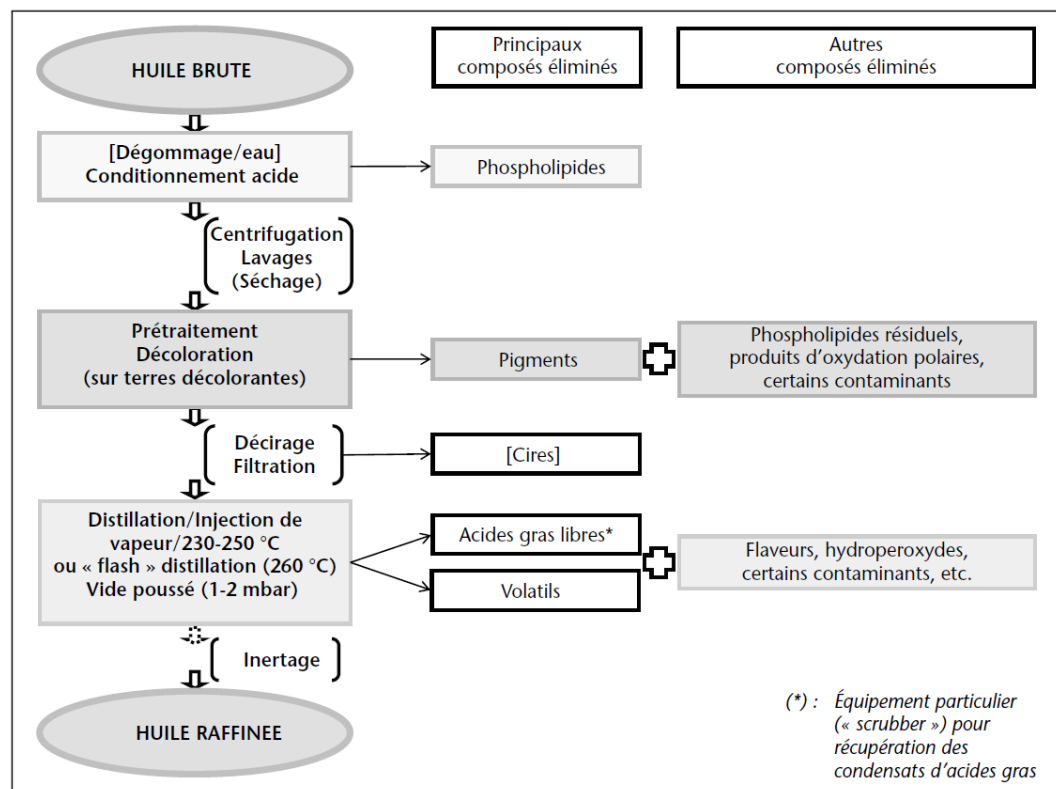


Figure I-I-2. Étapes et composés éliminés lors d'un raffinage par voie chimique (A) et physique (distillation neutralisante) (B). D'après [31].

L'étape de décoloration visant principalement à éliminer les pigments présents dans les huiles brutes, s'est révélée efficace pour l'élimination des HAP de hauts poids moléculaires, à condition qu'elle soit réalisée en présence de charbon actif. La quantité d'HAP lourds éliminée est alors dépendante de plusieurs paramètres comme le type de charbon actif utilisé (surface spécifique, diamètres des pores, granulométrie, etc.) mais aussi de sa facilité de filtration après décoloration. Il est également nécessaire d'optimiser la quantité de charbon actif introduite dans l'huile brute afin d'éliminer un maximum de contaminants tout en garantissant de bonnes propriétés de filtration et des coûts raisonnables. Ainsi, les teneurs en HAP des cargaisons d'huiles brutes sont régulièrement évaluées afin d'adapter la quantité de charbon actif à utiliser pendant l'étape de décoloration et ainsi la rendre la plus efficace possible. La durée de l'étape de décoloration est aussi un paramètre à prendre en compte. Les travaux réalisés par l'ITERG [31] ont démontré que pour descendre en dessous du seuil de 2 µg/kg en HAP lourds, l'étape de décoloration devait être suffisamment prolongée (pour une huile dopée à 600 µg/kg, un temps de 45 min était nécessaire). Dans le cas d'une contamination importante (dopage à 2000 µg/kg), l'efficacité de l'étape de décoloration a également été confirmée puisqu'elle a permis d'atteindre des teneurs résiduelles en HAP conformes à la réglementation et cela en une seule étape.

Les HAP légers, difficilement éliminés lors de l'étape de décoloration, l'ont été durant les étapes de désodorisation et de distillation neutralisante. Ces tendances ont été démontrées par l'ITERG sur une huile dopée en HAP légers et lourds ayant subi les premières étapes d'un raffinage chimique classique avec une étape de décoloration réalisée en absence de charbon actif. Ils ont alors pu prouver que la désodorisation ne permettait pas d'éliminer les HAP lourds et cela quelles que soient les conditions appliquées en termes de température et de quantité de vapeur. Au contraire, cette étape s'est révélée efficace pour l'élimination des HAP légers, efficacité qui augmentait avec la température.

Enfin, des raffinages complets de type chimique ou distillation neutralisante conduits par l'ITERG sur une huile brute dopée à environ 600 µg/kg, ont permis de produire des huiles raffinées présentant de très faibles concentrations résiduelles en HAP et conformes aux limites réglementaires alors en vigueur (2 µg/kg en BaP). Les performances d'un raffinage par distillation neutralisante pour l'élimination des HAP légers et lourds, sont présentées sur la Figure I-I-3.

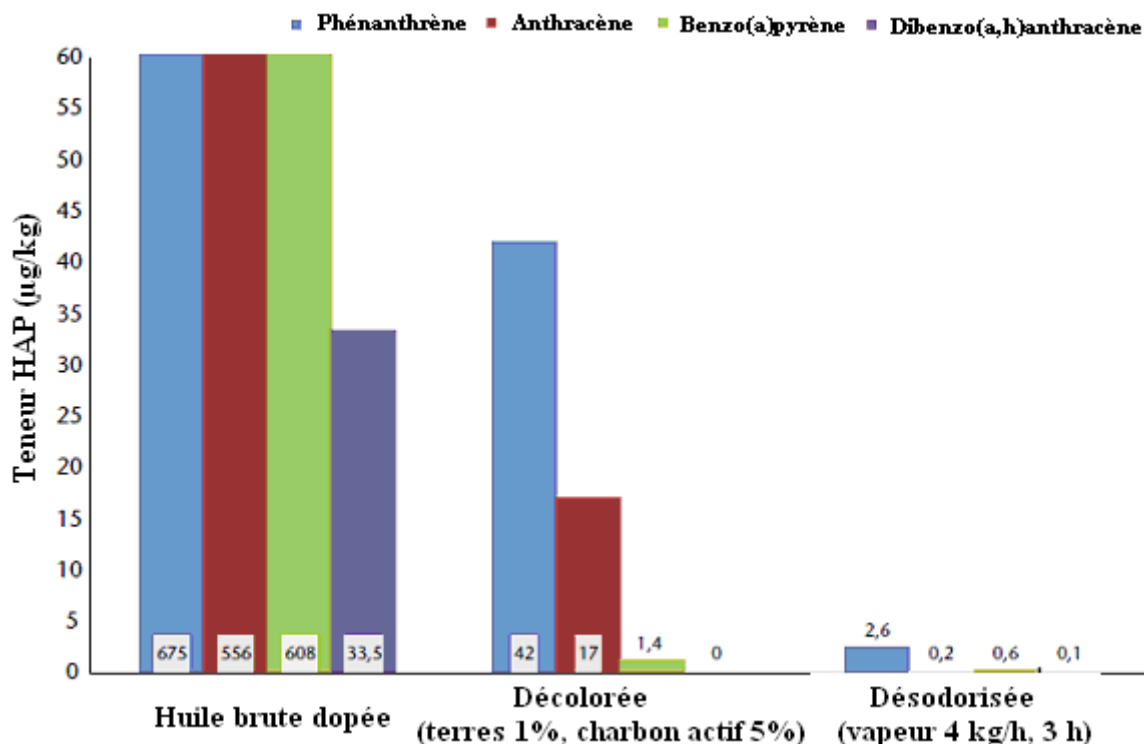


Figure I-I-3. Elimination des HAP légers et lourds au cours d'un raffinage physique ou distillation neutralisante. D'après [31].

2.3 Réglementation des HAP dans les huiles

La première loi européenne fixant les niveaux maximums en HAP dans les aliments a été promulguée en 2006 par la Commission européenne [24]. Dans cette loi No 1881/2006, la Commission européenne avait réglementé la teneur maximale en BaP dans les huiles raffinées à 2 µg/kg, en se basant sur les conclusions apportées par le SCF en 2002 considérant le BaP comme un marqueur de la présence des HAP les plus toxiques dans les aliments [12] et par le JECFA en 2005 [23] estimant les limites d'exposition des HAP sur la base d'une évaluation des risques.

Comme indiqué précédemment, un récent amendement à la loi No 1881/2006, rédigé par la Commission européenne en 2011, modifie la précédente réglementation en augmentant le nombre de HAP à surveiller dans les matrices alimentaires [25]. Cette nouvelle réglementation s'est principalement basée sur les conclusions de l'EFSA qui conseillait, en 2008, d'introduire une teneur maximale pour le groupe HAP4 [13]. Néanmoins, dans cette nouvelle loi, un niveau maximum individuel pour le BaP a été maintenu afin de pouvoir comparer les données précédentes et futures. Ainsi, la teneur maximale en BaP présent dans les huiles et les graisses (excepté le beurre de cacao et l'huile de noix de coco)

destinées à la consommation directe ou en tant qu'ingrédient ajouté dans un aliment ne doit toujours pas excéder 2 µg/kg de produit. Aussi, la somme des concentrations des HAP appartenant au groupe « HAP4 » à savoir le BaP, le BaA, le CHR et le BbFA ne doit désormais pas dépasser 10 µg/kg d'huile raffinée. Les industriels des corps gras ont donc pour obligation d'analyser leurs produits avant leur mise sur le marché afin de vérifier leur conformité avec cette nouvelle réglementation.

2.4 Méthodes normalisées pour l'analyse des HAP dans les corps gras

Aujourd'hui, il existe trois méthodes normalisées portant sur l'analyse soit du BaP, soit d'une quinzaine de HAP dans les corps gras. Ces méthodes sont présentées dans le Tableau I-I-2.

La norme ISO (Organisation Internationale de Normalisation) 15302 (1998 et révisée en 2007) concerne la détermination du BaP dans les huiles brutes et raffinées par chromatographie en phase liquide haute performance couplée à une détection de fluorescence (HPLC-fluo) après une étape de purification sur colonne d'alumine [32].

Une deuxième norme, nommée ISO 15753 (2006), spécifie une méthode de dosage de 15 HAP basée sur des extractions liquide/liquide (LLE) avec un mélange acétonitrile (ACN)-acétone, suivies de purifications sur cartouches C18 puis Florisil® et une analyse en HPLC-fluo [33].

Enfin, une troisième norme : ISO 22959 (2009), concerne la détermination de 17 HAP dans les corps gras et les huiles à l'aide d'une double chromatographie en ligne, la première sur une colonne de type « donneur-accepteur » permettant d'isoler les HAP et la seconde sur silice greffée C18, permettant la séparation des HAP qui sont ensuite détectés par fluorescence [34].

L'ensemble de ces méthodes analytiques permet d'atteindre le niveau de sensibilité alors réglementé (2 µg/kg pour le BaP). Cependant, ces méthodes normalisées sont souvent longues, complexes et coûteuses et restent donc très peu utilisées dans l'industrie des corps gras. Généralement, les professionnels des corps gras ont recours à ces méthodes normalisées afin de valider leur propre méthode d'analyse en interne.

Tableau I-I-2. Caractéristiques des méthodes normalisées pour l'analyse des HAP dans les corps gras.

Norme	Année	Application	Préparation de l'échantillon	Méthode d'analyse	LOQ	Gamme de linéarité
ISO 15302	1998 (révisée en 2007)	Détermination du BaP dans les corps gras et les huiles brutes et raffinées	Purification sur alumine (+ sulfate de sodium) Evaporation et reprise dans le tétrahydrofurane	HPLC phase inverse-fluo	0,1 µg/kg	0,1 - 50 µg/kg
ISO 15753	2006	Détermination de 15 HAP* dans les corps gras d'origines animale et végétale (sauf huile de palme et de grignons d'olive)	LLE (ACN/acétone, 6/4 (v/v)) Purification sur cartouche C18 puis Florisil® Evaporation et reprise dans ACN	HPLC phase inverse-fluo	0,2 µg/kg sauf 0,3 µg/kg (FA, BghiP) 1 µg/kg (IP) HAP légers (ex : NPH, ACP, FLR) non quantifiables : perte lors de l'évaporation du solvant	-
ISO 22959	2009	Dosage de 17 HAP**	Purification en chromatographie de complexe donneur accepteur d'électron	HPLC phase inverse-fluo	0,1 µg/kg	0,1 - 3,5 µg/kg

*15 HAP : 16 HAP US-EPA excepté ACY

**17 HAP : HAP8 + ANT, PHE, FA, PYR, benzo(e)pyrène, pérylène, anthanthrène, coronène, benzo(a)fluoranthène

3. Analyse des HAP dans les huiles

L'analyse des HAP présents à l'état de traces dans les huiles alimentaires présente plusieurs difficultés. En effet, étant donné le caractère hydrophobe des HAP et de la matrice huile dans laquelle ils se trouvent, les étapes d'extraction et de purification sont généralement difficiles à mettre en œuvre. Une autre difficulté provient des très faibles niveaux de concentration de chaque HAP à quantifier. Pour relever un tel défi, il est nécessaire de développer une ou plusieurs étapes d'extraction sélectives et de les coupler à une séparation hautement résolutive et à un mode de détection à la fois sensible et spécifique. Les différentes études extraites de la littérature sont présentées dans le Tableau I-I-3.

3.1 Préparation de l'échantillon

La principale difficulté liée à la détermination des HAP dans les huiles est d'isoler les composés d'intérêt des composés majoritaires eux aussi lipophiles, comme les triglycérides et les acides gras. En effet, l'élimination de la matrice huile est une étape incontournable non seulement pour limiter les actions de maintenance sur le système chromatographique mais également pour atteindre les faibles teneurs actuellement réglementées. Les étapes d'extraction et de purification, généralement regroupées en une seule étape, sont parfois longues et laborieuses.

Parmi les techniques les plus souvent employées, une première étape de dilution de l'huile suivie d'une extraction sur phase solide (SPE) semble être la méthode de choix pour extraire les HAP des huiles [27, 35-40]. Toutefois, dans certains cas, l'étape de SPE n'était pas suffisante et une ou plusieurs LLE ont dû être rajoutées après la dilution de l'échantillon [35, 41-46]. La première étape de dilution de l'huile est généralement réalisée dans l'hexane [27, 28, 35, 36, 39, 41-43, 47-49]. La LLE, quant à elle, utilise une variété de solvants, les plus courants étant le diméthylsulfoxyde (DMSO) [41, 45, 50], le diméthylformamide [35, 42, 43] et le cyclohexane [41, 45, 50]. Une étape de saponification couplée à la LLE s'est quelquefois démontrée performante pour diminuer la teneur en lipides en utilisant par exemple du KOH ou du NaOH en mélange avec de l'éthanol ou du méthanol (MeOH) [28, 51]. En revanche, lors d'une telle procédure, des pertes en BaP ont été identifiées à cause d'une solubilisation partielle dans la phase alcoolique [28].

Récemment, l'extraction assistée par ultrasons (USAE) a été utilisée afin d'améliorer l'efficacité de la LLE ; l'énergie des ultrasons permettant d'augmenter la vitesse de transfert de masse entre l'huile et le solvant (généralement l'ACN, [52, 53]). Plus particulièrement, l'extraction par émulsion assistée par ultrasons (USAEME) est de plus en plus utilisée aujourd'hui. Contrairement à l'USAE, ce mode consiste à ajouter deux solvants non-miscibles à l'échantillon d'huile de sorte à créer une émulsion et ainsi améliorer davantage les rendements d'extraction. Du DMSO ou des mélanges MeOH/eau (phase dispersante) et de l'hexane (phase continue) sont généralement utilisés pour former des émulsions en présence d'ultrasons [53]. Dans le cas d'une USAEME, un faible volume de phase dispersante est ajouté. Les performances de l'USAE et de l'USAEME pour l'extraction de 11 HAP EU et de 2 HAP US-EPA d'huiles de poisson ont été comparées dans une étude récente [53]. Bien que ces deux modes aient conduit à des rendements d'extraction similaires (de 70 à 100 % pour l'USAE et de 70 à 108 % pour l'USAEME), l'USAEME de part sa rapidité d'extraction et de sa faible consommation de solvant s'est révélée plus avantageuse.

Concernant l'étape de SPE, les deux stratégies de purification (rétention de la matrice lipidique et élution des HAP ou au contraire, rétention des HAP, élimination des lipides lors d'un lavage et élution des HAP avec un petit volume de solvant) ont été exploitées en utilisant différents types d'adsorbants tels que C18 [43, 44, 53], Florisil [42], silice [27, 36, 41, 54], ou bien des mélanges de phases comme C18/Florisil® [38], polystyrène/divinylbenzène (PS/DVB) [37, 55] ou C18/C8 [35]. Par exemple, une phase de silice retient les triglycérides pendant que les HAP sont élués avec un mélange de solvants hexane/dichlorométhane [27]. Lorsque des cartouches PS/DVB sont utilisées, la stratégie d'extraction est opposée : les HAP sont retenus sur la phase lors de la percolation puis les interférents (triglycérides et composés non aromatiques) sont éliminés en lavant avec un mélange isohexane/méthyl *tert*-butyl éther et enfin les HAP sont élués avec du tétrahydrofurane (THF) [37]. Lorsque les matrices sont complexes et contiennent de grandes quantités d'hydrocarbures insaturés telles que les huiles d'olive ou les huiles de grignons d'olive, il peut être nécessaire d'ajouter une étape de purification supplémentaire en procédant par exemple à une SPE sur une phase amino (NH₂) consécutive à une SPE sur une phase de silice [54].

Des colonnes à base d'alumine [39, 51] et de gel de silice [45, 46, 51] ont également été employées pour l'extraction et la purification. Certaines études ont, quant à elles, utilisé la chromatographie de complexe donneur-accepteur permettant de retenir les HAP via des interactions fortes de type π - π [39, 40]. Une fois les HAP retenus sur l'adsorbant, les lipides interférents sont élués en utilisant un solvant dépourvu d'électrons π de type isopropanol et, finalement, les HAP sont récupérés à l'aide d'un solvant organique de type mélanges hexane/THF ou ACN. Cependant, il a été observé que les HAP les plus légers, e.g. NPH et ACY se trouvaient co-élués avec la fraction lipidique.

La technique de dispersion de support solide dans la matrice (*Matrix Solid-Phase Dispersion*, MSPD) [38] a également été utilisée pour l'extraction des HAP des huiles alimentaires et ses performances ont été comparées à celles obtenues par SPE utilisant deux couches de phases (C18 en bas et Florisil® en haut) [38]. Dans la méthode MSPD, l'échantillon d'huile a tout d'abord été mélangé avec la phase C18 dans un mortier puis le mélange a été transféré dans une cartouche SPE remplie de phase Florisil et enfin, l'élution des HAP a été réalisée de façon identique à la méthode SPE. Malgré l'avantage majeur de la MSPD qui est sa faible consommation de solvant, la SPE a été plus simple à utiliser et a permis d'obtenir de meilleurs rendements d'extraction.

Une nouvelle phase pour la MSPD a été récemment proposée pour l'extraction des HAP présents dans les huiles alimentaires [56]. Plus précisément, la méthode consistait en une extraction sur phase solide magnétique à l'aide d'adsorbants de type nanotubes de carbone multi-feuillets. De part leur grande surface spécifique et les fortes interactions π - π qu'ils sont

capables de développer avec les HAP, les nanotubes de carbone multi-feuillets ont permis d'atteindre des rendements d'extraction entre 87 et 122 % avec de bonnes répétabilités ($CV < 10\%$). L'extraction était très rapide puisqu'elle nécessitait uniquement deux étapes faciles et rapides à mettre en œuvre que sont le mélange de l'adsorbant avec la matrice et le lavage de la phase avant la désorption des HAP. Néanmoins, avant de pouvoir utiliser l'adsorbant, de longues étapes de lavage devaient être réalisées, ce qui constitue l'inconvénient majeur de cette méthode d'extraction.

La microextraction sur phase solide (SPME) en mode espace de tête a également été utilisée pour l'extraction de HAP légers, composés de 2 à 4 cycles aromatiques, à l'aide d'une fibre DVB/carboxen/polydiméthylsiloxane (PDMS) exposée à 100°C pendant 60 min avant l'analyse en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) [57]. Des LOD inférieures à 2 µg/kg ont été obtenues avec des précisions supérieures à 80 %.

Enfin, une SPME avec immersion de la fibre creuse directement dans l'échantillon d'huile dilué dans l'hexane a été utilisée pour l'analyse des « 15+1 HAP EU » [49] et du BaP seul [48]. Pour cela, une fibre Carboxen/PDMS a permis d'extraire les HAP de l'huile par interactions π - π avec la phase carbonée. Avant les étapes de désorption et d'injection des analytes, la fibre a été rincée dans l'hexane pur afin d'enlever un maximum de triglycérides retenus à la surface de la fibre et donc de diminuer l'effet de matrice. Cette méthode a été validée pour l'analyse des 15+1 HAP EU par GC-MS bidimensionnelle (GCxGC-MS) avec des valeurs de précision supérieures à 80 % (excepté pour le BcFLR, CHR, 5-MCH et DBaP), de faibles valeurs de LOD ($< 1,4\text{ }\mu\text{g/kg}$) et de bonnes répétabilités ($CV < 11\%$ excepté pour le BcFLR et le CPcdP). En procédant à une analyse GC-MS monodimensionnelle, la même procédure d'extraction a permis de déterminer le BaP avec une LOQ de 0,5 µg/kg.

3.2 Techniques chromatographiques et systèmes de détection

L'HPLC couplée à une détection d'absorbance UV (HPLC-UV) ou de fluorescence (HPLC-fluo) et la GC-MS sont les techniques analytiques les plus employées pour l'analyse des HAP.

3.2.1 Chromatographie en phase liquide haute performance

Depuis longtemps, l'HPLC est la technique la plus répandue pour l'analyse des HAP. Dans le passé, les HAP séparés en HPLC étaient le plus souvent détectés par une détection d'absorbance UV [58]. Cependant, les principaux inconvénients de ce type de détection sont son manque de sélectivité et de sensibilité engendrant des effets de matrice surtout lorsque les matrices à analyser sont complexes. A l'inverse, la détection de fluorescence a l'avantage d'être plus sensible et spécifique, ce qui en fait un mode de détection de choix en HPLC, comprenant habituellement un système de programmation des longueurs d'onde d'excitation et d'émission. Ainsi, l'HPLC-fluo a été la technique d'analyse la plus fréquemment appliquée pour la détermination des HAP, qui sont naturellement fluorescents, dans les huiles et est d'ailleurs à la base des méthodes officielles proposées par l'ISO [32-34] et l'US-EPA [59].

Jusqu'à présent, la majorité des travaux a concerné la séparation des 16 HAP US-EPA [27, 35, 39, 44] bien que certaines équipes se soient intéressées à l'analyse des 15+1 HAP EU depuis 2008 (avis de l'EFSA, [13]) [40, 53]. Parmi ces composés, certains présentent de bonnes propriétés de fluorescence et sont donc facilement détectés, e.g. ANT et BkFA, d'autres ne produisent qu'un faible signal de fluorescence, e.g. le BjFA, voire ne fluorescent pas, e.g. le CPcdP et ne peuvent être détectés qu'en UV [40, 44]. Concernant les niveaux de sensibilité, les techniques de préconcentration, en majorité la SPE, permettent d'atteindre des LOD comprises entre 0,01 et 1 µg/L pour les HAP dans les huiles.

Les colonnes chromatographiques les plus courantes sont remplies de phases C18 spécialement conçues pour la séparation des HAP de dimensions caractéristiques : de 100 à 250 mm de longueur, de 3,0 à 4,6 mm de diamètre interne et de 3 à 5 µm de taille de particules. La chromatographie en phase liquide ultra haute performance (UHPLC) utilisant des tailles de particules inférieures à 2 µm a déjà été mise en œuvre pour l'analyse de HAP dans des matrices environnementales [60] et alimentaires [61, 62], toutefois, elle n'a pas été rapportée pour l'analyse de HAP dans les huiles alimentaires. Une future utilisation de l'UHPLC permettrait d'augmenter la rapidité d'analyse et d'améliorer l'efficacité des pics tout en diminuant la consommation de solvant par rapport à l'HPLC traditionnelle.

La phase mobile utilisée pour l'analyse des 16 HAP US-EPA est souvent un gradient ACN ou MeOH dans l'eau avec une augmentation linéaire du pourcentage en solvant organique de 50-60 % à 80-100 % [27, 35, 37, 39, 44, 45, 53, 54]. Les temps d'analyse sont alors généralement compris entre 35 et 50 min (Figure I-I-4). Bien que le détecteur de fluorescence soit le plus largement répandu, certains composés appartenant à la liste des 16

HAP US-EPA ne fluorescent pas et doivent donc être détectés en UV (e.g. ACY) (Figure I-I-4).

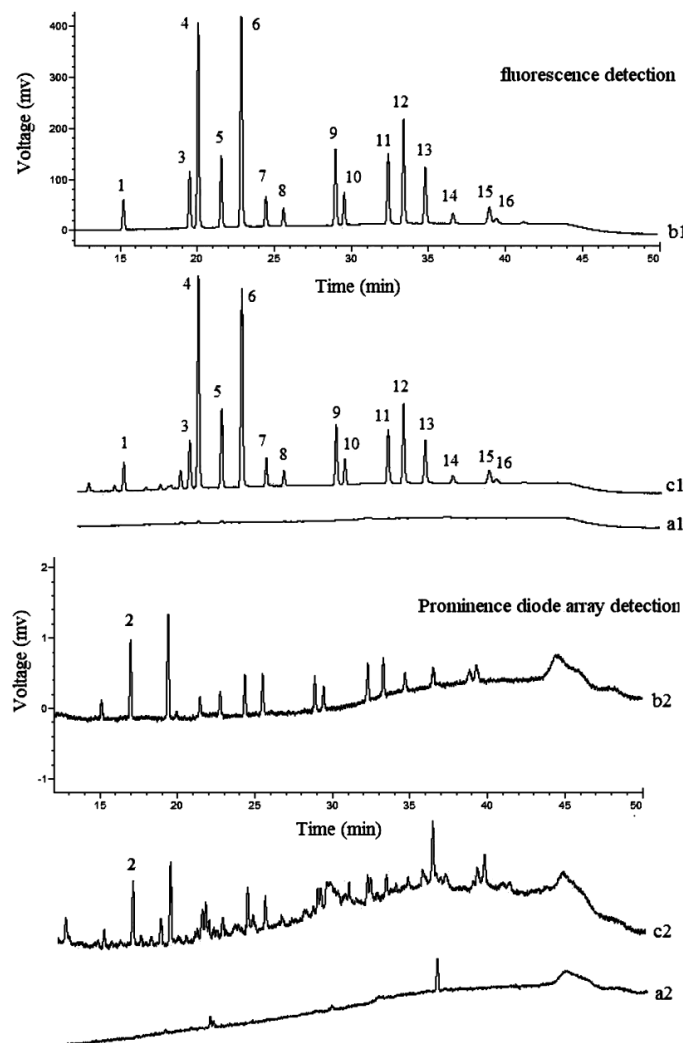


Figure I-I-4. Chromatogrammes obtenus en HPLC-UV-fluo (a1 et a2) d'huiles de soja, (b1 et b2) de solutions standard, (c1 et c2) d'huiles de soja dopées avec 40 µg/kg de chaque HAP. (1) NPH, (2) ACY, (3) ACP, (4) FLR, (5) PHE, (6) ANT, (7) FA, (8) PYR, (9) BaA, (10) CHR, (11) BbFA, (12) BkFA, (13) BaP, (14) DBahA, (15) BghiP, (16) IP. D'après [44].

Concernant les 15+1 HAP EU, un gradient plus complexe est souvent nécessaire pour séparer les paires de HAP critiques (e.g. PYR/BcFLR et DBahP/BghiP) [40, 43] et même, dans certains cas, un montage de plusieurs détecteurs en série a dû être utilisé [40, 63]. Deux détecteurs de fluorescence de longueurs d'onde spécifiques et un détecteur UV montés en série ont ainsi permis d'identifier et de quantifier les 15+1 HAP EU en mélange avec le benzo(e)pyrène (BeP) et le benzo(b)chrysène [63]. La méthode HPLC a permis de séparer ce mélange de HAP en 40 min (Figure I-I-5A) à l'aide d'un gradient classique (75% en ACN pendant 10 min puis une augmentation linéaire du pourcentage en ACN jusqu'à 100% en 25 min) et d'atteindre des LOQ en accord avec la concentration de BaP

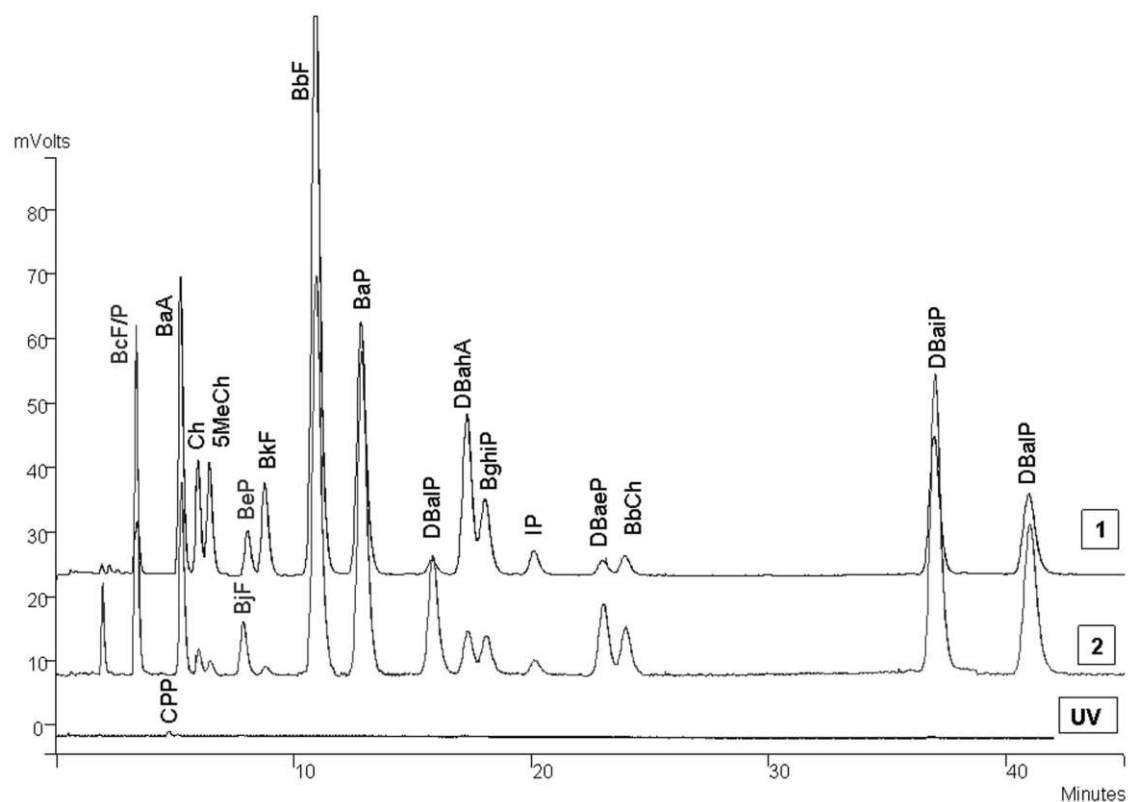
réglementée en 2005 ($\leq 0,7 \mu\text{g.kg}^{-1}$), excepté pour le CPcdP qui présente une faible absorbance en UV (LOQ de $27,8 \mu\text{g.kg}^{-1}$). En adaptant les longueurs d'onde d'excitation et d'émission, les deux détecteurs de fluorescence ont permis de quantifier individuellement les composés appartenant à des paires de HAP non séparées comme BcFLR/PYR et BjFA/BeP. Enfin, en utilisant un gradient d'élution plus long (Tableau I-I-3), un mélange complexe constitué de 25 HAP (mélange précédent plus les 16 HAP US-EPA, sauf l'ACY) a pu être séparé en 50 min environ (Figure I-I-5B).

Malgré les gains notables en sensibilité et sélectivité de la détection de fluorescence en comparaison avec la détection UV, elle ne permet pas de détecter les HAP non fluorescents et peut toutefois présenter des problèmes de sélectivité, principalement lorsque des impuretés telles que des dérivés alkylés des HAP sont retrouvées dans l'échantillon [64]. La GC-MS est alors la technique alternative privilégiée afin d'améliorer l'identification des composés ou de confirmer les résultats obtenus.

3.2.2 Chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur de spectrométrie de masse

La GC-MS est la technique analytique de plus en plus utilisée pour l'analyse des HAP dans les huiles alimentaires [38, 41, 42, 46-50, 52, 55-57, 65, 66]. Etant donné le faible signal de fluorescence de certains HAP (NPH, ACY, ACP et FLR), la GC-MS est parfois incontournable.

(A)



(B)

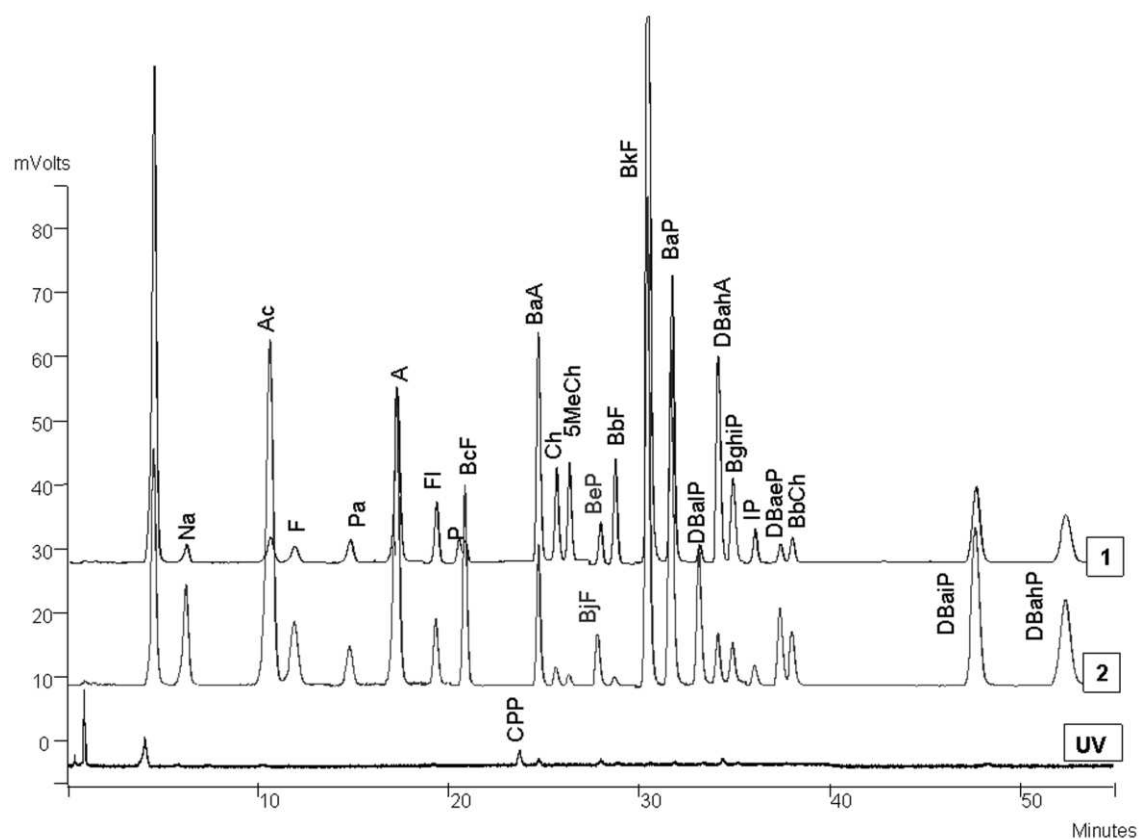


Figure I-I-5. Chromatogrammes (A) des 15+1 HAP EU plus le BbCHR et le BeP (mélange 1) et (B) du mélange 1 plus les 16 HAP US-EPA (excepté ACY), obtenus avec trois détecteurs montés en séries : un détecteur UV et deux détecteurs de fluorescence (1&2). D'après [63].

Pour la séparation des HAP, les phases stationnaires 5 % phényl/95 % méthylpolysiloxane (e.g. HP-5 ou HP-5ms) sont les plus courantes dans la littérature (Tableau I-I-3). Cependant, sur ce type de colonne, certains HAP peuvent co-éluer, rendant impossible la quantification des composés de masses similaires, i.e. des isomères. Ainsi, la GC a été considérée comme une technique pas suffisamment résolutive par l'US-EPA [59]. En effet, parmi les 15+1 HAP EU, plusieurs groupes de HAP présentent de faibles résolutions : CPcdP/BaA/CHR, BbFA/BjFA/BkFA et enfin DBahA/IP [11, 67] (Figure I-I-6). Les colonnes de type 5ms sont également problématiques dans le cas de la détermination des HAP lourds, tels que les dibenzopyrènes, puisqu'ils interagissent fortement avec la phase stationnaire provoquant alors des élargissements de pics et donc une perte en sensibilité. Quatre dibenzopyrènes étant inclus dans la liste des 15+1 HAP EU (DBaeP, DBahP, DBaiP, DBaIP), des méthodes de séparation adaptées à ces composés doivent, par conséquent, être développées. Dans cette optique, des phases stationnaires de plus grande polarité ont été testées et bien que leurs performances pour la séparation des dibenzopyrènes aient déjà été démontrées dans la littérature, leurs applications dans le domaine de l'analyse des aliments restent limitées [47, 67, 68]. En effet, Gómez-Ruiz et coll. ont évalué les performances de différentes phases stationnaires incluant la phase usuelle 5 % phényl/95 % méthylpolysiloxane et d'autres phases plus polaires telles que les colonnes 50 % phényl/50 % méthylpolysiloxane (e.g. DB-17ms) et la phase (Optima® δ-6), pour l'analyse des 15+1 HAP EU en GC-MS [67]. La phase 50 % phényl/50 % méthylpolysiloxane (DB-17ms) a donné les meilleurs résultats en termes de séparation (les trois groupes de HAP critiques : CPcdP/BaA/CHR, BbFA/BjFA/BkFA et DBahA/IP étaient résolus, Figure I-I-6) et de rapports signal/bruit pour les HAP les plus lourds, i.e. les dibenzopyrènes. Finalement, en présence de cette colonne, les 15+1 HAP EU étaient séparés en 45 min (Figure I-I-7).

Des applications en mode fast GC utilisant des colonnes de faibles dimensions [47, 69] et en mode GC bidimensionnelle (GC x GC) ont été publiées [49]. En fast GC, après optimisation des conditions chromatographiques (principalement la nature de la phase stationnaire), une séparation des 15+1 HAP EU a été obtenue sur une phase moyennement polaire de type 50 % phényl/50 % méthylpolysiloxane (10 m x 0,1 mm, 0,1 µm) [69]. En mode GC x GC, la première dimension met généralement en œuvre une colonne non polaire (5 % phényl polysilphénylène-siloxane, colonne de 30 m) tandis que la seconde dimension utilise une phase polaire (50 % phényl polysilphénylène-siloxane, colonne de 1 m). Bien que le pouvoir résolutif se trouve amélioré, les données générées sont nombreuses et complexes et nécessitent l'utilisation de logiciels adaptés.

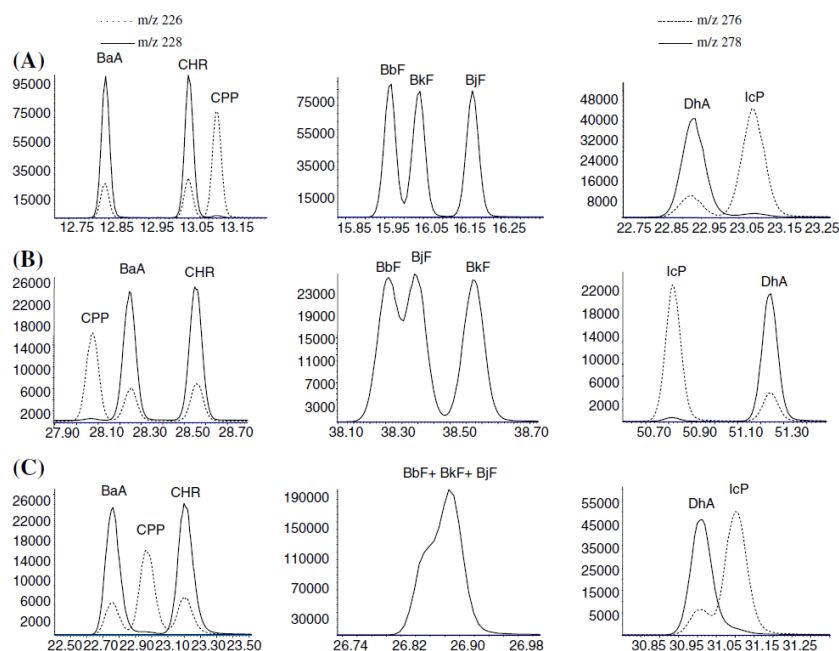


Figure I-I-6. Séparations des paires/triplets critiques de HAP obtenues en GC-MS sur trois colonnes différentes : (A) DB-17ms (60 m x 0,25 mm, 0,25 μ m), (B) DB-5ms (60 m x 0,25 mm, 0,25 μ m), (C) Optima® δ -6 (30 m x 0,25 mm, 0,25 μ m). D'après [67].

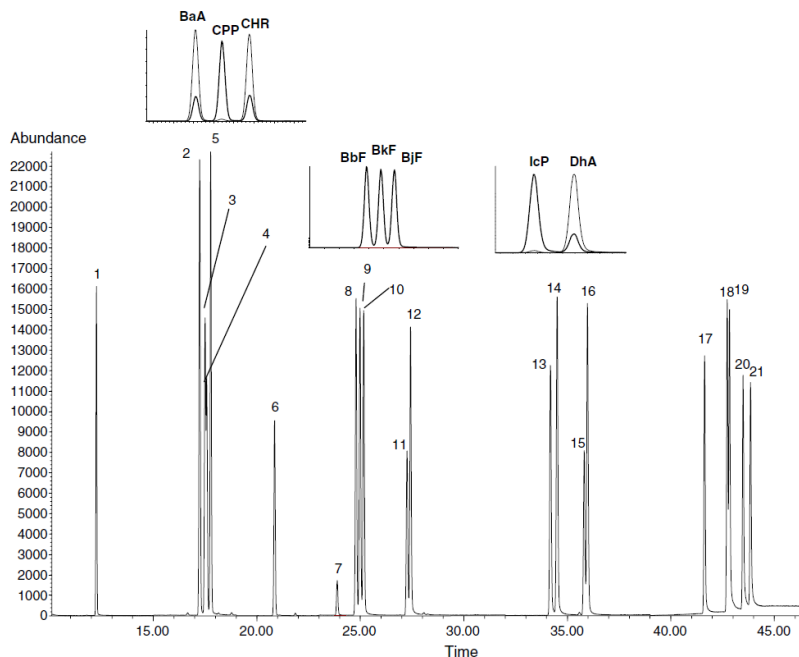


Figure I-I-7. Chromatogramme des 15+1 HAP EU obtenu en GC-MS sur la colonne DB-17ms (20 m x 0,18 mm, 0,14 μ m). (1) BcFLR, (2) BaA, (3) CPcdP, (4) d12-CHR, (5) CHR, (6) MCH, (7) 9-fluoro-BkFA, (8) BbFA, (9) BkFA, (10) BjFA, (11) D12-BaP, (12) BaP, (13) IP, (14) DBaA, (15) D12-BghiP, (16) BghiP, (17) DBaIP, (18) D12-coronène, (19) DBaEP, (20) DBaIP, (21) DBaHP. D'après [67].

Les HAP étant des composés stables qui produisent principalement l'ion moléculaire, la plupart des études utilise des analyseurs simple quadripôle (Tableau I-I-3). Le mode

d'acquisition SIM (Single Ion Monitoring) est alors privilégié afin d'améliorer la sensibilité de la détection. D'autres analyseurs comme le piège à ions [50, 66] ou le triple quadripôle [55, 65] sont rarement utilisés. En effet, malgré l'utilisation d'un mode d'ionisation de haute énergie tel que l'impact électronique, le nombre de fragments formé est très faible et les ions majoritairement produits sont les ions moléculaires $[M-H]^+$ et $[M-2H]^+$. Ces ions, également très stables, sont difficiles à fragmenter en MS/MS et génèrent des ions fragments alors très proches en masse de l'ion précurseur. Les limites de détection généralement calculées sont similaires à celles obtenues en HPLC-fluo, de l'ordre de quelques $\mu\text{g/kg}$.

Le choix du système d'injection est également un facteur clé afin de limiter les phénomènes de discrimination des HAP les plus lourds. Dans la littérature, l'injection sans division de flux (splitless) est la plus commune [41, 42, 47-50, 56, 57, 65]. Parmi les autres modes d'injection possibles on trouve également les injecteurs avec vaporisation programmable (PTV) [66] et les injecteurs larges volumes (LVI) [55], permettant d'améliorer la sensibilité de l'analyse. La combinaison des injecteurs PTV et LVI a été employée avec succès pour l'analyse simultanée des HAP légers et lourds. Elle a alors permis d'atteindre de meilleures sensibilités que l'injection PTV en mode « splitless », de réduire la discrimination à l'injection des composés les plus lourds (dibenzopyrènes) et donc d'améliorer leur rapport signal/bruit [66, 67].

Tableau I-I-3. Méthodes d'extraction/purification, de séparation et de détection pour l'analyse des HAP dans les huiles végétales.

HAP analysés	Extraction/Purification	Détection	Remarques sur la séparation	LOD (unités)	LOQ (unités)	Ref
HPLC						
16 US-EPA (sauf ACY)	Dilution (n-hexane) SPE (silice)	Fluorescence	Supelcosil LC-PAH (250 x 3 mm, 5 µm) Gradient : 40% ACN (0-5 min), 40 à 100% ACN (5-40 min)	<0,1 µg.kg ⁻¹	N/A	[27]
16 US-EPA (sauf NPH et ACY)	Dilution (n-hexane) LLE (DMF/water, 9:1, v/v, 5 mL) SPE (C18/C8)	Fluorescence	Vydac C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) Gradient : 50% ACN (0–10 min), 50 à 100% ACN (10–24 min), 100% ACN (24–35 min)	N/A	0,3 – 6 µg.kg ⁻¹	[35]
16 US-EPA (sauf ACY)	Dilution (n-hexane) (1) SPE (DACC) ou (2) SPE (alumine)	Fluorescence	Vydac C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) Gradient : 50% ACN (0–10 min), 50 à 100% ACN (10–24 min), 100% ACN (24–35 min)	(1) 0,09 – 0,2 µg.kg ⁻¹ (2) 0,03 – 0,6 µg.kg ⁻¹	(1) 0,2 – 0,7 µg.kg ⁻¹ (2) 0,1 – 8 µg.kg ⁻¹	[39]
16 US-EPA	Dilution (ACN/acétone, 60:40, v/v) LLE (ACN/acétone, 60:40, v/v, 10 mL) (x3) SPE (C18)	UV/Fluorescence	Supelcosil LC-PAH (250 x 4,6 mm, 5 µm) Gradient : 40 à 87% ACN (0–30 min), 87% ACN (30–40 min)	0,01 – 2,35 µg.kg ⁻¹	0,04 – 7,00 µg.kg ⁻¹	[44]
BaP	Dilution (n-hexane) SPE (silice revêtue d'acides humiques)	Fluorescence	Thermo Hypersil ODS (200 x 4,6 mm, 5 µm) Isocratique : MeOH/eau (90:10, v/v)	0,06 µg.kg ⁻¹	0,2 µg.kg ⁻¹	[36]

HAP analysés	Extraction/Purification	Détection	Remarques sur la séparation	LOD (unités)	LOQ (unités)	Ref
BaP	SPE (C18/Florisil) MSPD (C18/Florisil)	(1) HPLC-Fluorescence (2) DACC (3) GC-MS (EI) (4) LP-GC-MS (EI)	(1) CP EcoSpher 4 PAH (150 × 3 mm, 4 µm) Isocratique : eau/ACN (15:85, v/v) (2) CP ChromSpher π (20 × 3 mm, 5 µm) Isocratique : eau/ACN (15:85, v/v) (3) Injection : N/A DB-5ms (30 m × 0,25 mm, 0,25 µm) (4) Injection : N/A MS FS CP-Sil 8 (10 m × 0,53 mm, 0,50 µm) Détection (3) et (4) : Q, SIM	(1) 0,5 µg.kg ⁻¹ (2) 0,3 µg.kg ⁻¹ (3) 1,0 µg.kg ⁻¹ (4) 1,6 µg.kg ⁻¹	(1) 1,7 µg.kg ⁻¹ (2) 1,1 µg.kg ⁻¹ (3) 3,4 µg.kg ⁻¹ (4) 5,5 µg.kg ⁻¹	[38]
FLR, PHE, ANT, FA, PYR, BaA, BbFA, BkFA, BaP	Saponification (1 M NaOH + MeOH/toluène, 2:1, v/v) LLE (toluène, 20 mL) (x3) SPE (oxyde de silice et d'alumine)	UV	ODS (250 x 4,6 mm, 5 µm) Isocratique : ACN/eau (80:20, v/v)	0,26 – 1,15 µg.kg ⁻¹	0,87 – 3,84 µg.kg ⁻¹	[51]
HAP8 + PYR	Dilution (isohexane/butyldimethylether, 95:5, v/v) SPE (PS/DVB)	Fluorescence	Multospher PAH-III (150 × 4 mm, 5 µm) Gradient : 40% ACN (0–5 min), 40 à 100% ACN (5–40 min)	0,2 – 0,8 µg.kg ⁻¹	N/A	[37]
HAP8 + BeP	SPE (silice) SPE (NH ₂)	Fluorescence	Inertsil ODS-P (250 x 4,6 mm, 5 µm) Gradient : 85% ACN (0–3 min), 85 à 100% ACN (3–37 min), 100% ACN (37–65 min)	0,01 – 0,2 µg.kg ⁻¹	0,1 – 0,8 µg.kg ⁻¹	[54]

HAP analysés	Extraction/Purification	Détection	Remarques sur la séparation	LOD (unités)	LOQ (unités)	Ref
HAP8 + FA, PYR, MCH, DBaP, BbFA	Comparaison de 2 procédures (1) USAE (ACN, 5 mL) (x3) SPE (C18) SPE (silice/Florisil) ou (2) USAEME (n-hexane + DMSO) SPE (C18)	Fluorescence	Supelcosil LC PAH (250 x 4,6 mm, 5 µm) Gradient : 80 à 95% ACN (0–40 min)	N/A	(1) 0,020 – 2,6 µg.kg ⁻¹ (2) 0,030 – 2,5 µg.kg ⁻¹	[53]
ACP, PHE, ANT, PYR, CHR, BeP, BaP, BghiP, COR, CPdefPHE	Dilution (n-heptane) LLE (DMSO, 4 x 20 mL) LLE (cyclohexane, 3 x 50 mL) LLE (eau, 2 x 100 mL) SPE (gel de silice + Na ₂ SO ₄)	Fluorescence	Lichrocart C18 (125 x 4 mm, 5 µm) Gradient : 55 à 100% ACN (0–40 min)	0,1 – 4,0 ng	N/A	[45]
15+1 EU (sauf BghiP, BcFLR, CPcdP)	Dilution (n-hexane) LLE (DMF/eau, 9:1, v/v, 5 mL) SPE (C18)	Fluorescence	Vydac C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm) Gradient : 70 à 75% ACN (0–20 min), 75 à 100% ACN (20–35 min), 100% ACN (35–55 min)	0,11 – 1,01 µg.kg ⁻¹	0,19 – 1,69 µg.kg ⁻¹	[43]
15+1 EU	Dilution (cyclohexane) SPE (DACC)	UV/Fluorescence	Pursuit 3 PAH (100 x 4,6 mm, 5 µm) Gradient : eau/MeOH/ACN (15:55:30, v/v/v) (0–2 min) 30 à 100% ACN (2–23 min) 100% ACN (23–40 min)	0,07 – 7,8 µg.kg ⁻¹	0,13 – 16 µg.kg ⁻¹	[40]

HAP analysés	Extraction/Purification	Détection	Remarques sur la séparation	LOD (unités)	LOQ (unités)	Ref
(1)15+1 EU + BeP + BbCHR (2) 15+1 EU + 16 US-EPA (sauf ACY) + BeP + BbCHR	Dilution (n-hexane) SPE (silice)	UV/2 détecteurs de fluorescence	Supelcosil LC-PAH (250 x 3 mm, 5 µm) Gradient : (1) 75% ACN (0–10 min) 75 à 100% ACN (10–35 min) 100% ACN (35–42 min) (2) 50% ACN (0–10 min) 50 à 60% ACN (10–15 min) 60 à 75% ACN (15–20 min) 75 à 100% ACN (20–30 min) 100% ACN (30–55 min)	(1) 0,003 – 18,9 µg.kg ⁻¹	(1) 0,04 – 27,8 µg.kg ⁻¹	[63]
GC						
16 US-EPA (sauf BbFA et BkFA) + BeP, Pe, COR, An, dérivés alkylés	Dilution (n-hexane) LLE (DMSO, 3 x 50 mL) LLE (cyclohexane, 3 x 150 mL) LLE (eau, 100 mL) SPE (silice)	MS (EI)	Injection : « splitless » HP-5ms (60 m x 0,25 mm, 0,25 µm) Détection : Q, SIM	0,06 – 0,25 µg.kg ⁻¹	N/A	[41]
16 US-EPA	(1) ISO 15753 ou (2) Dilution (n-hexane) LLE (DMF, 8 mL) (x 2) LLE (n-hexane, 8 mL) (x3) SPE (Florisil)	MS (EI)	Injection : « splitless » DB-5ms (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm) Détection : TIC	N/A	N/A	[42]
16 US-EPA	USAE (ACN, 10 mL puis 20 mL) SEC (BioBeads S-X3 resin)	MS (EI)	Injection : « splitless » HP-5ms (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm) Détection : Q, SIM	N/A	0,3 – 0,6 µg.kg ⁻¹	[52]
BaP	Dilution (n-hexane) SPME (CarbopackZ/PDMS)	MS (EI)	Injection : « splitless » SPB-5 (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm) Détection : Q, SIM	0,2 µg.kg ⁻¹	0,5 µg.kg ⁻¹	[48]

HAP analysés	Extraction/Purification	Détection	Remarques sur la séparation	LOD (unités)	LOQ (unités)	Ref
NPH, ACP, ACY, FLR, PHE, ANT, FA, PYR, dérivés alkylés	HS-SPME (DVB/Carboxen/PDMS)	MS (EI)	Injection : « splitless » Supelcowax-10 et HP-5ms (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm) Détection : Q, SIM	0,05 – 1,6 µg.kg ⁻¹	0,2 – 5,2 µg.kg ⁻¹	[57]
NPH, FLR, PHE, ANT, PYR, CHR, BaA, BaP	LLE (ACN/acétone, 60:40, v/v, 10 mL) (x3) SPE (gel de silice) (x2) SPE (gel de silice activée)	MS (EI)	Injection: split 20% VF-5 (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm) Détection : TIC	1,9 – 3,1 ng	N/A	[46]
BkFA, BeP, BaP, BghiP	LLE (ACN/n-hexane, 83:17, v/v, 12 mL) SEC (copolymère styrène/DVB)	MS/MS (EI)	Injection : LVI + PTV HP-5ms (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm) Détection : IT	0,05 – 0,07 µg.kg ⁻¹	0,1 – 0,2 µg.kg ⁻¹	[66]
HAP8 (sauf CHR) + BeP	Dilution (n-pentane) LLE (DMSO, 15 mL, 2 x 10 mL) LLE (cyclohexane, 3 x 50 mL) LLE (eau, 100 mL) TLC (gel de silice)	MS (EI)	Injection : « splitless » DB-5ms (30 m x 0,25 mm, 0,20 µm) Détection : IT	0,1 – 0,4 µg.kg ⁻¹	N/A	[50]
HAP8	MSPE (MWCNT)	MS (EI)	Injection : « splitless » Rxi-5ms (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm) Détection : Q, SIM	0,10 – 0,88 µg.kg ⁻¹	0,34 – 2,9 µg.kg ⁻¹	[56]
HAP8 + FLR, PYR	HS	MS/MS (EI)	Injection : « splitless » VF-5ms (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm) Détection : QqQ, SIM, SRM	0,02 – 0,06 µg.kg ⁻¹	0,07 – 0,26 µg.kg ⁻¹	[65]
15+1 EU (sauf BcFLR) + PHE, ANT, FA, PYR	PLE (celite + Florisil, n-hexane/acétone, 1:1, v/v) SPE (PS/DVB)	MS/MS (EI)	Injection : LVI Zebron ZB-5ms (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm) Détection : QqQ, SRM	0,008 – 0,150 µg.kg ⁻¹	0,025 – 0,915 µg.kg ⁻¹	[55]

HAP analysés	Extraction/Purification	Détection	Remarques sur la séparation	LOD (unités)	LOQ (unités)	Ref
Fast GC						
HAP8 + BjFA, BeP	Dilution (n-hexane) LLE (ACN, 3 mL) LLE (n-hexane, 4 mL) SPME (CarbopackZ/PDMS)	MS (EI)	Injection : « splitless » BPX50 (9 m × 0,1 mm, 0,1 µm) Détection : Q, SIM	N/A	0,20 – 0,83 µg.kg ⁻¹ (10 min d'exposition de la fibre) 0,11 – 0,32 µg.kg ⁻¹ (30 min d'exposition)	[47]
GC x GC						
15+1 EU	Dilution (n-hexane) SPME (CarbopackZ/PDMS)	MS (EI)	Injection : « splitless » 1 ^{ère} dimension : SGE BPX5 (30 m × 0,25 mm, 0,25 µm) 2 ^{ème} dimension : SGE BPX50 (1 m × 0,1 mm, 0,1 µm) Détection : TOF	0,1 – 1,4 µg.kg ⁻¹	0,4 – 4,6 µg.kg ⁻¹	[49]

Abréviations : ACN : acétonitrile, An : anthanthrène, BbCHR : benzo(b)chrysène, BeP : benzo(e)pyrène, COR : coronène, CPdefPHE : cyclopenta(d,e,f)phénanthrène, DACC : chromatographie de complexe donneur-accepteur, DMF : diméthylformamide, DMSO : diméthylsulfoxyde, DVB : divinylbenzène, EI : impact électronique, GC : chromatographie en phase gazeuse, GC x GC : GC bidimensionnelle, HAP8 : HAP communs aux listes US-EPA et EU, HPLC : chromatographie en phase liquide, HS : espace de tête, IT : trappe d'ions, LLE : extraction liquide/liquide, LP-GC-MS : GC-MS faible pression, LVI : injection large volume, MS : détection par spectrométrie de masse, MSPD : dispersion de support solide dans la matrice, MSPE : extraction sur phase solide magnétique, MWCNT : nanotubes de carbone multi-feuillets, N/A : non disponible, PDMS : polydiméthylsiloxane, Pe : pérylène, PLE : extraction liquide sous pression, PS/DVB : polystyrène/divinylbenzène, PTV : injection avec vaporisation programmable, QqQ : analyseur triple quadripôle, SEC : chromatographie d'exclusion stérique, SIM : « single ion monitoring », SPE : extraction sur phase solide, SPME : microextraction sur phase solide, SRM : « selected-reaction monitoring », TIC : « total ion current », TLC : chromatographie sur couche mince, TOF : spectromètre de masse à temps de vol, USAE : extraction assistée par ultrasons, USAEME : extraction par émulsion assistée par ultrasons.

References

- [1] Z. Wang, M. Fingas, D.S. Page, J. Chromatogr. A 843 (1999) 369-411.
- [2] F. Lacoste, R. Raoux, D. Dubois, B. Soulet, Problématiques des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les corps gras, *OCL* VOL 10 N°4 JUILLET/AOÛT 2003.
- [3] H.-H. Yang, W.-J. Lee, S.-J. Chen, S.-O. Lai, J. Hazard. Mater. 60 (1998) 159-174.
- [4] B.D. Kottler, M. Alexander, Environ. Pollut. 113 (2001) 293-298.
- [5] Z. Wang, X. Ma, G. Na, Z. Lin, Q. Ding, Z. Yao, Environ. Pollut. 157 (2009) 3132-3136.
- [6] Y.-G. Ma, Y.D. Lei, H. Xiao, F. Wania, W.-H. Wang, J. Chem. Eng. Data 55 (2009) 819-825.
- [7] K. Shuttleworth, E. Cerniglia, Appl. Biochem. Biotechnol. 54 (1995) 291-302.
- [8] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 1995. Toxicological profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
- [9] R. Simon, J.A. Gómez Ruiz, C. von Holst, T. Wenzl, E. Anklaam, Anal. Bioanal. Chem. 391 (2008) 1397.
- [10] T. Wenzl, R. Simon, E. Anklaam, J. Kleiner, Trends Anal. Chem. 25 (2006) 716-725.
- [11] D. Poster, M. Schantz, L. Sander, S. Wise, Anal. Bioanal. Chem. 386 (2006) 859-881.
- [12] European Commission, Opinion of the Scientific Committee on Food on the Risks to Human Health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food SCF/CS/CNTM/PAF/29/Final, 4 December 2002.
- [13] Polycyclic aromatic hydrocarbons, scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain, EFSA J. 724 (2008) 1.
- [14] Findings of the EFSA Data Collection on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food, 29 June 2007, Available on: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/33r.pdf>.
- [15] R. Simon, B. de la Calle, S. Palme, D. Meier, E. Anklaam, J. Sep. Sci. 28 (2005) 871-882.
- [16] D.H. Phillips, Mutat. Res-Gen. Tox. En. 443 (1999) 139-147.
- [17] N. Kazerouni, R. Sinha, C.-H. Hsu, A. Greenberg, N. Rothman, Food Chem. Toxicol. 39 (2001) 423-436.
- [18] R.H. de Vos, W. van Dokkum, A. Schouten, P. de Jong-Berkhout, Food Chem. Toxicol. 28 (1990) 263-268.
- [19] IARC, Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks of Chemicals to Humans, Overall evaluation of carcinogenicity: An updating of IARC Monographs, vol.1 to 42, Supplement 7, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon, 1987.
- [20] IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol. 32, International Agency for Research on Cancer (IARC), World Health Organization (WHO), Lyon, 1983.
- [21] IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol. 3, International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon/World Health Organization (WHO), Geneva, 1973.
- [22] United States Environmental Protection Agency, Appendix A to 40 CFR Part 423, Available on: <http://www.epa.gov/region1/npdes/permits/generic/prioritypollutants.pdf>.
- [23] Summary and Conclusions of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, in: Sixty-Fourth meeting, Rome, 2005 (JECFA/64/SC).
- [24] European Union (EU), Commission Recommendation (EC) No 1881/2006, Off. J. Eur. Union L364 (2006) 5.
- [25] European Union (EU), Commission Recommendation (EC) No 835/2011, Off. J. Eur. Union L215 (2011) 4.
- [26] F. Lacoste, F. Joffre, J.-L. Coustille, O. Morin, B. Soulet, E. Brenne, H. Griffon, Détection de contaminants dans les huiles végétales : bilan à fin 2009, *OCL* VOL. 17 N°2 MARS-AVRIL 2010.
- [27] S. Moret, L.S. Conte, J. Sep. Sci. 25 (2002) 96-100.
- [28] S. Moret, L.S. Conte, J. Chromatogr. A 882 (2000) 245-253.
- [29] M. Biedermann, Y. Uematsu, K. Grob, Packag. Technol. Sci. 24 (2011) 61-73.
- [30] M. Biedermann, J.-E. Ingenhoff, M. Barbanera, D. Garbini, K. Grob, Packag. Technol. Sci. 24 (2011) 281-290.
- [31] X. Pages, O. Morin, C. Birot, M. Gaud, S. Fazeuilh, M. Gouband, Raffinage des huiles et des corps gras et élimination des contaminants, *OCL* VOL. 17 N°2 MARS-AVRIL 2010.
- [32] ISO 15302. Animal and vegetable fats and oils. Determination of benzo(a)pyrene content. Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography Method (2007).
- [33] ISO 15753. Animal and Vegetable Fats and Oils - Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (2006).

- [34] ISO 22959. Animal and Vegetable Fats and Oils - Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by on-line Donor Acceptor Complex Chromatography and HPLC with Fluorescence Detection (2009).
- [35] A. Barranco, R.M. Alonso-Salces, A. Bakkali, L.A. Berrueta, B. Gallo, F. Vicente, M. Sarobe, J. Chromatogr. A 988 (2003) 33-40.
- [36] D. Luo, Q.-W. Yu, H.-R. Yin, Y.-Q. Feng, Anal. Chim. Acta 588 (2007) 261-267.
- [37] R. Weißhaar, Eur. J. Lipid Sci. Technol. 104 (2002) 282-285.
- [38] M.J. Bogusz, S.A. El Hajj, Z. Ehaideb, H. Hassan, M. Al-Tufail, J. Chromatogr. A 1026 (2004) 1-7.
- [39] A. Barranco, R.M. Alonso-Salces, E. Corta, L.A. Berrueta, B. Gallo, F. Vicente, M. Sarobe, Food Chem. 86 (2004) 465-474.
- [40] I. Windal, L. Boxus, V. Hanot, J. Chromatogr. A 1212 (2008) 16-22.
- [41] M.D. Guillen, P. Sopelana, G. Palencia, J. Agric. Food. Chem. 52 (2004) 2123-2132.
- [42] S. Wu, W. Yu, Food Chem. 134 (2012) 597-601.
- [43] M.C. Rojo Camargo, P.R. Antoniolli, E. Vicente, Food Chem. 135 (2012) 937-942.
- [44] W.-j. Zhao, X.-b. Chen, L. Fang, C.-l. Li, D.-y. Zhao, J. Agric. Food. Chem. 61 (2013) 1804-1809.
- [45] M. Pandey, K. Mishra, S. Khanna, M. Das, J. Am. Oil Chem. Soc. 81 (2004) 1131-1136.
- [46] M. Amzad Hossain, S.M. Salehuddin, Arabian J. Chem. 5 (2012) 391-396.
- [47] G. Purcaro, M. Picardo, L. Barp, S. Moret, L.S. Conte, J. Chromatogr. A 1307 (2013) 166-171.
- [48] G. Purcaro, S. Moret, L.S. Conte, J. Chromatogr. A 1176 (2007) 231-235.
- [49] G. Purcaro, P. Morrison, S. Moret, L.S. Conte, P.J. Marriott, J. Chromatogr. A 1161 (2007) 284-291.
- [50] G. Diletti, G. Scortichini, R. Scarpone, G. Gatti, L. Torreti, G. Migliorati, J. Chromatogr. A 1062 (2005) 247-254.
- [51] K. Dost, C. İdeli, Food Chem. 133 (2012) 193-199.
- [52] J.-H. Wang, C. Guo, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 4732-4737.
- [53] I. Yebra-Pimentel, E. Martínez-Carballo, J. Regueiro, J. Simal-Gándara, Food Chem. 139 (2013) 1036-1043.
- [54] W. Moreda, R. Rodríguez-Acuña, M. del Carmen Pérez-Camino, A. Cert, in, John Wiley & Sons, Ltd., 2004, pp. 1759-1764.
- [55] B. Veyrand, A. Brosseaud, L. Sarcher, V. Varlet, F. Monteau, P. Marchand, F. Andre, B. Le Bizec, J. Chromatogr. A 1149 (2007) 333-344.
- [56] Q. Zhao, F. Wei, Y.-B. Luo, J. Ding, N. Xiao, Y.-Q. Feng, J. Agric. Food. Chem. 59 (2011) 12794-12800.
- [57] S. Vichi, L. Pizzale, L.S. Conte, S. Buxaderas, E. López-Tamames, J. Chromatogr. A 1090 (2005) 146-154.
- [58] B.H. Chen, C.Y. Wang, C.P. Chiu, J. Agric. Food. Chem. 44 (1996) 2244-2251.
- [59] Environmental Protection Agency (EPA). Method 610-Polynuclear Aromatic Hydrocarbons
- [60] G. Purcaro, S. Moret, M. Bučar-Miklavčič, L.S. Conte, J. Sep. Sci. 35 (2012) 922-928.
- [61] F. Gosetti, U. Chiominatto, E. Mazzucco, E. Robotti, G. Calabrese, M.C. Gennaro, E. Marengo, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 6308-6318.
- [62] S.-S. Cai, J. Stevens, J.A. Syage, J. Chromatogr. A 1227 (2012) 138-144.
- [63] G. Purcaro, S. Moret, L.S. Conte, J. Sep. Sci. 31 (2008) 3936-3944.
- [64] P. Šimko, J. Chromatogr. B 770 (2002) 3-18.
- [65] F.J. Arrebola, A.G. Frenich, M.J. González Rodríguez, P.P. Bolaños, J.L. Martínez Vidal, J. Mass Spectrom. 41 (2006) 822-829.
- [66] E. Ballesteros, A. García Sánchez, N. Ramos Martos, J. Chromatogr. A 1111 (2006) 89-96.
- [67] J.A. Gómez-Ruiz, T. Wenzl, Anal. Bioanal. Chem. 393 (2009) 1697-1707.
- [68] J. Djinić, A. Popović, W. Jira, Meat Sci. 80 (2008) 449-456.
- [69] K. Ziegenhals, H.-J. Hübschmann, K. Speer, W. Jira, J. Sep. Sci. 31 (2008) 1779-1786.

CHAPITRE II : Analyse des HAP par électrophorèse en formats capillaire et microsystème (article)

CAPILLARY AND MICROCHIP ELECTROPHORETIC ANALYSES OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS

Separation and Purification Reviews, submitted in September 2013

Ludivine Ferey^{1,2,3}, Yann Raoul³, Alain Huertas⁴, Douglas N. Rutledge², Nathalie Delaunay^{1*}

¹Laboratory of Physicochemistry of Electrolytes, Colloids and Analytical Sciences (PECSA), UMR 7195 CNRS/ESPCI ParisTech/UPMC, 75005 Paris, France

²Ingénierie Analytique pour la Qualité des Aliments (IAQA), UMR 1145 AgroParisTech/INRA, 75005 Paris, France

³Sofiprotéol, 75008 Paris, France

⁴Lesieur, 92600 Asnières sur Seine, France

Keywords: polycyclic aromatic hydrocarbons, capillary electrophoresis, micellar electrokinetic chromatography, capillary electrochromatography, microchip electrophoresis

Abbreviations: **ACN:** acetonitrile, **AIBN:** azobisisobutyronitrile, **AMPS:** 2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid, **BGE:** background electrolyte, **C₁₈-TMS:** N-octadecyldimethyl[3-(trimethoxysilyl)propyl]ammonium chloride, **CD:** cyclodextrin, **CD-CZE:** cyclodextrin-modified capillary zone electrophoresis, **CE:** capillary electrophoresis, **CEC:** capillary electrochromatography, **CM-β-CD:** carboxymethyl-β-CD, **cmc:** critical micellar concentration, **COC:** cyclo-olefin copolymer, **DAMA:** 2-(dimethyl amino)ethyl methacrylate, **DMF:** dimethylformamide, **DOSS:** sodium dioctyl sulfosuccinate, **DS:** dextran sulfate, **EDMA:** ethylene dimethacrylate, **EFSA:** European Food Safety Authority, **EKC:** electrokinetic chromatography, **EOF:** electroosmotic flow, **ETMOS:** ethyltrimethoxysilane, **GC:** gas chromatography, **GNPs:** gold nanoparticles, **GO:** graphene oxide, **HP-β-CD:** hydroxypropyl-β-CD, **HPLC:** high performance liquid chromatography, **IL:** ionic liquid, **LIDF:** laser-induced dispersed fluorescence, **LIF:** laser-induced fluorescence detection, **LOD:** limit of detection, **MAA:** methacrylic acid, **MBA:** monomethylbenzo(a)anthracene, **m-μCEC:** monolithic electrochromatography on-chip, **McMOA:** Multichannel Mars Organic Analyzer, **Me-β-CD:** methyl-β-CD, **MEKC:** micellar electrokinetic chromatography, **MES:** 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid, **MOA:** Mars Organic Analyzer, **MS:** mass spectrometry, **NACE:** nonaqueous capillary electrophoresis, **OT-μCEC:** open-tubular electrochromatography on-chip, **ODS:** octadecylsilane, **OT-CEC:** open-tubular capillary electrochromatography, **PAH:** polycyclic aromatic hydrocarbon, **PEO:** poly(ethylene oxide), **PheDMS:** phenyldimethylsilane, **PMT:** photomultiplier tube, **Poly-SUS:** sodium polyundecenyl sulfate, **RSD:** relative standard deviation, **SBE-β-CD:** sulfobutyl ether-β-CD, **SC:** sodium cholate, **SDBS:** sodium dodecylbenzenesulfonate, **SDS:** sodium dodecyl sulfate, **TAA⁺:** tetraalkyl ammonium ions, **THA⁺:** tetrahexylammonium ions, **TMOS:** tetramethoxysilane, **Tris:** tris(hydroxymethyl)aminomethane, **US-EPA:** United States Environmental Protection Agency

Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons are ubiquitous contaminants which can reach environment and food in different ways. Because of their high toxicity, two international regulatory institutions, the United States Environmental Protection Agency and the European Food Safety Authority, have classified PAHs as priority pollutants, generating an important demand for the detection and identification of PAHs. Thus, sensitive, fast, and cheap analysis methods of PAHs in environmental and food samples are highly needed. Within this context, electrophoresis, in capillary or in microchip format, displays attractive features. This review presents and critically discusses the published literature on the different applications of capillary and microchip electrophoresis for the analysis of PAHs.

1. Introduction

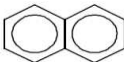
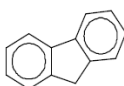
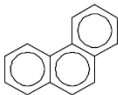
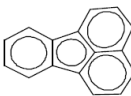
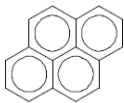
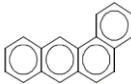
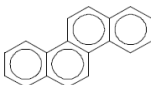
Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) are widespread contaminants in the environment and food products. PAHs contain two or more fused aromatic rings and are produced through incomplete combustion or pyrolysis of organic matter and natural processes (forest fires, volcanoes etc.) [1, 2]. They are usually classified according to the number of condensed aromatic rings as light (2-3 rings) and heavy (4-6 rings) PAHs, the latter ones being more stable and toxic than the former ones. A number of PAHs have been identified as carcinogens, mutagens, and genotoxins [3-7]. Human exposure to these compounds through inhalation of air or ingestion of food therefore constitutes a real health concern. Moreover, as PAHs occurring in food and environment are always present as complex mixtures, the selection of suitable risk assessment approaches to evaluate the PAH toxicity in such samples remains a major difficulty.

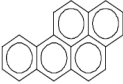
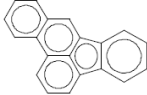
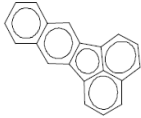
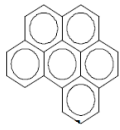
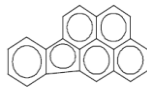
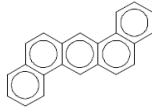
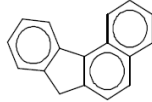
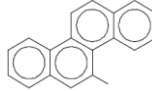
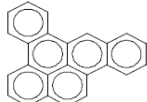
As updated data appear, new related regulations are introduced and existing ones are modified. For a long time, research community was focused either on the 16 environmental priority PAHs listed by the United States Environmental Protection Agency (US-EPA) [8] or on BaP only. However, from 2002 [4] to date, European legislation dealing with PAHs in food has constantly evolved. In 2005, the European Commission published a new list of 15 priority PAHs in response to food-contamination problems based on a previous assessment by the Scientific Committee on Food [4, 9]. Later, in 2008, the European Food Safety Authority (EFSA) officially added a 16th PAH (benzo(c)fluorene) [10], which was pointed out by the Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization Expert Committee on Food Additives in 2005 [11]. To distinguish this list from the set of the 16 US-EPA PAHs, the term “15+1 EU priority PAHs” is usually used. Table I-II-1 gathers PAHs belonging to each list with their corresponding abbreviation, structure, molecular weight, and logP.

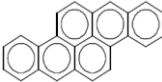
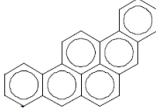
Recently, in 2012, a new European Regulation came into force: stricter concentration limits considering both BaP and the sum of 4 PAHs in food products were established [12]. Therefore, effective and fast analytical methods for the determination of PAHs in environmental and food samples are highly needed not only to answer the legislation but also to establish clearer contamination profiles. Many reviews related to PAH analysis in food and environmental samples, by HPLC and/or GC, were published over the years [13-18]. HPLC with UV [19-21] or fluorescence detection [20, 22-24] has been the most employed analytical technique for a long time, also in some official methods proposed by the International Standardization Organization [25-29] and of the US-EPA [30]. GC was also a valuable alternative due to its benefits in terms of peak capacity compared to HPLC and its

easy and relatively cheap coupling to MS detection enabling high selectivity and sensitivity [31-35].

Table I-II-1. Names, abbreviations, structures, molecular weights (M_w) and logP of PAHs reported by the United States Environmental Protection Agency (US-EPA) and the European Food Safety Authority (EFSA)

Compound	Abbreviation	Structure	M_w (g/mol)	logP ^a
US-EPA				
Naphthalene	NPH		128	3.4
Acenaphthylene	ACY		152	3.6
Acenaphthene	ACP		154	3.9
Fluorene	FLR		166	4.2
Anthracene	ANT		178	4.5
Phenanthrene	PHE		178	4.6
Fluoranthene	FA		202	5.1
Pyrene	Pyr		202	5.3
US-EPA/EFSA				
Benzo(a)anthracene	BaA		228	5.7
Chrysene	CHR		228	5.6

Compound	Abbreviation	Structure	M _w (g/mol)	logP ^a
Benzo(a)pyrene	BaP		252	6.0
Benzo(b)fluoranthene	BbFA		252	6.6
Benzo(k)fluoranthene	BkFA		252	6.8
Benzo(ghi)perylene	BghiP		276	6.7
Indeno(1,2,3-cd)pyrene	IP		276	6.6
Dibenzo(a,h)anthracene	DBahA		278	6.7
EFSA				
Benzo(c)fluorene	BcFLR		216	5.7
Cyclopenta(cd)pyrene	CPcdP		226	5.5
5-Methylchrysene	MCH		242	6.0
Benzo(j)fluoranthene	BjFA		252	6.2
Dibenzo(a,e)pyrene	DBaeP		302	7.3

Compound	Abbreviation	Structure	M _w (g/mol)	logP ^a
Dibenzo(a,h)pyrene	DBaHP		302	7.0
Dibenzo(a,i)pyrene	DBaIP		302	7.3
Dibenzo(a,l)pyrene	DBaLP		302	7.7

^a INERIS toxicological and environmental data sheets

Capillary electrophoresis (CE) with its low operational costs, efficiency, speed of analysis, versatility, and miniaturization, appears as an interesting alternative to chromatographic methods for PAH analysis [36, 37]. Moreover, CE offers the additional advantage of an easier transfer to chip format. Indeed, 20 years ago, the introduction of the concept of micro total analysis system brought further benefits such as shorter analysis time, possible portability, and high-throughput analysis [38-41]. Thus, as found in the literature, some efforts have been paid to develop analytical microsystems, also called chips, for PAH analysis [42-45]. This paper is intended to provide a comprehensive review on the use of electrophoretic analytical methods for PAH determination, involving different modes of separation within capillary or chip format. As far as we know, until now, no review dealing with this subject has been published.

2. Analysis of PAHs by capillary electrophoresis

In capillary zone electrophoresis (CZE), the most classical form of CE, the separation mechanism is based on differences in electrophoretic mobility between analytes, depending on their charge to frictional drag ratio. Consequently, this CE mode is limited to the analysis of charged species, because neutral analytes such as PAHs do not have self-electrophoretic mobility and migrate as the same velocity as the electroosmotic flow (EOF). Accordingly, they will not be separated and will elute as one unresolved peak. This difficulty can be overcome by using micellar electrokinetic chromatography (MEKC) which was introduced by Terabe et al. in 1984 [46, 47]. MEKC uses surfactants added to the BGE at a concentration above their critical micellar concentration (cmc) to form micelles, which act as a pseudo-

phase [48]. As the micellar phase migrates at a different velocity from the aqueous phase, separation mechanism of analytes is based on differential partitioning between the micelles and the aqueous part of the BGE. In this case, the migration window of the analytes is bracketed by EOF residence time and that of the micelles. Therefore, to achieve high resolution, analytes are required not to have either too low or too high interactions with micelles. That is why, in general, highly hydrophobic compounds such as PAHs are difficult to separate by MEKC since they tend to be totally incorporated into the micelles and hence migrate at the same velocity as these. To improve the selectivity in MEKC, a powerful method is the use of additives to the BGE, such as organic solvents, cyclodextrins (CDs), or urea. Bile salts, which are less hydrophobic than long alkyl chain surfactants can also be used. Moreover, as an alternative approach to MEKC, charged CDs in mixture with neutral ones can be used in the absence of micelles to separate hydrophobic solutes such as PAHs. In that case, PAHs are separated based on their different complexation constants between the two CDs. Table I-II-2 gives details about the analytical approaches published in the literature for the determination of PAHs in CE (separation and detection modes, separation conditions, limits of detection (LODs), and analysis time). A last strategy for PAH separation is capillary electrochromatography (CEC), which involves packing the capillary with chromatographic particles or synthesizing a monolith in the capillary.

2.1 Micellar electrokinetic chromatography in the presence of an organic modifier

Organic solvents are generally added to the BGE to enhance selectivity by reducing the polarity of the BGE and therefore by decreasing the interactions between PAHs and micelles. Also, the use of hydro-organic phases in MEKC is required for PAH solubility reasons and therefore reduces their adsorption to the capillary walls. Nevertheless, in contrast with HPLC, an upper limit for the solvent concentration exists in MEKC, since high amounts disrupt the micelles [49]. Indeed, at high percentages of organic solvents, as the micellar phase is eliminated, the separation mechanism is based only on solvophobic effects between PAHs and surfactant monomers [50-53]. For PAH separation, methanol (MeOH) [53-57] and acetonitrile (ACN) [50-52, 55, 56, 58-64] were the two most commonly used organic modifiers, but 2-propanol [54, 59], ethanol [54, 55], dimethylformamide (DMF) [65], and dichloromethane [55] were also used.

In 1986, Walbroehl and Jorgenson were the first to report the separation of PAHs using tetrahexylammonium (THA^+) ion as a solution-phase additive in an aqueous medium containing 50 % (v/v) ACN [64]. At such high percentage of ACN, THA^+ salts could not form

micelles, thus separation mechanism was based on interactions between PAHs and the positively charged surfactant monomers (solvophobic associations). This separation principle has much in common with MEKC and therefore this technique can be considered as a form of electrokinetic chromatography (EKC). Conditions were such that EOF and electrophoretic migration of the tetraalkyl ammonium (TAA^+) ions were in the same direction and, consequently, PAHs associated strongly with the ionic additive, i.e. the heaviest ones, had greater electrophoretic migration and therefore migrated first. The window available for separation appeared to be rather small and, only 5 PAHs were separated in 25 min. Then, to broaden the separation window, Shi and Fritz undertook a systematic study of the effect of type and concentration of TAA^+ ions, pH, and percentage of ACN on separation performances [66]. They found that TAA^+ ions with longer alkyl chains induced higher interactions with PAHs, leading therefore to better separations. Moreover, upon increasing the concentration of the TAA^+ ions, the electrophoretic mobilities increased, indicating a greater degree of association between the analytes and the TAA^+ ions. To ensure a high EOF, a pH between 9 and 10 was necessary. At a given pH, EOF was found to increase when higher percentages of ACN were added to the BGE, probably because ACN enabled to shift TAA^+ from the capillary surface to the BGE, thus restoring the negative surface charge from ionized silanol groups. In addition, as expected, the electrophoretic mobility of analytes decreased as the percentage of ACN in the BGE was increased, which was consistent with a mechanism in which solvation of analytes by ACN competes with interactions of analytes with the hydrocarbon chains of the TAA^+ ions. Under appropriate experimental conditions, i.e. a 8 mM borate buffer (pH 9.4) containing 50 mM tetraheptylammonium bromide and 40 % ACN, 16 non-ionic aromatic compounds, including 6 PAHs, were separated in 28 min. It is worthy to note that in both studies, TAA^+ ions with relatively short alkyl chains, composed of 6 or 7 carbons, were used. In these cases, it was suggested that the association of a compound with more than one THA^+ ion was unlikely due to electrostatic repulsion and that these surfactants may not form a positively charged dynamic coating on the capillary wall, so that PAH migration was always in the downstream mode. Later, Cramers et al. investigated the applicability of two long-chain TAA^+ ions (tetraoctylammonium and tetradecylammonium ions) in water-ACN media [63]. They showed that the direction of EOF and therefore the migration behavior of analytes were strongly dependent on the concentration and chain length of TAA^+ ions, and the water-ACN volume ratio. A mixture of 5 PAHs composed of two isomer pairs (PHE/ANT and CHR/PYR) plus NPH was separated in the upstream mode in about 25 min, with a water-ACN (6/4, v/v) BGE containing 20 mM tetraoctylammonium bromide. However, the repeatability of EOF and, consequently, of PAH migration times was rather poor. This problem was attributed to the formation of an unstable dynamic coating.

To avoid these repeatability problems and to enhance separation windows, anionic surfactants can be implemented, still in the presence of organic solvents. This gives a counter-migration in which EOF is toward the detector and the electrophoretic mobility of analytes (smaller than EOF) is in the opposite direction. Nevertheless, in 1994, the first attempt to separate 3 PAHs with a BGE containing SDS was unsuccessful because surfactants could not show any interaction with PAHs in the presence of high amounts of ACN [67]. However, one year later, Brüggemann and Freitag managed to separate 7 PAHs in 8 min using a borate buffer with 85 mM SDS and 50 % (v/v) ACN [52]. As authors specified, this PAH mixture could not be separated using the solvophobic method developed by Walbroehl and Jorgenson, whatever the nature and the concentration of TAA⁺ ions and the percentage of ACN tested, thus showing an improvement in method selectivity. However, one critical pair (FA/PYR) remained unresolved, indicating that the use of SDS did not allow to achieve sufficient selectivity. Moreover, PAH peaks were highly asymmetric which could be due to solubility problems. Afterwards, Fu and Chen studied the influence of the nature and the concentration of short-chain alcohol (MeOH, EtOH, and propanol), as organic modifiers added to SDS micellar solution, on the separation of PAHs [54]. In such solvents, the cmc of SDS is lower than in ACN and they are expected to favor the formation of micelles and to enhance the selectivity of the method. Good separations of PAHs were obtained in the presence of 50 % MeOH or 40 % EtOH, but MeOH led to longer analysis times. Using propanol, shorter analysis times were recorded, but resolution for some PAHs was unsatisfactory. Once optimal conditions were determined, 9 PAHs, containing up to 5 aromatic rings, plus benzene were baseline resolved using a 20 mM phosphate-5 mM borate buffer with 50 mM SDS and 40 % (v/v) EtOH in 35 min. A good repeatability of migration times were obtained (RSD from 0.5 to 1.5 %, n = 6). Nevertheless, to achieve acceptable selectivity and solubility of PAHs, large amounts of SDS and organic solvent were needed, resulting in long migration times. That is why other groups decided later to use either additives with SDS or other types of surfactants.

Chang et al. studied the effects of tetrapentylammonium iodide, dextran sulfate (DS), MeOH, and SDS on resolution and speed of PAH separation [53]. Poly(ethylene oxide) (PEO) was used to reduce the adsorption of PAHs onto the capillary wall, leading to better resolution and reproducibility. DS compared to tetrapentylammonium iodide resulted in better separation performances with respect to resolution and speed. When using a BGE composed of 50 mM SDS with 45 % MeOH, 0.1 % PEO, and 0.02 % DS, 10 PAHs with 2-5 rings were separated in less than 12 min. However, although the best separation was obtained at 45 % MeOH, peaks were broader than those recorded using 50 % MeOH and migration times of the heaviest compound, i.e. BaP, was less reproducible (RSD of 3.5 %),

highlighting solubility problems. Also, a gradient technique was developed to be able to separate 7 PAHs with high quantum yields when excited at 325 nm using a He-Cd laser. When separation was performed first with a BGE containing a high concentration of SDS and a low percentage of MeOH to achieve high selectivity, and later with a BGE containing a lower concentration of SDS and a higher percentage of MeOH to improve speed, the 7 PAHs were resolved in 35 min. The use of laser-induced fluorescence (LIF) detection allowed a 100-1000-fold improvements in sensitivity when compared to UV detection, with LODs between 1.20 and 14.7 nM. Consequently, more diluted samples could be injected, reducing previous solubility problems (RSD of 2.5 % for BaP migration times). Shi and Fritz reported the use of another anionic surfactant, sodium dioctyl sulfosuccinate (DOSS) in an ACN-water BGE [51]. DOSS was preferred to SDS because of its lower cmc (2.5 mM instead of 8.1 mM for SDS at 25°C in water) and its stronger hydrophobic interactions with PAHs originating from its two long carbon chains. Under optimized conditions, i.e. a 8 mM sodium borate buffer (pH 9.0) with 50 mM DOSS and 36 % ACN (v/v), 23 nonionic aromatic compounds, including 17 PAHs, were separated in about 25 min. For the same purpose, Ding and Fritz used a lauryl poly(oxyethylene) sulfate, sulfonated Brij-30 (Brij-S), which was expected to strongly interact with PAHs due to its repeating $-OCH_2CH_2-$ groups in addition to the C_{12} hydrocarbon chain [58]. Separation of 20 nonionic aromatic compounds containing 15 PAHs was achieved in about 36 min with a BGE very close to the previous study, using 40 mM Brij-S instead of 50 mM DOSS. The use of Brij-S allowed to complete resolution of two PAH pairs which were not fully resolved in the presence of DOSS, i.e. benzophenone/azulene/NPH and CHR/2,3-benzoPHE. Another advantage of Brij-S over DOSS was its ability to separate analytes ranging from small, polar analytes to large, hydrophobic compounds such as PAHs. Indeed, as Brij-S is more soluble in water than DOSS, low percentages of ACN could be used to favor interactions of small and polar analytes with Brij-S, and consequently to enhance their separation. Nevertheless, for large and hydrophobic molecules such as PAHs, separation performances using Brij-S were only slightly superior to those previously obtained with DOSS. Finally, separations of several isomers such as 3 methylated ANT and 4 methylated BaA were also demonstrated. Brij-S was further studied by the same group in acidic conditions (pH 2.4) to eliminate EOF: a way to increase the speed of the analysis and, consequently, the peak efficiency [59]. In this case, after reversal of polarity, the most hydrophobic PAHs, which interacted the most with Brij-S, migrated first, which was just the opposite to the elution order obtained at basic pH. Satisfactory separation of 19 highly hydrophobic compounds including 17 PAHs was achieved using 30 mM Brij-S with 40 % (v/v) organic solvent (20 % ACN plus 20 % 2-propanol) in only 20 min. After testing different mixtures of two organic modifiers (20 % (v/v) each), including ACN, MeOH, 2-propanol, and tetrahydrofuran, ACN with 2-propanol gave the best results with respect to selectivity.

Working at low pH decreased analysis time since EOF was much smaller than the electrophoretic migration of PAH-Brij-S complexes, thus allowing the detection of high molecular weight analytes such as rubrene ($M_w = 532.7 \text{ g.mol}^{-1}$). However, it is worthy to note that some PAH pairs (BaA/CHR and PYR/FA) were no longer fully baseline resolved in these conditions.

Then, by adding sodium dodecylbenzenesulfonate (SDBS) surfactant to an ACN-water (4/6, v/v) electrolyte, Kavran and Erim succeeded in separating 11 aromatic compounds including 8 PAHs in 20 min [50]. As SDBS differs from SDS structure by a benzene ring, the separation mechanism was predicted not only through solvophobic association of PAHs with hydrophobic chains of SDBS but also through π - π interactions between aromatic rings of PAHs and SDBS.

Another strategy that was followed to achieve a better partitioning of PAHs between the hydro-organic and the micellar phase was the use of micelles formed from bile salts. Bile salts, for example sodium cholate (SC), deoxycholate or taurodeoxycholate are composed of a cholesteroid skeleton and can form small helical aggregates. Compared to micelles formed from long-chain surfactants, those formed from bile salts are less hydrophobic, thus decreasing the retention factor of PAHs and, consequently, analysis time. Moreover, as PAHs interact differently with bile salts than with long-chain surfactant micelles, the selectivity of the separation is altered. Oldiges et al. were the first ones to report a PAH separation by MEKC with bile salts [68]. A BGE composed of 50 mM SC and 20 % (v/v) MeOH allowed the separation of 3 PAHs (ANT, PYR, and BaP), which were then detected by LIF. Also, by investigating the effects of MeOH on cmc of SDS and sodium cholate, it was proved that bile salt micelles are much more tolerant to the addition of organic solvents than SDS. Later, Imasaka et al. demonstrated the separation of 6 PAHs, with higher molecular weights than those previously studied by Oldiges et al., in around 16 min using a 20 mM Tris-10 mM sodium phosphate buffer with 70 mM sodium deoxycholate and 20 % (v/v) DMF [65]. Even if LIF detection was used, poor LODs (in 10^{-7} - 10^{-8} M levels) were observed which were attributed to the large background signal of deoxycholate surfactant. Later, Dovichi et al. described the analysis of a more complex PAH mixture, composed of the 16 US-EPA PAHs, using SC in the presence of different organic modifiers (MeOH and/or ACN at a total concentration of up to 70 % (v/v), EtOH (30-50 %), urea (3.2-6.8 M) or dichloromethane) [55]. The aim of adding urea to the BGE was to increase PAH solubility, leading to a decrease in PAH retention factors and, hence to a change in selectivity. Here, urea concentration < 6.8 M improved resolution particularly for heavier PAHs. On the contrary, at higher urea concentrations, poor resolution was observed for most PAHs, probably due to weaker interactions between PAHs and bile salt aggregates. Under a BGE composed of 50 mM SC

and 60 % (v/v) MeOH, 13 out of the 16 PAHs studied were satisfactory resolved in 40 min. Nevertheless, a lack of selectivity still existed since pairs of isomers such as PHE/ANT, BaA/CHR, and BbFA/BkFA could not be separated in these conditions and separation times were still too long.

In MEKC using organic modifiers, separations of PAHs were also achieved using monomolecular pseudo phases formed from ionic polymers, whose main advantages over conventional micelles are their stability in organic phase and their associated wider separation window. Indeed, in this case, the elimination of dynamic equilibrium between monomer and micelle as well as the presence of covalent bonds provide better stabilities, enhanced rigidities, and reproducible sizes, whatever the percentage of organic solvent in the BGE. Polymers also offer a wider migration window than SDS since their electrophoretic mobility is usually greater than that of SDS micelles. Palmer and Terabe synthesized and characterized two polymerized surfactants: sodium polyundecenyl sulfate (poly-SUS) and sodium polyundecylenate [56]. Among the 12 PAHs tested, comprising between 2 and 4 aromatic rings, 10 PAHs were baseline separated in less than 30 min using a 12.5 mM sodium phosphate-borate buffer (pH 9.3) composed of 60 % (v/v) MeOH and 0.6 % (w/v) poly-SUS.

Later, Warner et al. also used micelles of poly-SUS in EKC to separate a more complex PAH mixture composed of the 16 US-EPA PAHs [60]. Using a 12.5 mM sodium phosphate-borate buffer (pH 9.2) with 0.5 % (w/v) poly-SUS and 40 % (v/v) ACN, all 16 PAHs were baseline separated in about 30 min (Figure I-II-1).

For the first time, such separation was recorded using a single-surfactant system. The migration order of most PAHs generally followed an increasing length-to-breadth ratio (ANT and IP being the two exceptions). In this study, under equivalent buffer and surfactant concentrations, poly-SUS was compared to the non-polymerized SUS and to SDS. With SDS, poor selectivity and peak broadening were noticed. Improvements in selectivity were shown with monomeric SUS, probably due to the presence of π - π interactions between PAHs and the terminal double bound of the SUS surfactant. However, the enhanced PAH separation and excellent peak shapes obtained using poly-SUS demonstrated the structural integrity of poly-SUS even at high concentrations of organic solvent. One year later, the same group described the separation of a mixture of 9 out of 12 monomethylBaA (MBA) isomers in 50 min using the same BGE as that previously stated, except for a decrease in ACN percentage from 40 to 35 % (v/v) [61]. It was evidenced that the length of these molecules played an important role in the elution order rather than their length-to-breath ratio.

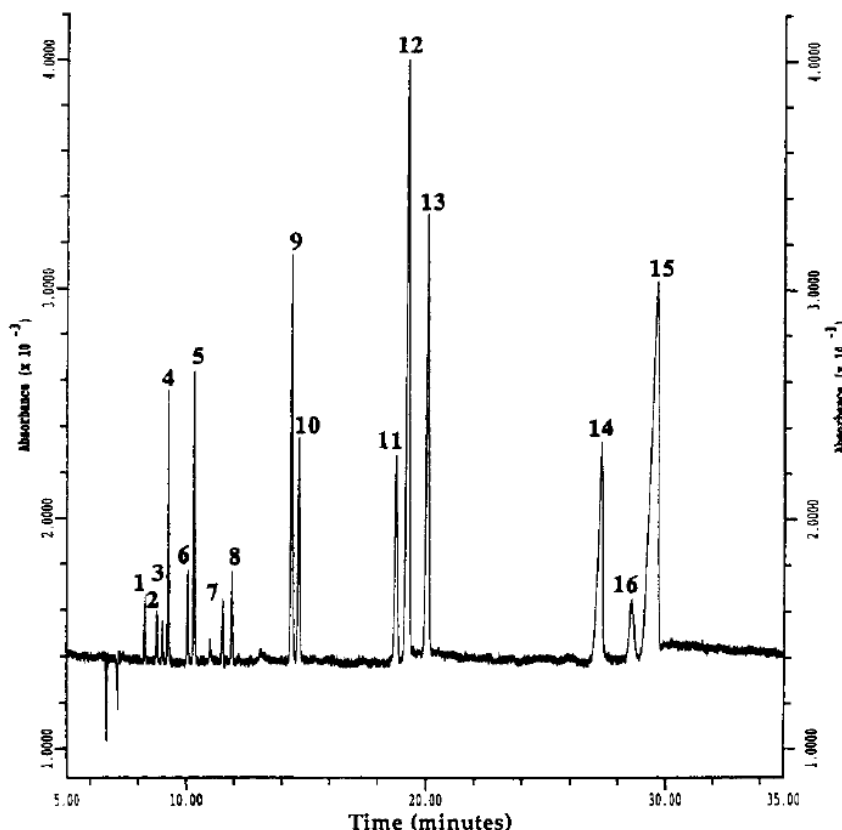


Figure I-II-1. Optimized electrokinetic separation of the 16 US-EPA PAHs using a 12.5 mM sodium phosphate-borate buffer (pH 9.3) with 0.5 % (w/v) poly-SUS and 40 % (v/v) ACN. (1) NPH, (2) ACY, (3) ACP, (4) FLR, (5) PHE, (6) ANT, (7) FA, (8) PYR, (9) BaA, (10) CHR, (11) BbFA, (12) BkFA, (13) BaP, (14) DBaP, (15) BghiP, (16) IP (with permission [60]).

Non-aqueous CE (NACE) was also tested as a promising alternative to the use of hydro-organic media in separating highly hydrophobic compounds. A potential advantage of using a totally non-aqueous BGE for PAH analysis comes from the higher solubility of these compounds in such organic media.

PAH separations in NACE using charge-transfer complexation with planar organic cations (tropylium ion and 2,4,6-triphenylpyrylium ion) were carried out by Shea et al. [62]. Migration orders were similar to those previously observed using TAA^+ , i.e. largest PAHs are detected first, indicating that they had the greatest interaction with the cation. By establishing quantitative structure-migration relationships, it was found that, in addition to charge-transfer interactions, electrostatic and dispersive forces played an important role in PAH-cation binding. Indeed, PAH polarizability was found to be correlated with electrophoretic mobility data. By comparison, the separation of 20 PAHs was better using a BGE composed of 40 mM of 2,4,6-triphenylpyrylium tetrafluoroborate in ACN than using the BGE proposed by Walbroehl and Jorgenson (25 mM tetrahexylammonium perchlorate in 50 % (v/v) ACN). Nevertheless, in the presence of the planar cation, only 14 out of 20 PAHs were separated in

15 min with low sensitivities, which can be explained by the high background absorbance of triphenylpyrylium ion at 254 nm. Finally, Wheeler et al. investigated a series of conventional reversed-phase HPLC ion-pairing agents, such as linear alkylsulfonates and tetraalkylammonium halides, in three different organic solvents (ACN, MeOH, and N-methylformamide) [57]. 10 PAHs out of the 13 analyzed were separated in about 17 min using 50 mM ammonium acetate-100 mM tetrahexylammonium ions in 100 % MeOH. Finally, the separation method was successfully coupled with solid-phase microextraction for extracting and preconcentrating PAHs from spiked water into a methanolic BGE.

To conclude this part, even if the addition of organic modifiers in MEKC enabled to enhance PAH separation, long analysis time and insufficient selectivity still constituted the main limitations of this technique.

2.2 Micellar electrokinetic chromatography modified with cyclodextrins

To further enhance the selectivity of the separation mechanism, CD-MEKC, which employs CD together with an ionic surfactant, was introduced by Terabe et al. in 1990 [69]. In such method, PAHs are distributed between the micelles, the CD, and the electrolyte. Similarly to solvents, addition of CDs to the BGE reduces the partitioning of PAHs in the micelles. By adding CD, better PAH separations are generally obtained since separation mechanisms are not only based on hydrophobicity but also on molecular shape. Native β - and γ -CDs, with seven and eight glucopyranose units respectively, are the most widespread. Terabe et al. were the first to demonstrate the potential of CD-MEKC in separating mixtures of PAHs [69]. Using a 100 mM borate buffer (pH 9.0) with 100 mM SDS, 30 mM γ -CD, and 5 M urea, 8 PAHs containing between 2 and 4 rings were separated in less than 30 min. The addition of a high concentration of urea was necessary to prevent PAHs from adsorption onto the capillary wall. Later, in 1993, this group applied the same buffer with a lower concentration of γ -CD (20 mM) to the separation of the 16 US-EPA PAHs [70]. It took 60 min to baseline resolve 13 PAHs over the 16 PAHs studied. Indeed, the 3 PAH pairs, CHR/PYR, FA/BaA, and BkFA/DBaA were not separated, thus proving an insufficient selectivity to analyze complex PAH mixtures in a reasonable analysis time. To modify the selectivity, 75 mM β -CD instead of γ -CD were added to the BGE. Even if the smaller cavity of the β -CD seemed to be better suited for the separation of tricyclic and tetracyclic PAHs (CHR/PYR and FA/BaA became resolved), poor resolution was obtained on the whole, especially for heavier PAHs. Indeed, when β - or γ -CDs are used in MEKC, only some PAHs will interact with the cavity, whereas others will be slightly affected or even not affected at all by the presence of the CD. Therefore, Marina et al. suggested the use of a mixture of β - and γ -CDs to increase the

resolving power of the CD-MEKC method [71]. Effects of the ratio between the concentrations of the two CDs and the total concentration on the separation of 20 PAHs (including the 16 US-EPA PAHs) were studied. The best results were obtained using a 140 mM borate buffer (pH 9) containing 100 mM SDS, 42 mM β -CD, 26 mM γ -CD, and 2.5 M urea, which allowed the separation of 18 PAHs in 54 min. However, the analysis time was still long, two PAH pairs were not separated (perylene/ANT and BaP/BaA), and others migrated as clusters such as ACP/ACY, BaP/BaA/FA, DBahA/BkFA/triphenylene (Figure I-II-2).

In CD-MEKC, the elution order depends on the differential partitioning between the two hydrophobic partners (micelles and CDs). However, with some exceptions, a linear correlation was found between $\log k$, k being retention factors of PAHs, and $\log P$, showing the importance of hydrophobic effects in the separation mechanism of CD-MEKC. This observation may explain the low selectivity still observed.

In another study, Warner et al. employed the poly-SUS polymeric surfactant, already tested above by MEKC using organic modifier, with various neutral CDs (β -CD, γ -CD, dimethyl- β -CD, trimethyl- β -CD, and hydroxypropyl- β -CD (HP- β -CD)) for the separation of 12 MBA isomers [72]. The combinaison of 5 mM γ -CD, 0.5 % (w/v) poly-SUS, and 35 % (v/v) ACN in a 12.5 mM sodium phosphate-borate buffer (pH 9.75) provided the best resolution of isomers with a separation time of 110 min. In these conditions, all isomers were baseline resolved, except 9-MBA and 2-MBA. However, in their previous study, using 0.5 % (w/v) poly-SUS and 35 % (v/v) ACN, only 6 out of the 12 MBA isomers were baseline separated and 3 pairs co-migrated; a better separation was thus achieved by CD-MEKC at the expense of doubling analysis time.

In MEKC, even if the addition of CDs has been the most successful strategy to improve PAH separations, this method still suffers from a lack of selectivity evidenced by co-migrations of structurally similar PAHs and long analysis times.

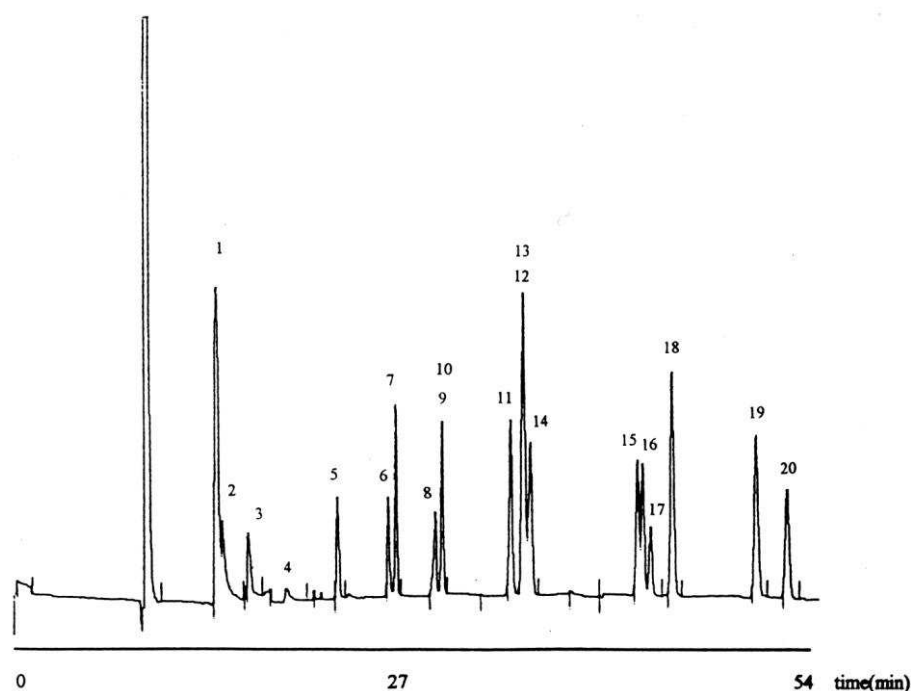


Figure I-II-2. Electropherogram of 20 PAHs (including the 16 US-EPA PAHs) by CD-MEKC. (1) ACP, (2) ACY, (3) NPH, (4) BghiP, (5) FLR, (6) PHE, (7) PYR, (8) CHR, (9) Pe, (10) ANT, (11) BeP, (12) BaP, (13) BaA, (14) FA, (15) DBahA, (16) BkFA, (17) triphenylene, (18) BjFA, (19) BbFA, (20) IP (with permission [71]).

2.3 Cyclodextrin-modified capillary zone electrophoresis

An excellent alternative to both approaches mentioned above is CD-modified CZE in which PAHs are separated on the basis of differential partitioning between two CDs. In this approach, PAHs are separated based on their different complexation constants between one neutral CD, which moves at the speed of EOF, and one negatively charged CD, which migrates at a slower velocity due to its own electrophoretic mobility and consequently, acts as a pseudo-phase in analogy with MEKC. In contrast with MEKC, CD-CZE can tolerate large amounts of organic solvent, which prevent PAHs from solubility and adsorption problems. Another advantage of CD-CZE over CD-MEKC is the absence of interactions between the various additives, so that the effect of each CD on the separation may be predicted via single CD experiments. Anigbogu et al. first demonstrated the capability of CD mixtures to separate 4 PAHs of 3, 4, or 5 rings (ANT, PYR, CHR, and BaP) [73]. All PAHs were resolved by the use of two neutral CDs (β -CD and γ -CD) in addition to the anionic carboxymethyl- β -CD (CM- β -CD). The two neutral CDs were required to separate BaP from CHR. Then, Luong et al. also studied mixtures of neutral and anionic CDs for the separation of 6 PAHs (PHE, ANT, PYR, CHR, BaP, and BeP) [74]. In this study, two neutral CDs, HP- β -CD and methyl- β -CD (Me- β -CD), and two negatively charged CDs, sulfobutyl ether- β -CD

(SBE- β -CD) and CM- β -CD were investigated and the effects of various concentration ratios of neutral and charged CDs on the quality of the separation were studied.

As expected, in the absence of anionic CDs, PAHs could not be separated. On the contrary, a general trend of increased PAH migration times and overall selectivities with anionic CD concentrations was obtained though some differences of selectivities were noted between the two dual CD mixtures, HP- β -CD/CM- β -CD and Me- β -CD/SBE- β -CD. Indeed, using HP- β -CD/CM- β -CD buffer, the migration order was correlated to the molecular weight with larger PAHs migrating faster since favoring the complexation with HP- β -CD over CM- β -CD. In the presence of the Me- β -CD/SBE- β -CD system, even if an opposite migration order was globally obtained, this trend was not as rigorously followed as in the previous case. Finally, Me- β -CD/SBE- β -CD mixture was found superior to HP- β -CD/CM- β -CD system since a lower concentration of SBE- β -CD was required for complete PAH separation, leading to lower currents and enabling to work at higher potential, which resulted in more rapid and efficient separations. Under the best conditions (50 mM borate buffer (pH 9.0) with 20 mM Me- β -CD and 25 mM SBE- β -CD), all 6 PAHs were baseline resolved in 10 min with a high selectivity proved by the separation of the two PAH isomers (BaP and BeP), achieved for the first time in CE. However, the authors specified that the choice of CD combinations was serendipitous and that dual CD systems must be tested empirically with each PAH mixture to determine its potential for separation.

One year later, the same group further demonstrated the unique selectivity offered by the dual Me- β -CD/SBE- β -CD system for the analysis of the 16 US-EPA priority PAHs in contaminated soils [75]. Using 35 mM SBE- β -CD and 15 mM Me- β -CD, the separation of the 16 PAHs required 20 min instead of 60 min for equivalent resolution using CD-MEKC [70]. Nevertheless, several groups of PAHs were not fully baseline resolved (e.g. FLR/ANT, CHR/PHE/BaA, and BbFA/IP/PYR). As PAH concentrations in soil extracts were in the ppb range, UV absorbance detection was not suited. Laser-induced fluorescence (LIF) detection (excitation wavelength: 325 nm) was therefore used, and only 11 out of the 16 PAHs could be detected with LODs going from 0.9 to 21.7 $\mu\text{g/L}$, except for PHE, whose LOD reached 137 $\mu\text{g/L}$. Experimental conditions were revisited and finally, the 11 PAHs were separated in about 12 min using 25 mM SBE- β -CD and 20 mM Me- β -CD (the concentration of the SBE- β -CD could be decreased, thus reducing PAH migration times). However, the pair BaA/PHE was still not baseline resolved. Given these limitations, one year later, the same group tried to introduce one more neutral CD; native γ - and α -CDs were tested [76]. Surprisingly, better PAH separation was obtained with the α -CD, which usually is not expected to interact with the biggest PAHs because of its smaller cavity size. The overall electrophoretic separation of the 16 US-EPA PAHs was enhanced by adding 4 mM α -CD to the BGE, although

ACP/NPH/FLR and BbFA/IP were not fully baseline resolved (Figure I-II-3). Moreover, microprecipitation, i.e. spikes, was observed in the electropherogram and BghiP, the most hydrophobic compound, appeared to interact strongly with SBE- β -CD and/or the capillary wall, and in some cases, it did not appear in the electropherogram, proving solubility and therefore repeatability problems. This separation method was coupled to a solid phase micro-extraction which used a glass fiber to extract the 16 PAHs from diluted samples. Once the fiber was connected to the separation capillary, adsorbed PAHs were directly released into the CE buffer stream, separated on-line by CD-CZE, and detected by UV absorbance. The achieved sensitivity was slightly lower than that reported using LIF detection with LODs ranging from 8 to 75 $\mu\text{g/L}$ for PYR and ACP, respectively.

Recently, for the first time, Gareil et al. reported a CD-CZE method coupled to LIF detection (excitation wavelength at 325 nm and emission wavelength superior to 350 nm) for the simultaneous separation of the two lists of priority PAHs: the 16 US-EPA PAHs and the 15+1 EU priority PAHs [77]. In this work, the use of an internal standard combined with a thorough study of electrolyte and sample compositions, rinse sequences, and sample vial material enabled to optimize repeatability. Enhanced repeatability was achieved by improving PAH solubility in both BGE and sample via the addition of 10 % (v/v) MeOH and 600 mM urea to the BGE, 30 % (v/v) MeOH to the sample solution, and limiting PAH adsorption to vial walls via the use of glass instead of polypropylene as material. Moreover, between each run, an intensive rinse sequence by successively percolating proper volumes of water, MeOH, water, and BGE was found to be necessary. Under optimized conditions, RSD values of 0.8-1.7 % and 1.2-4.9 % were reached for peak migration times and normalized corrected peak areas, respectively, for 6 successive experiments. Selectivity of the separation method was then optimized by varying the CD relative concentrations, and best results were obtained using a 10 mM borate buffer (pH 9.2) composed of 10 mM SBE- β -CD, 20 mM Me- β -CD, 600 mM urea, and 10 % (v/v) MeOH, leading to baseline resolution of 18 PAHs in 15 min. It is worthy to note that the degree of substitution of the SBE- β -CD used here was 6.2 whereas it was 4 for the previous study. Although high selectivity was reached, over the 19 PAHs that could be detected using the LIF detection (excitation wavelength at 325 nm and emission wavelength superior to 350 nm), one pair remained unresolved: BbFA/PYR. That is why, in other studies, the same group brought a deeper insight into separation optimization using experimental design strategies to maximize resolution of two PAH mixtures: (i) the 8 PAHs common to the two priority lists (US-EPA and EFSA) [78] and (ii) the 19 PAHs which fluoresce using the LIF detection at 325 nm targeted by both institutions [79]. These multivariate approaches were based on a central composite design composed of 3 factors: the concentrations of both CDs (SBE- β -CD and Me- β -CD) and the percentage of MeOH in the BGE. Using a desirability

analysis, a rapid screening method allowed to separate the 8 priority PAHs in less than 7 min (Figure I-II-4A), whereas the other method enabled to baseline resolve all 19 PAHs in 18 min in a single run (Figure I-II-4B). Finally, these CD-CZE methods were successfully carried out for the separation of PAHs from edible oil extracts, proving their suitability for real world sample analysis.

In conclusion, although MEKC-modified with organic solvents or CDs can be useful alternatives to MEKC to separate PAHs, the use of dual CD systems in CZE mode appears to provide the additional selectivity needed for these difficult separations.

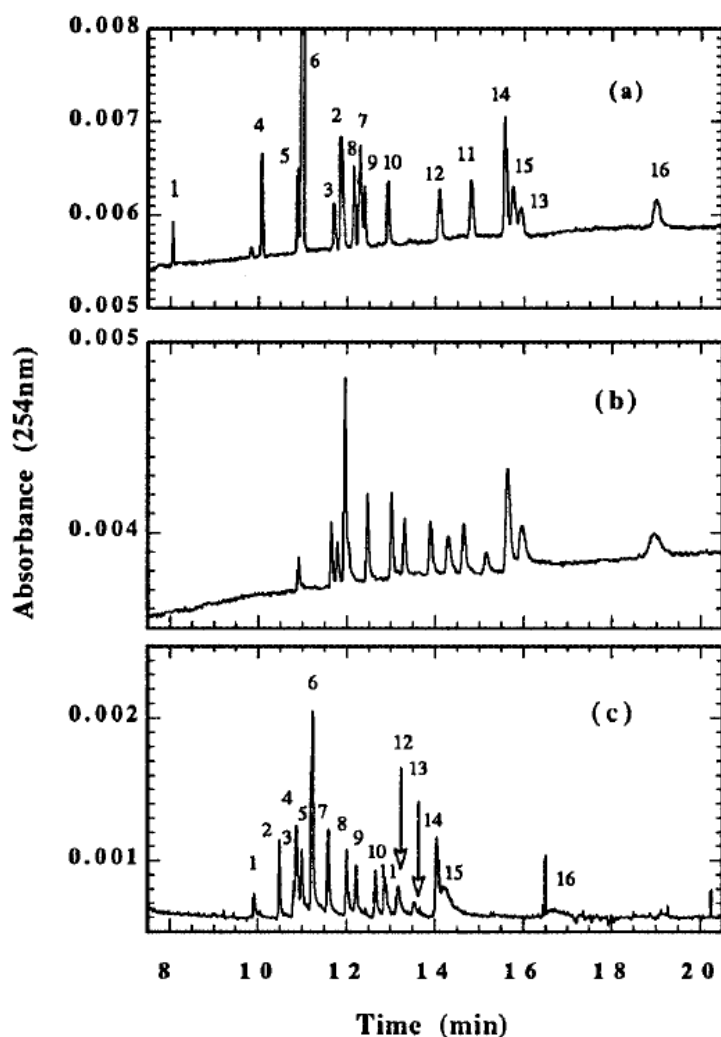
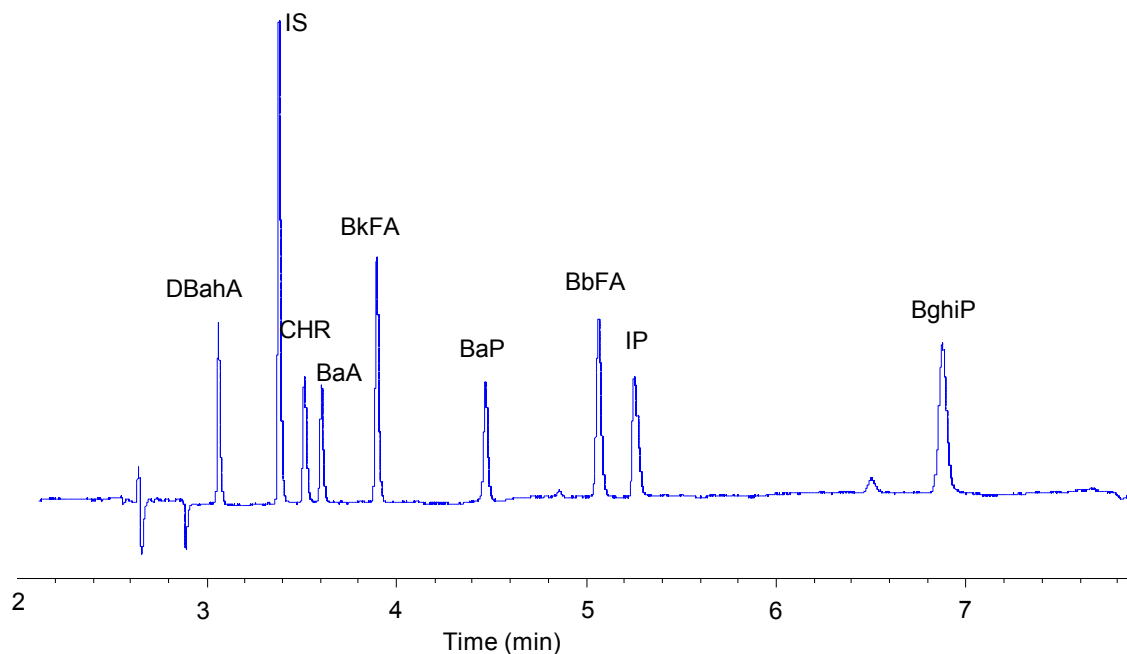


Figure I-II-3. Electropherograms of the 16 US-EPA PAHs obtained with 50 mM borate buffer (pH 9.2). (a) 35 mM SBE- β -CD and 15 mM Me- β -CD. (b) 70 mM SBE- β -CD. (c) 35 mM SBE- β -CD, 10 mM Me- β -CD, and 4 mM α -CD. (1) DBaH₄, (2) ACY, (3) ACP, (4) NPH, (5) FLR, (6) ANT, (7) PHE, (8) CHR, (9) BaA, (10) BkFA, (11) FA, (12) BaP, (13) PYR, (14) BbFA, (15) IP, (16) BghiP (with permission [76]).

(A)



(B)

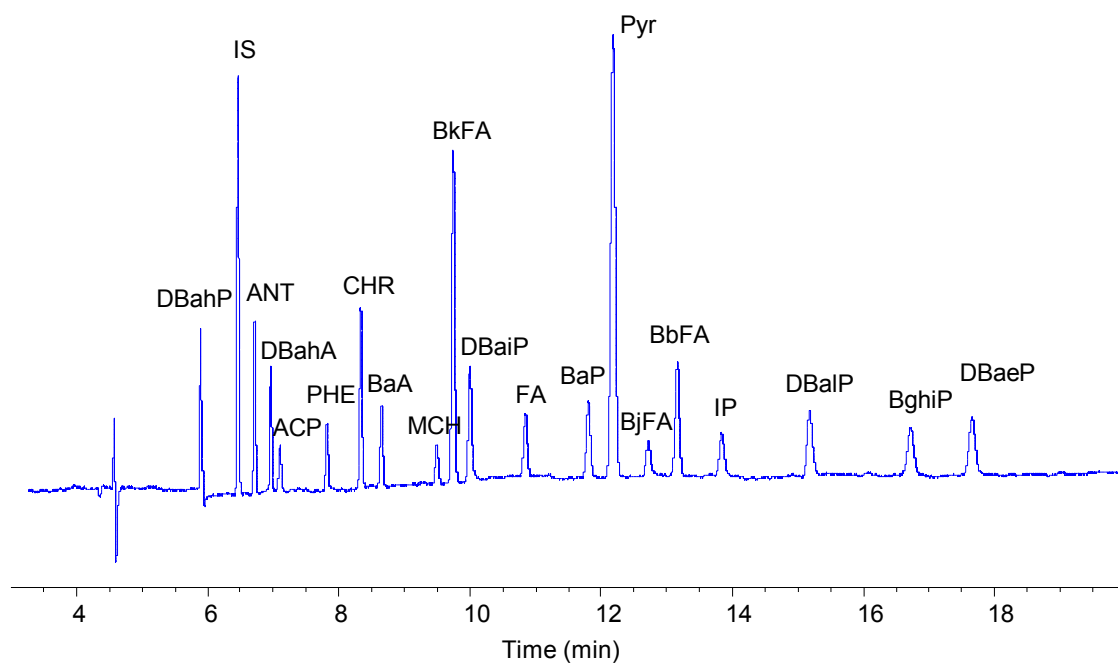


Figure I-II-4. Electropherograms of (A) 8 PAHs and (B) 19 PAHs in the presence of internal standard (IS): umbelliferone, using 10 mM borate buffer (pH 9.2), 600 mM urea, (A) 5.3 mM SBE- β -CD, 21.5 mM Me- β -CD, 10.3 % (v/v) MeOH, (B) 9.4 mM SBE- β -CD, 14.1 mM Me- β -CD, 11.2 % (v/v) MeOH (with permission [78], [79]).

Table I-II-2. Separation of PAHs by CE

PAHs	BGE	Detection	LOD	Observations	Ref.
MEKC with TAA⁺					
BghiP, Pe, PYR, 9-methylantracene, NPH	0.025 M THAP, 50 % (v/v) ACN	UV 229 nm	N/A	Separation time: 25 min	[64]
16 neutral aromatic compounds including 6 PAHs (COR, BghiP, Pe, PYR, ANT, NPH)	8 mM borate (pH 9.4), 50 mM tetraheptylammonium bromide, 42 % (v/v) ACN	UV 254 nm	N/A	Separation time: 28 min	[66]
NPH, ANT, PHE, PYR, CHR	10 mM tetraoctylammonium bromide, 40 % (v/v) ACN	UV 220 nm	N/A	Separation time: 25 min Low repeatability of EOF and PAH migration times	[63]
MEKC with anionic surfactant					
FLR, PHE, ANT, FA, PYR, CHR, BaP	8.5 mM borate buffer (pH 9.9), 85 mM SDS, 50 % (v/v) ACN	DAD (190-350 nm)	10 pg	Separation time: 8 min FA/PYR unresolved	[52]
Benzene, NPH, 2-MeNPH, ACP, PHE, ANT, FA, PYR, CHR, Pe	20 mM phosphate–5 mM borate buffer, 50 mM SDS, 40 % (v/v) EtOH	UV 254 nm	N/A	Separation time: 35 min	[54]
(1) NPH, Biphenyl, Azulene, ANT, 7,8-benzoquinoline, FLR, 2,3-BenzoFLR, FA, PYR, BaP (2) 3-aminoFA, 7,8-benzoquinoline, 2,3-BenzoFLR, ANT, FA, PYR, BaP	(1) 5 mM THAM buffer, 0.1 % PEO, 50 mM SDS, 0.02 % DS, 45 % (v/v) MeOH (2) Gradient: 5 mM THAM buffer, 0.1 % PEO, 35 mM SDS, 0.02 % DS, 40 % (v/v) MeOH for 120 s subsequently 5 mM THAM buffer, 0.1 % PEO, 20 mM SDS, 0.02 % DS, 50 % (v/v) MeOH	(1) UV 254 nm (2) LIF (λ_{exc} : 325 nm, λ_{em} > 395 nm)	(2) 0.24 – 3.19 μ g/L	Separation time: (1) 12 min (2) 35 min LIF: 10-1000-fold improvements in sensitivity compared to UV	[53]

PAHs	BGE	Detection	LOD	Observations	Ref.
23 nonionic aromatic compounds including azulene, NPH, ACY, ACP, FLR, 9,10-dimethylBaA, BaA, PHE, ANT, FA, PYR, 2,3-benzoFLR, CHR, 2,3-benzoPHE, Pe, BaP, BghiP	8 mM sodium borate buffer (pH 9.0), 50 mM DOSS, 36 % (v/v) ACN	UV 254 nm	N/A	Separation time: 25 min	[51]
20 nonionic aromatic compounds including azulene, NPH, ACY, ACP, FLR, BaA, ANT, FA, PYR, 2,3-benzoFLR, CHR, 2,3-benzoPHE, Pe, BaP, BghiP	8 mM sodium borate buffer (pH 9.0), 40 mM Brij-S, 40 % (v/v) ACN	UV 254 nm	N/A	Separation time: 36 min	[58]
19 nonionic aromatic compounds including azulene, NPH, 1-MeNPH, ACP, FLR, PHE, BaA, ANT, FA, PYR, 2,3-benzoFLR, CHR, BeP, BaP, BghiP, 9,10-diphenylANT, rubrene	10 mM HCl (pH 2.4), 30 mM Brij-S, 20 % (v/v) ACN, 20 % (v/v) 2-propanol	UV 254 nm	N/A	Separation time: 20 min	[59]
11 nonionic aromatic compounds including NPH, ACY, ACP, PHE, ANT, PYR, Pe, BaP	20 mM Tris buffer, 50 mM SDBS, 40 % (v/v) ACN	UV 254 nm	7.0×10^2 – 3.9×10^4 µg/L	Separation time: 20 min	[50]
MEKC with bile salts					
FA, PYR, Pe, BaP, 2,3-benzotriphenylene, DBahA	20 mM Tris-10 mM sodium dihydrogenphosphate buffer, 70 mM sodium deoxycholate, 20 % (v/v) DMF	LIF (λ_{exc} : 325 nm, λ_{em} : N/A)	9.31 – 39.0 µg/L	Separation time: 16 min	[65]
16 US-EPA PAHs	10.7 mM phosphate-1.8 mM borate buffer, 50 mM SC, 60 % (v/v) MeOH	LIF (λ_{exc} : 248 nm, λ_{em} : N/A)	N/A	Separation time: 40 min	[55]

PAHs	BGE	Detection	LOD	Observations	Ref.
MEKC with ionic polymers					
NPH, diphenyl, diphenylmethane, FLR, PHE, o-terphenyl, ANT, FA, PYR, m-terphenyl, p-terphenyl, triphenylene	12.5 mM sodium phosphate-borate buffer (pH 9.3), 0.6 % (w/v) poly-SUS, 60 % (v/v) MeOH	UV 214 nm	N/A	Separation time: 30 min	[56]
16 US-EPA PAHs	12.5 mM sodium phosphate-borate buffer (pH 9.2), 0.5 % (w/v) poly-SUS, 40 % (v/v) ACN	UV 254 nm	N/A	Separation time: 30 min	[60]
12 monomethylBaA	12.5 mM sodium phosphate-borate buffer (pH 9.2), 0.5 % (w/v) poly-SUS, 35 % (v/v) ACN	UV 254 nm	N/A	Separation time: 50 min 9 compounds separated	[61]
NACE					
Coronene, naphtho[2,3-a]pyrene, BghiP, IP, Pe, BaP, DBaH, BbFA, BkFA, BaA, CHR, PYR, FA, naphthacene, ANT, PHE, ACP, ACY, FLR, NPH	40 mM 2,4,6-triphenylpyrylium tetrafluoroborate, 100 % ACN	UV 254 nm	N/A	Separation time: 15 min 14 compounds separated	[62]
NPH, FLR, ANT, PHE, PYR, 2,3-benzoFLR, CHR, Pe, BkFA, BeP, BaP, BghiP, coronene	50 mM ammonium acetate, 100 mM tetrahexylammonium ions, 100 % MeOH	UV 254 nm	N/A	Separation time: 17 min 10 PAHs separated	[57]
CD-MEKC					
NPH, ACP, ANT, FLR, PHE, CHR, PYR, FA	100 mM borate buffer (pH 9.0), 5 M urea, 100 mM SDS, 30 mM γ -CD	UV 210 nm	N/A	Separation time: 30 min	[69]
16 US-EPA PAHs	100 mM borate buffer (pH 9.0), 5 M urea, 100 mM SDS, 20 mM γ -CD	UV 210 nm	N/A	Separation time: 60 min 13 PAHs separated	[70]

PAHs	BGE	Detection	LOD	Observations	Ref.
16 US-EPA PAHs + Pe, BeP, triphenylene, BjFA	140 mM borate buffer (pH 9), 2.5 M urea, 100 mM SDS, 42 mM β -CD, 26 mM γ -CD	UV 230 nm	N/A	Separation time: 54 min 18 PAHs separated	[71]
12 monomethylBaA	12.5 mM phosphate-borate buffer (pH 9.75), 0.5 % (w/v) poly-SUS, 5 mM γ -CD, 35 % (v/v) ACN	UV 254 nm	N/A	Separation time: 110 min 11 compounds separated	[72]
CD-CZE					
ANT, PYR, CHR, BaP	10 mM phosphate-6 mM borate buffer (pH 6), 10 mM CM- β -CD, 8 mM β -CD, 1 mM γ -CD, 30 % (v/v) MeOH	LIF (λ_{exc} : 325 nm, λ_{em} : N/A)	N/A	Separation time: 10 min	[73]
ANT, PHE, CHR, PYR, BaP, BeP	50 mM borate buffer (pH 9), 20 mM Me- β -CD, 25 mM SBE- β -CD	LIF (λ_{exc} : 325 nm, λ_{em} > 370 nm)	50.4 μ g/L (BaP)	Separation time: 10 min	[74]
(1) 16 US-EPA PAHs (2) 16 US-EPA PAHs except NPH, FLR, ACP, ACY, IP	50 mM borate buffer (pH 9.2) with: (1) 35 mM SBE- β -CD and 15 mM Me β -CD (2) 25 mM SBE- β -CD and 20 mM Me β -CD	(1) UV 254 nm (2) LIF (λ_{exc} : 325 nm, λ_{em} > 370 nm)	(1) N/A (2) 0.9 – 21.7 μ g/L except PHE (137 μ g/L)	Separation time: (1) 20 min (2) 12 min	[75]
16 US-EPA PAHs	50 mM borate buffer (pH 9.2), 35 mM SBE- β -CD, 10 mM Me- β -CD, 4 mM α -CD	UV 254 nm	8 – 75 μ g/L	Separation time: 16 min	[76]
16 US-EPA PAHs + 15+1 EU PAHs	10 mM borate buffer (pH 9.2), 600 mM urea, 10 mM SBE- β -CD, 20 mM Me- β -CD, 10 % (v/v) MeOH	LIF (λ_{exc} : 325 nm, λ_{em} > 350 nm)	LOQs: 10 – > 1000 μ g/L	Separation time: 15 min	[77]

PAHs	BGE	Detection	LOD	Observations	Ref.
DBahA, CHR, BaA, BkFA, BaP, BbFA, IP, BghiP	10 mM borate buffer (pH 9.2), 600 mM urea, 5.3 mM SBE- β -CD, 21.5 mM Me- β -CD, 10.3 % (v/v) MeOH	LIF (λ_{exc} : 325 nm, λ_{em} > 350 nm)	N/A	Separation time: 7 min	[78]
16 US-EPA PAHs + 15+1 EU PAHs	10 mM borate buffer (pH 9.2), 600 mM urea, 9.4 mM SBE- β -CD, 14.1 mM Me- β -CD, 11.2 % (v/v) MeOH	LIF (λ_{exc} : 325 nm, λ_{em} > 350 nm)	N/A	Separation time: 18 min	[79]

CD: cyclodextrin, CD-CZE: cyclodextrin-modified capillary zone electrophoresis, CM- β -CD: carboxymethyl- β -CD, COR: coronene, DMF: dimethylformamide, DOSS: sodium dioctyl sulfosuccinate, DS: dextran sulfate, LIF: laser-induced fluorescence detection, LOD: limit of detection, Me- β -CD: methyl- β -CD, N/A: information is not available, NACE: nonaqueous capillary electrophoresis, PAH: polycyclic aromatic hydrocarbon, Pe: perylene, PEO: poly(ethylene oxide), Poly-SUS: sodium polyundecenyl sulfate, SBE- β -CD: sulfobutyl ether- β -CD, SC: sodium cholate, SDBS: sodium dodecylbenzenesulfonate, SDS: sodium dodecyl sulfate, TAA⁺: tetraalkyl ammonium ions, THAM: tris(hydroxymethyl)amino-methane, THAP: tetrahexyl ammonium perchlorate, Tris: tris(hydroxymethyl)aminomethane, US-EPA: United States Environmental Protection Agency.

2.4 Capillary electrochromatography

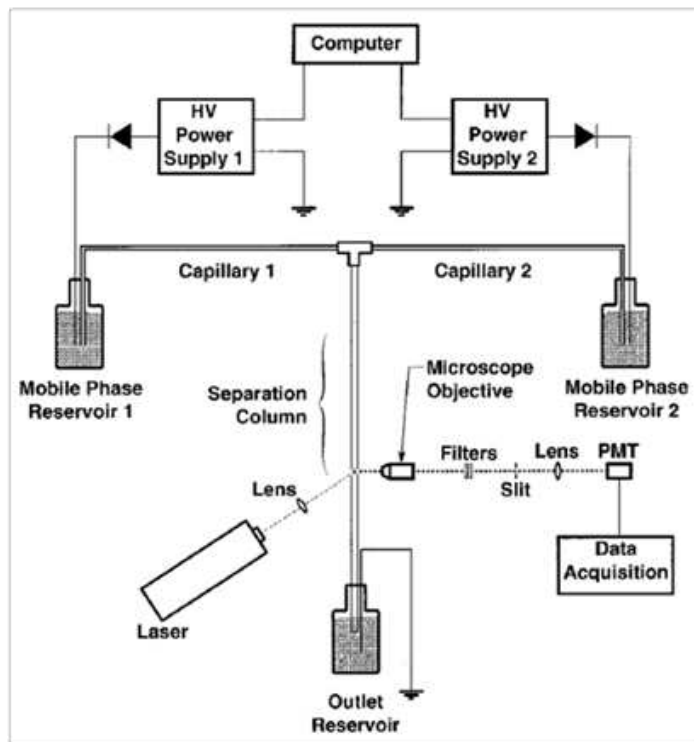
2.4.1 CEC with particle-based stationary phases

In 1991, Knox and Grant pointed out that capillary electrochromatography (CEC) offers great promises and high efficiencies as long as the capillary can be well packed, especially with very small diameter particles. In that case, 7 PAHs were used as model compounds and were fully separated with 3- μm Hypersil particles derivatized by octadecylsilane (ODS) [80]. The ODS particles possess both the chemically bonded octadecyl stationary phase, providing the essential chromatographic interactions, and the residual silanol moieties, which add to the generation of the EOF to drive the mobile phase and the solutes through the packed capillary. Indeed, in CEC, the column serves not only as the separation element but also as the pumping device.

Next, Zare et al. demonstrated that CEC could be used for the routine analysis of the 16 US-EPA PAHs, involving capillaries packed with 3- μm ODS particles and UV laser-excited native fluorescence (257 nm) [81]. In this paper, the factors that play a major role in CEC were well underlined: the frit fabrication, the packing mode (electrokinetically or by pumping), and the mobile phase composition plus its degassing to limit the bubble formation. With a mobile phase composed of 80 % of ACN in 4 mM sodium tetraborate solution, 15 of the 16 components were baseline resolved. However, when the fraction of ACN was reduced to 60 %, the critical pair was resolved, but a large increase in the retention times for the later-eluting peaks occurred (about 20 h). This is why they developed a gradient elution using direct, electroosmotically driven flows delivered by two fused-silica capillary arms attached to a T-connector, where they mix and then flow into a capillary column that has been electrokinetically packed with 3- μm reversed-phase particles (Figure I-II-5A) [82]. In that case, the separation of the 16 PAHs was fully achieved in 90 min, with a gradient ranging from 55 to 80 % of ACN (Figure I-II-5B). It is worth to notice that a problem in gradient CEC with LIF detection may be baseline drift, which may originate from fluorescence of impurities in the mobile phase and changes in the refractive index during gradient elution. Moreover, the sensitivity of some compounds may strongly depend on the composition of the mobile phase (quenching effects). This is why it is essential for quantitation to have reproducible gradient program and to carry out calibration under the same operating conditions as those used for the analysis of unknown samples. The RSDs for migration time were between 2.8 and 8.1 % ($n = 4$), the highest values corresponding to the last three peaks. Another way consisted in the implementation of a voltage programming, which can be an easiest way to reduce analysis time for the analysis of complex mixtures, starting at low voltage where the

early-eluting peaks are well separated and next increasing it to speed up the elution of the last-eluting peaks. Xin and Lee implemented it for the separation of 14 PAHs, with a home-built CEC system allowing to reach voltage up to 60 kV [83]. This led to a decrease in the analysis time from 27 to 18 min, saving the separation performances.

(A)



(B)

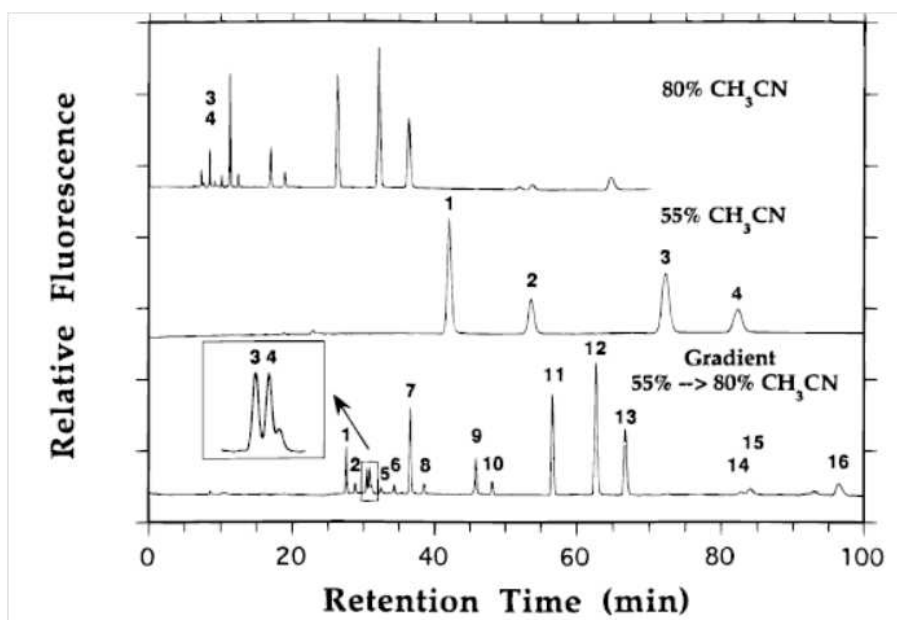


Figure I-II-5. (A) Schematic of the solvent gradient elution CEC apparatus. (B) Electrochromatograms showing the comparison of isocratic and gradient elution for the separation of 16 US-EPA PAHs. The column dimensions were 75- μ m i. d. x 26-cm packed length. 1, NPH; 2, ACY; 3, ACP; 4, FLR; 5, PHE; 6, ANT; 7, FA; 8, Pyr; 9, BaA; 10, CHR; 11, BbFA; 12, BkFA; 13, BaP; 14, DBahA; 15, BghiP; 16, IP. (with permission [82]).

Zare et al. concentrated their efforts to improve the CEC separation of PAHs, implementing columns packed electrokinetically with 1.5- μm non porous ODS particles [84]. The 16 US-EPA PAHs were resolved isocratically in less than 10 min using column length of 15-30 cm, with efficiencies up to 700 000 plates/m (Figure I-II-6). It can be noticed that efficiencies decreased to 300 000-400 000 plates/m if the UV-LIF detection was performed after the outlet frit rather than on-packing. This evidenced that outlet frit could be a strong source of external dispersion of the analyte bands. With the use of both short column (6.5-cm packed length and 10-cm total length) and low conductivity mobile phase (70 % ACN in 2 mM Tris solution), which allows the implementation of high electric field inducing a linear velocity of the mobile phase through the packed beads of 18 mm s⁻¹, 5 PAHs were resolved in less than 5 s. This last point clearly demonstrates the great potential of this technique for high-throughput analysis.

An attractive alternative to gradient elution or 1.5- μm particles for fast separations of PAHs is to implement a sensitive detection, which is able to carry out spectral deconvolution of co-eluting compounds, such as laser-induced dispersed fluorescence (LIDF) [85]. Two optical designs were investigated and their performance discussed. PAHs were successfully determined in soil extracts, with only one efficient separation on a capillary column packed with ODS 3- μm particles and an ACN-4 mM sodium tetraborate (75/25) mobile phase. The identification was indeed based on their different fluorescence spectra even when faced with a separation that may not resolve every compound, such as the one resulting from a complex soil extract analysis. In this study where real and complex samples were involved, a good robustness of CEC was observed: after injecting 12 different soil extracts, there was no significant loss in resolution.

Nevertheless, it is very difficult to reproducibly prepare packed-beads capillary columns, especially the end-frit, generally made by sintering. Indeed, the sintering step involving intense heat often partially destroys the particules and leads to gaps at the end of the packing zone. When high electric fields are applied, the charged beads migrate and gaps in the entire packing bed appear which favor bubble formation. In order to avoid this problem, Lee et al. proposed a new method for preparing capillary columns; the capillary was packed with ODS particles using a CO₂ slurry and was partially filled with a siliceous sol based on tetramethoxysilane (TMOS) and ethyltrimethoxysilane (ETMOS) [86]. After gelling, aging, and drying with supercritical CO₂, the particles were bonded to each other and to the column inner wall by the sol-gel forming a monolith. This column was used for the analysis of some PAHs and relatively small retention factors were obtained. Moreover, the resistance to mass transfer of the unretained thiourea was quite small. Both indicated that the small pores in the particles and the void spaces between particles were partially filled by the sol-gel network.

This disadvantage counter-balanced the interest of this simple and efficient procedure of immobilization of the beads in the capillary.

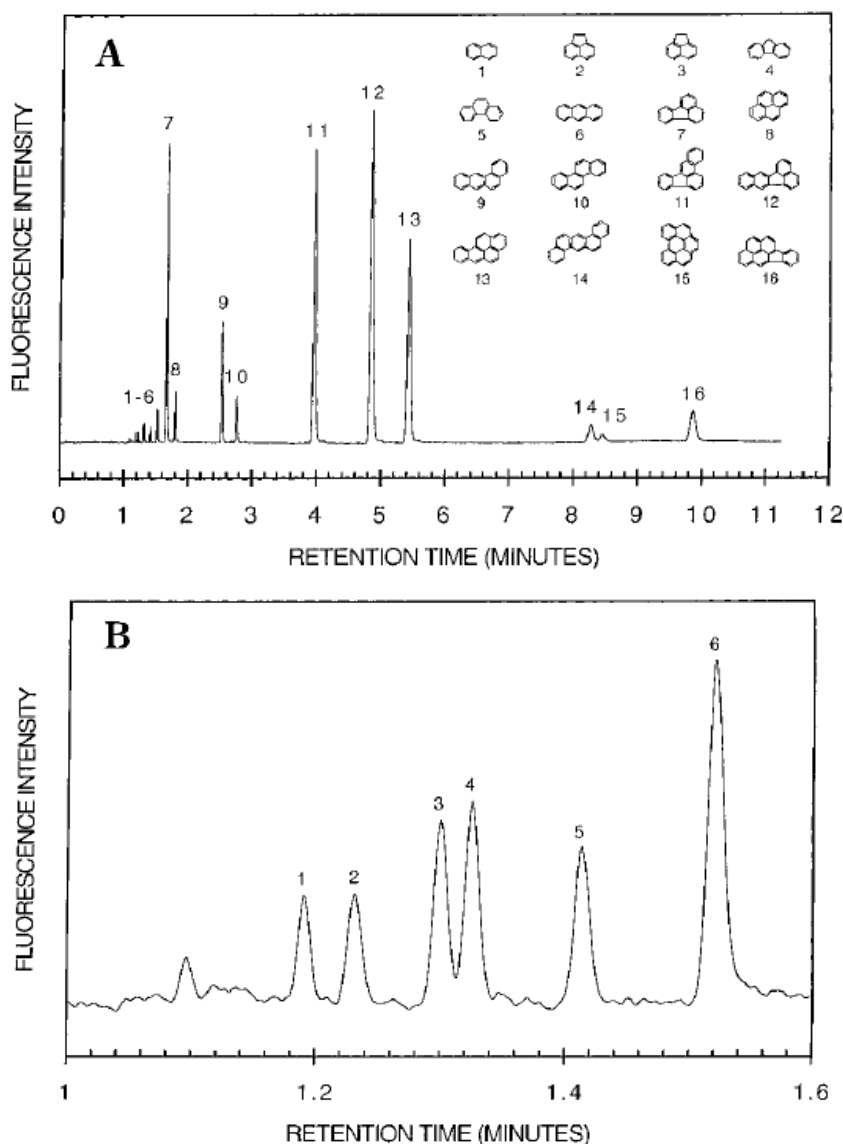


Figure I-II-6. (A) Electrochromatogram showing the CEC separation of 16 US-EPA PAHs using 1.5- μ m non porous ODS particles. The column dimensions were 100- μ m i. d. x 20-cm packed length. The mobile phase is 65 % ACN in a 2 mM TRIS solution. (B) Expanded version of part A showing the peaks between 1.0 and 1.6 min (with permission [84]).

2.4.2 CEC with continuous beds

One of the limitations of the CEC development was due to the difficulty to pack a capillary uniformly with particles. A solution to overcome this problem is the *in situ* synthesis of a continuous bed, by polymerization of an appropriate monomer solution. Moreover, with activation of the capillary wall, the bed can be covalently linked to the wall, which eliminates

the need for frit fabrication and frit disturbances during use (clogging, formation of air bubbles). Continuous bed-type columns can be open tubular ones or porous monoliths.

Constantin and Freitag investigated the open-tubular electrochromatography (OT-CEC) approach for PAH separation [87]. Indeed, OT-CEC has the advantage that pressure injection of the sample and rapid wash and column regeneration cycles by pressure driven “flushes” are possible, even if its major drawback is the inherently low stationary phase capacity. Two silanes were copolymerized: the conventional tetraethoxysilane and a second monomer bearing a C₈ group. A new quick (2.5 h) and reproducible preparation of robust OT-CEC stationary phases in reversed-phase mode was optimized. First attempts for standard separation demonstrated a separation of 3 PAHs (naphthalene, phenanthrene, and pyrene) in less than 3 min with an ACN-water (1/1) mobile phase. RSDs for the retention time are inferior to 1 % for a given capillary and below 5 % between capillaries. Nevertheless, the calculated plate numbers were very low (< 6 000 plates/m).

Better efficiencies (up to 115 000 plates for a 30-cm separation length) were obtained for PAH analysis in OT-CEC with a porous silica layer chemically modified with C₁₈ as stationary phase [88]. For the first time, the influence of mobile phase composition (concentration, type and pH of the buffer, volume fraction and nature of the organic modifier) on EOF velocity, solute retention and column efficiency was systematically studied in OT-CEC. The use of a buffer concentration as low as 1 mM provided the highest resolution with the shortest separation time. Whatever the buffer nature (phosphate, Tris or 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid)), there were no significant differences for PAH separation. The use of ACN rather than methanol was advantageous to speed up the analysis. 8 PAHs were next successfully resolved in less than 4 min with an ACN - 1 mM phosphate buffer.

Despite the simplicity in design and user-friendliness on operation, OT-CEC is not as widely used as the monolithic columns in current CEC practice. This is mainly due to the slow solute diffusion in the liquid mobile phase to undergo interactions with the stationary phase and to the low sample capacity of the OT column. This is why the monolithic approach was investigated by numerous teams. Hjerten et al. designed a simple one-step method for the preparation of an organic monolithic bed and its use for PAH separation [89]. Indeed, the hydrophobic ligand introduction in a bed to carry out reverse-phase CEC was not straightforward (non-water soluble monomers), and was often done in a second step after the polymerization. Here, the addition of a surfactant, Triton X-100, rendered water-soluble stearyl or butyl methacrylate in the polymerization mixture. Charged ligands, vinylsulfonic acid, were also added in order to synthesize a monolith able to generate EOF, with a constant value whatever the pH of the separation electrolyte. A standard mixture of 5 PAHs

was successfully separated in 5 min, involving short capillary internal diameter (25 μm) and thus high field strength.

The introduction of two charged monomers was also evaluated to synthesize a zwitterionic stationary phase [90]. *In situ* polymerization of butyl methacrylate (hydrophobic monomer), ethylene dimethacrylate (EDMA, cross-linker), methacrylic acid (MAA), and 2-(dimethyl amino)ethyl methacrylate (DAMA), which carry acid group and tertiary amine group, respectively, was carried out. As the acido-basic moieties belong to the weak category, both the direction and the strength of EOF could be controlled by changing the pH values of the mobile phase. The DAMA/MAA ratio was increased and resulted in a decrease in the pI value. However, it was not straightforward to predict the pI value just by the pKs of DAMA and MAA and the content of both ionic monomers in the polymerization mixture because the monomers may not have the same reactivity in the polymerization reaction. This approach was next used for the separation of 5 PAHs in less than 4 min, but also for phenols, alkylbenzenes, anilines, and peptides.

Acrylate-based monoliths were also developed. Bushey et al. synthesized a butyl acrylate-based monolith and used it for the separation of 16 US-EPA PAHs [91]. The analysis time was 50 min, the PAHs were not fully resolved and the measured efficiencies were not higher than 80 000 plates/m. These results were not very encouraging, but their paper included the study of the performance as a function of the column length to test the uniformity of the polymer bed throughout the total length of the capillary. Constant retention factors were obtained for FLR, CHR, and BaP, the tested PAHs. Moreover, the Van Deemter plots for CHR as a function of temperature in the 25-55°C temperature range were determined. From 25 to 55°C, H_{min} moved to faster flow rates (1.2 to 2.6 mm s^{-1}) but increased values (18 to 25 μm). It is worth to note that the detection window was created by UV depolymerization thanks to the detector lamp of the CE system. Analysis can thus also be performed over the “short end” of the column and the entire column is filled with the polymer, except for the short detection window, which prevents from problems occurring when a portion is filled and a portion is empty.

Monolithic columns can be organic polymer-based or inorganic silica-based. Hayes and Malik synthesized sol-gel monolith from three precursors: TMOS, N-octadecyldimethyl[3-(trimethoxysilyl)propyl]ammonium chloride ($\text{C}_{18}\text{-TMS}$), and phenyldimethyl silane (PheDMS) [92]. $\text{C}_{18}\text{-TMS}$ brought octadecyl moieties providing chromatographic interactions, 3 methoxy groups that facilitate the *in situ* creation of a chemically bonded monolithic matrix, and positively charged quaternary ammonium moieties that provide a reversed EOF. PheDMS was used as a deactivation reagent. Indeed, during thermal treatment of the column, it reacted with the residual silanol groups in the monolithic structure. The separation of 9 PAHs

was carried out with a 50 cm x 50 μm column and a mobile phase based on ACN-5 mM Tris-HCl pH 2.3 (8/2), with efficiencies up to 146 000 plates/m. This approach was also evaluated in OT-CEC for the separation of 6 PAHs and efficiencies between 195 000 and 383 000 plates/m were obtained [93]. The high efficiencies combined with good mechanical and solvent resistances are the main advantages of inorganic monoliths, but their main limitation lies in their chemical instability when exposed to alkaline environments. Moreover, organic polymer-based monoliths offer simpler preparation and modification, better biocompatibility, and can be synthesized under a variety of conditions (functional monomers, cross-linkers, initiators, and porogen solvents).

The monolith synthesis can be initiated thermally, but also with UV light, allowing their fitting in a given space. Shepodd et al. used this last approach for the conduct-as-cast monolith synthesis in capillaries and in fused-silica chip channels, pretreated for covalent immobilization of the monolith to the surface [94]. Acrylate-based monomer solution was used as it has a low viscosity and can be rapidly cured under UV irradiation (5-20 min). A standard formulation composed of 70 % butyl acrylate, 30 % difunctional cross-linker, and 0.5 % 2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid (AMPS), the charged monomer for EOF generation, led to high efficiencies (about 150 000 plates/m). The 16 US-EPA PAHs with an ACN - 5 mM Tris buffer pH 8 (75/25) were all resolved in 35 min, except the BaA/CHR pair (Figure I-II-7).

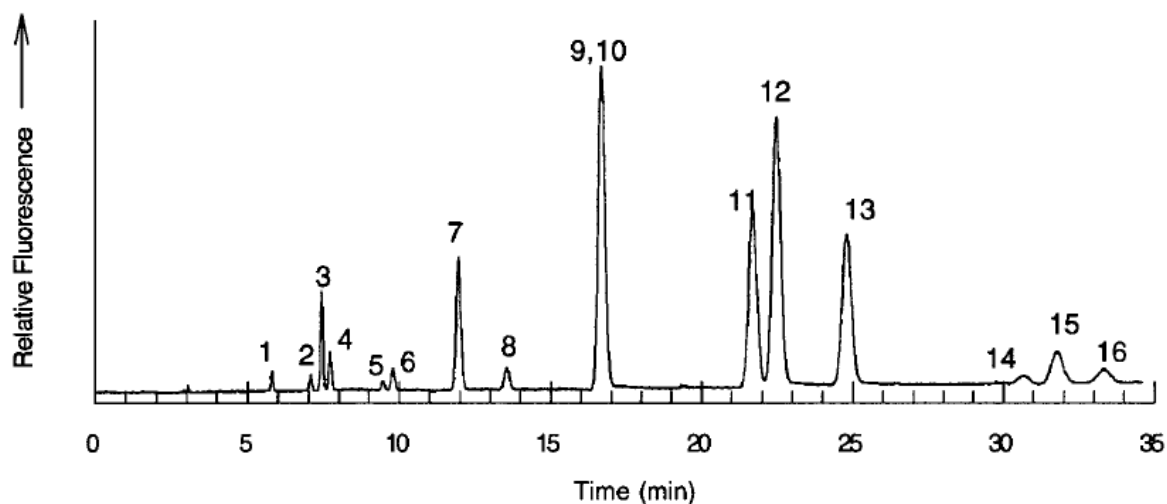


Figure I-II-7. CEC separation of the 16 US-EPA PAHs on a butyl acrylate-based monolithic stationary phase in 75/25 (v/v) ACN – 5 mM Tris pH 8 at field strength of 833 V/cm. 1, NPH; 2, ACY; 3, ACP; 4, FLR; 5, PHE; 6, ANT; 7, FA; 8, Pyr; 9, BaA; 10, CHR; 11, BbFA; 12, BkFA; 13, BaP; 14, DBaH; 15, BghiP; 16, IP. (with permission [94]).

It was demonstrated that the selectivity can be easily tuned by replacing 10 % of the butyl acrylate in the standard formulation with a series of linear alkyl acrylates ranging from C2 to C12, without modifying the overall morphology. Indeed, with monoliths, it is always difficult to separate the effects of changes in the bulk polymer compositions from those caused by changes in the phase separation phenomena during polymerization and resulting in significant changes in the structural monolith properties. The direction of EOF was also changed, without compromising the separation performances, by using monomers of the opposite charge. This study clearly demonstrated that this conduct-as-cast monolithic approach is highly efficient and versatile. Moreover, a preliminary high-efficiency separation of PAHs in the microchannel of a chip was also shown but still needed further optimization.

Highly efficient acrylate-based monoliths were next optimized and more than 300 000 plates/m were obtained with 5 PAHs [95, 96]. The effect of numerous parameters such as the pretreatment step, the irradiation energy involved during photo-polymerization, the hydrophobic monomeric nature and ratio, the percentage of charged monomers, and the composition of the mobile phase (pH, ionic strength, organic solvent nature and content) on the structural and separation properties (EOF values, efficiency, retention factor, and selectivity) of the resulting monoliths was studied.

Photo-initiation can also be involved for sol-gel monolith preparation. Mild temperature conditions, minor polymerization times (min rather than h), and facility of fitting the area of polymerization are the main advantages of sol-gel UV photo-polymerization approach in comparison with the thermo-initiation. Zare et al. described the effects of varying the reaction conditions (i. e., concentration of catalyst (hydrochloric acid) and the ratio of monomer (methacryloxypropyltrimethoxysilane) and porogen (toluene)) on the morphology of the resulting monoliths and their properties for 2 PAH analysis [97]. They also demonstrated the great potential of on-line preconcentration that allowed a relevant increase in the volume of sample injected without sacrificing column efficiency [98]. This may also be useful to clean up the analytes from possible interfering species initially present in the sample matrix. For neutral analytes, the preconcentration mechanism was based on an increase in the organic solvent ratio between mobile phase and sample matrix. Thanks to the high porosity or the low flow resistance of the photopolymerized sol-gel monolith, it was possible to introduce increasing volume of sample in a rather effortless manner. For the first time in CEC, the injection of a sample volume superior to the total capillary volume (356 %) was demonstrated. Pyrene peak height was thus improved 1104 times. The limiting factor was the decrease in solubility for the hydrophobic analytes like PAHs in sample matrix with the increase in the non-eluting solvent content. Nevertheless, it opened great opportunities for trace analysis.

Both previous studies described the use of sol-gel UV photo-polymerization approach within polyimide-coating capillaries, requiring the stripping of the coating where the sol-gel must be made. However, this coating removal is undesirable because uncoated areas are highly fragile. This is why it is more interesting to use fused-silica capillaries having a UV transparent external coating. Polyacrylate-coated capillaries were thus preferred for the optimization of a sol-gel monolith through a fractional factorial experimental design [99]. The use of this multivariate tool allows more comprehensive understanding of the investigated system through simultaneous evaluation of variables combined with a reduced number of experiments, that results in lower spending of reagents, solvents and laboratory time. It also allows the determination of optimal polymerization conditions, which should be barely the case in literature where most of the studies report univariate methods, where each variable of the system is investigated separately, while the others are held constant, and does not permit the study of the interaction effects. As monolith synthesis always involves numerous parameters as we have discussed until here, the univariate approach may preclude from finding the real fully optimal conditions and should be more often replaced by multivariate methodology.

The experimental design was carried out with 4 factors: the toluene to monomer (methacryloxypropyltrimethoxysilane) ratio, the initiator to monomer ratio, the water to monomer ratio, and the UV radiation time. The monitored response was the number of separated peaks of a mixture of thiourea and 5 PAHs, with given separation conditions. After optimization of the polymerization conditions, the resulting monolith led to efficiencies up to 51 500 plates/m.

In contrast with thermal- and photo-initiation, an alternative approach was developed for the synthesis of methacrylate-based monoliths on the basis of a free radical polymerization process initiated by strong inorganic acid (HNO_3 , H_2SO_4 or HCl) [100]. This allowed a facile preparation of monolithic beds at room temperature, without the need for high temperature, UV radiation, γ -irradiation, electrobeam irradiation and more expensive initiator such as azobisisobutyronitrile (AIBN). Some key factors for polymerization were investigated (polymerization solvent, amount and nature of inorganic acid or reaction time), and the first results were encouraging as the column-to-column and batch-to-batch reproducibilities for the prepared monoliths were similar to the results obtained for thermal- and photo-initiation. Nevertheless, low efficiency values, between 77 000 and 112 000 plates/m, were obtained for the 4 tested PAHs. Further optimization is still required.

Some authors succeeded in improving the selectivity of the monolithic stationary phase for PAH separation by using a new cross-linker, the bisphenol A dimethacrylate, copolymerized with benzylmethacrylate, in order to promote π - π interactions [101]. 6 PAHs were fully

separated in less than 28 min with a 10-cm length column and an ACN – 2 mM phosphate buffer pH 7 (6/4) mobile phase, whereas it was not the case with the monolith synthesized with the classical EDMA, even with a longer effective length of 20 cm. This could be an excellent option for the preparation of monolithic stationary phases dedicated to PAH analysis. Another strategy was based on the synthesis of mixed ligand monoliths [102]. In that case, one ligand offered purely hydrophobic interactions, whereas the second ligand offered, in addition to hydrophobic interactions, π - π interactions. The resulting monolith provided unique selectivity that was not achievable by a single ligand monolith. Octadecyl acrylate and 2-naphthyl methacrylate monomers were used with different ratios, with the cross-linker trimethylolpropane trimethacrylate at fixed composition in the presence of a ternary porogenic solvent (cyclohexanol, ethylene glycol, and water). Applications to the separation of a standard mixture of 5 PAHs and 5 alkyl benzenes demonstrated that it was possible to tune the selectivity. With the same idea of adding π - π interactions, ionic liquid (IL) containing an imidazole ring was bonded to a silica monolith [103]. The column was synthesized within two steps: (i) the co-condensation of (3-chloropropyl) trimethoxysilane and TMOS, and (ii) the chemical covalent bonding of N-methylimidazole. The IL ring provided a reversed EOF in acidic pH for CEC and an increase in retention by comparison with the stationary phase obtained after the co-condensation step without further IL bonding.

Recently, Wang and Yan developed monolithic columns incorporating graphene oxide (GO) nanosheets [104]. Indeed, GO, a chemically modified graphene, is attractive as stationary phase for CEC, especially for PAH separation, because it provides (i) ionized oxygen-containing functional groups, such as epoxide, hydroxyl, and carboxylic acid, for EOF generation, (ii) giant aromatic macromolecule for hydrophobic and π - π interactions, and (iii) ultra-high specific surface area ($> 2\,000\text{ m}^2\text{ g}^{-1}$). As it is not straightforward to pack nano-thickness GO in column format or to fabricate uniform separation matrix, GO was successfully incorporated in a methacrylate-based monolith (MAA-EDMA) by polymerization at room temperature via a strong inorganic acid initiation. Higher EOF and retention factors for tested PAHs demonstrated the feasibility of this new approach.

GO nanosheets were next evaluated by a second group for OT-CEC of PAHs [105]. They were immobilized onto the capillary wall using 3-aminopropyltriethoxymethyl silane as coupling agent. After hydrazine reduction, a second kind of column was obtained, the graphene coated ones. Both were tested for EOF measurement and CEC separation. The GO-coated capillary provided lower EOF mobility than bare silica, with a constant value for pH ranging from 3 to 9, whereas the graphene-coated column had the lowest EOF mobility, increasing from pH 3 to pH 6, and next staying constant. The first measurements of OT-CEC separation performances were quite disappointing, with significant asymmetry factors (strong

peak tailing) for the 2 tested compounds (naphthalene and biphenyl) on both kinds of columns; and with very low efficiencies for graphene-coated column (<14 100 plates/m) whereas they are acceptable for GO-coated capillary (between 51 000 and 110 000 plates/m for naphthalene with a mobile phase containing between 30 and 50 % of methanol, respectively). Good stability and long lifetime were obtained, but more investigations are still required to definitively conclude about the interest of this new material for CEC or OT-CEC applications.

Nanoparticles, and especially gold nanoparticles (GNPs), are recent new tools and their potential for analytical sciences are under investigation. Indeed, Kasicka et al. for the first time studied the use of bare GNPs immobilized on a sol-gel silica pretreated fused-silica capillary wall for the OT-CEC separation in reversed-phase mode of 4 PAHs [106]. Preliminary results showed an increase in retention for 4 PAHs when GNPs are immobilized onto the sol-gel obtained by condensation of (3-mercaptopropyl)trimethoxysilane.

To summarize what it can be found in the literature for CEC separation of PAHs, it appears that PAH mixtures are often employed to characterize the CEC performance of the stationary phase, packed- or monolithic-based ones. Nevertheless, very few papers dealt with applications with real samples, but for soil extracts [85] or lake water [107]. Unfortunately, this last application was not very impressive as the lake water samples were spiked with 6 PAHs at levels superior to their own solubility in water. This is why there is still need for significant efforts to develop this application area for CEC, whereas some already monolithic stationary phases featuring high efficiency and/or high selectivity seem to be ready for use.

3. Analysis of PAHs in electrophoretic microsystems

The development of CE-microchips is gaining in interest owing to the numerous advantages they offer: high degree of integration, portability, mass-production, all this together with low solvent/reagent consumption, high speed, and low cost. Since the birth of the μ TAS or “lab-on-a-chip” concept, bioanalytical and clinical analyses have been the most popular fields for their application. However, environmental monitoring, forensic investigation, and food analysis are becoming significant analytical areas in which analytical microsystems will have a prominent role. Table I-II-3 details the methods published in the literature for the determination of PAHs in CE-microchip, highlighting the PAH mixture, separation mode, chip features, BGE, detection modes, and analysis time. In microchips, PAHs have been mainly separated by reversed-phase CEC or CD-CZE but, to our knowledge, never by MEKC. The chips involved were generally made of glass but, in some studies, quartz and cyclo-olefin

copolymer (COC) materials have also been used. Cross-injector design is the most widely used, even if some authors also evaluated double-T design to locate the stationary phase in the twin tee cross-section [108] and single channel design with two reservoirs only for simple direct injection process [109]. It is worthy of note that, in most cases, the developments of separation methods were first performed in the capillary format and then transferred to the chip format. Moreover, especially for CEC applications, PAHs were usually used as model compounds for probing reversed-phase chip CEC performance since they are uncharged and do not undergo reactions at the electrode. Consequently, the state of the art of CE chip for PAH analysis is characterized by a lack of real-world applications. As described below, only one newly designed CE chip integrating the electrical, optical, and microfluidic systems was developed to answer a real need to analyze PAHs and was therefore applied to environmental samples such as water from lake and hydrothermal vent chimney samples [43, 45].

3.1 Microchip based electrochromatography

Ramsey et al. integrated on-chip sample filtration, preconcentration, and open-channel CEC (OT- μ CEC) with solvent programming for the determination of PAHs [42]. The solid particles in the samples were filtered by an array of seven channels each 1 μ m deep and 18 μ m wide at the inlet reservoir (Figure I-II-8). PAH preconcentration and separation were performed into the C₁₈-coated CEC channel, and elution was achieved under isocratic, step, or linear gradient conditions. The concentration step enhanced the signals by factors of up to 400. Four PAHs were baseline resolved in 50 s. PAHs were excited at 325 nm using a He-Cd laser, and fluorescence emitted was detected above 350 nm, leading to LODs between 1 and 17 nM for a 20-s concentration time.

Gijs et al. developed a C₈-OT- μ CEC based on glass chip via sol-gel technique (tetraethoxysilane and octyltriethoxysilane as monomers) [110]. They produced stationary phase, which contained silanol groups for EOF and C8 groups for hydrophobic interactions. Three light PAHs (NPH, PHE, PYR) were separated in 6.5 min.

Similarly to conventional CEC, considering that monolith-channel CEC (m- μ CEC) has a higher phase ratio and capacity than OT- μ CEC, several studies reported the development of m- μ CEC devices for PAH analysis [44, 108, 109, 111, 112].

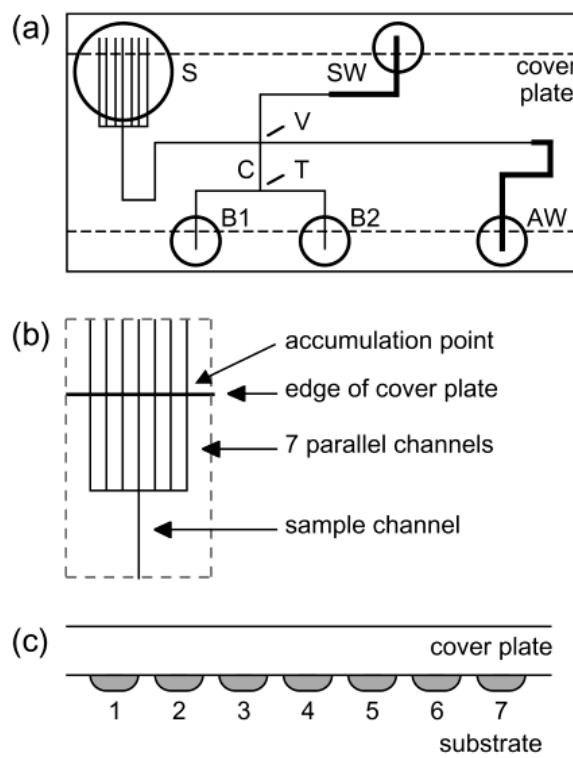


Figure I-II-8. (A) Schematics of the microchip for sample filtration, concentration, and separation. B1: buffer with 20 % (v/v) ACN, B2: buffer with 60 % (v/v) ACN, (S) sample, (SW) sample waste, (AW) analysis waste, (T) T-intersection, and (V) valve. (B) Expanded view and (C) cross section of the filter element (with permission [42]).

As already said, in capillary format, the two methods commonly used to initiate the polymerization are heat and UV radiation. By avoiding the use of elevated temperatures and defining the regions where the monolith is synthesized, UV initiation is therefore more adapted to the synthesis of monoliths in chips. Shepodd et al. developed the first photo-initiated m- μ CEC [94]. Using acrylate as a monomer, they were able to polymerize a monolith *in situ* in a chip in 5 to 20 min using UV radiation. The performance of such monolith was then evaluated in terms of separation efficiency, dispersion, and reproducibility for on-chip reversed-phase CEC of PAHs [44]. On this m- μ CEC device, microfabricated with an optimized casting process, a successful separation of 10 out of 13 PAHs was performed in 900 s with average number of plates per meter of 200 000. However, over 5 successive injections, peak heights decreased by about 90 %, thus proving reproducibility problems which were attributed to oxygen quenching. This problem was solved by improving sealing of the reservoirs.

An acrylate-based monolith was synthesized within a commercial borosilicate glass chip for both separation and preconcentration of PAHs [111]. Prior to polymerization, the channel surface was vinylized with 3-(trimethoxysilyl)propyl methacrylate to ensure covalent attachment of the monolith to the channel walls. Then, channels were filled with a

polymerization mixture similar to that reported previously, i.e. composed of hexyl acrylate (monomer), 1,3-butanediol diacrylate (cross-linker), AMPS (EOF promoter), AIBN (initiator), and porogen solvents (ACN, EtOH and phosphate buffer, pH 7.2) before being irradiated with UV light for *in situ* polymerization. Good efficiencies ranging from 130 000 to 200 000 plates/m were obtained for the separation of 3 PAHs. A 200-fold enrichment was achieved with only 60 s as preconcentration time using gated injection. This system was further optimized by the same group, resulting in a baseline separation of 5 PAHs, composed from 3 to 5 rings, in 200 s (Figure I-II-9) [108]. By applying a 120 s preconcentration time, a signal enhancement factor (baseline-corrected peak height of preconcentrated PAH divided by that obtained with a pinched injection of the same sample) of 270 was obtained.

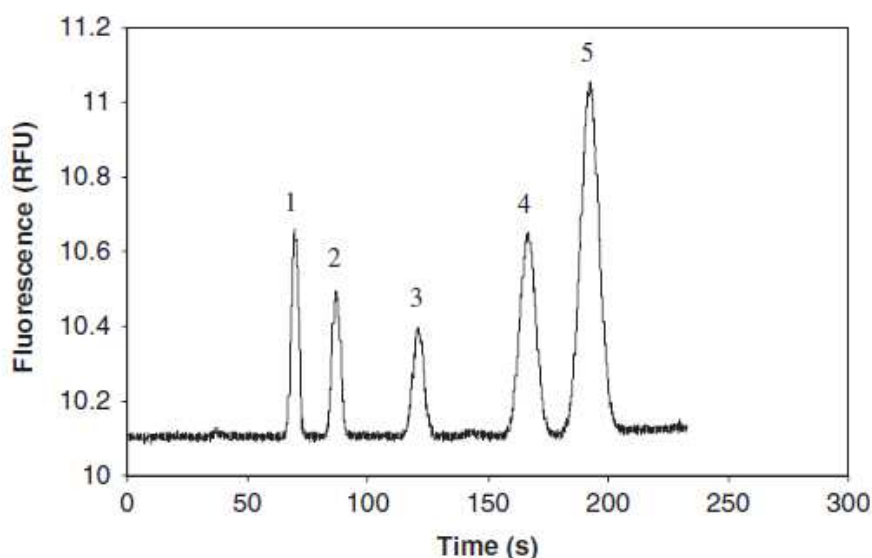


Figure I-II-9. Preconcentration and CEC separation of 5 PAHs on a monolithic hexyl-acrylate based stationary phase. (1) ANT, (2) FA, (3) BaA, (4) BkFA, (5) BaP (with permission [108]).

Given the well-known advantages of COC material such as easy machining by hot embossing, durability, transparency over a wide range of wavelengths, and inertness towards most organic solvents, an acrylate monolith was synthesized into a COC chip for the reversed-phase electrochromatographic separation of PAHs [112]. To suit the hydrophobic material, polymerization formulation was based on lauryl acrylate (monomer), EDMA (cross-linker), AMPS (EOF promoter), benzoin methyl ether (initiator), and porogen solvents (MeOH and 2-propanol). For covalent attachment of this monolith to the plastic walls of the channels, COC surface was functionalized using UV-grafting technique. Five PAHs were baseline resolved in less than 10 min and the Van Deemter curves exhibited relatively good electrochromatographic performances with plate heights as low as 12 μm at optimal velocity, corresponding to 85 000 plates/m. On a run-to-run basis, satisfactory repeatability was

observed with RSD below 2 % in terms of migration time and around 10 % in terms of efficiency over 10 analyses. However, as regards reproducibility of the microsystem fabrication and the *in situ* monolith synthesis, although retention factors were reproducible between chips, poor reproducibility was noticed for efficiencies. These reproducibility issues were mainly due to the presence of volatile MeOH in the polymerization mixture. Consequently, two years later, a formulation based on 1-propanol and 1,4-butanediol as non-aqueous porogens was proposed by the same group [109]. Using these polymerization conditions, improved chip-to-chip reproducibility was achieved with RSD below 5 % and 8 % for retention times and efficiencies, respectively.

3.2 Microchip based cyclodextrin-modified capillary zone electrophoresis

The first portable microchip was the single-channel Mars Organic Analyzer (MOA) that was developed by Mathies et al. in 2005 [113]. First developed for amino acids analysis on Mars [114], the MOA was then adapted to analyze PAHs from laboratory standards and real-world samples by the same group [43]. Indeed, the search for signs of life on extraterrestrial planetary bodies is among NASA's top priorities in Solar System exploration. Pursuit of organics and biomolecules as evidence of past or present life demands *in situ* investigations of planetary bodies. Compounds targeted were not only those involved in the origin of life on Earth but also those considered essential for terrestrial biology: amino acids, amines, thiols and thioesters, biopolymers, aldehydes, ketones, carboxylic acids, fatty acids and fatty alcohols, and PAHs. The analysis of PAHs in terrestrial and extraterrestrial environments is important because of their resistance to oxidative and photochemical degradation. As PAHs can be produced via abiotic reactions, both in space and through planetary geological activity, they have been found throughout the universe, specifically in carbonaceous chondrite meteorites, Martian meteorites, interplanetary dust particles, and interstellar matter. The MOA integrates high voltage power supplies, optics to perform microchip capillary electrophoretic separations coupled to LIF detection and all the pneumatics for on-chip fluidic manipulation (Figure I-II-10). The core processor is a four-layer microfluidic chip that performs CE analyses. A 404 nm diode laser was used as excitation source whereas resulting fluorescence was collected by a photomultiplier tube (PMT) placed after a long-pass filter. Microfluidic devices were made of glass owing to its numerous advantages stated above but also for its compatibility with planetary protection and contamination control procedures used to ultrastereilize spacecraft probes and instruments but also its high mechanical strength.

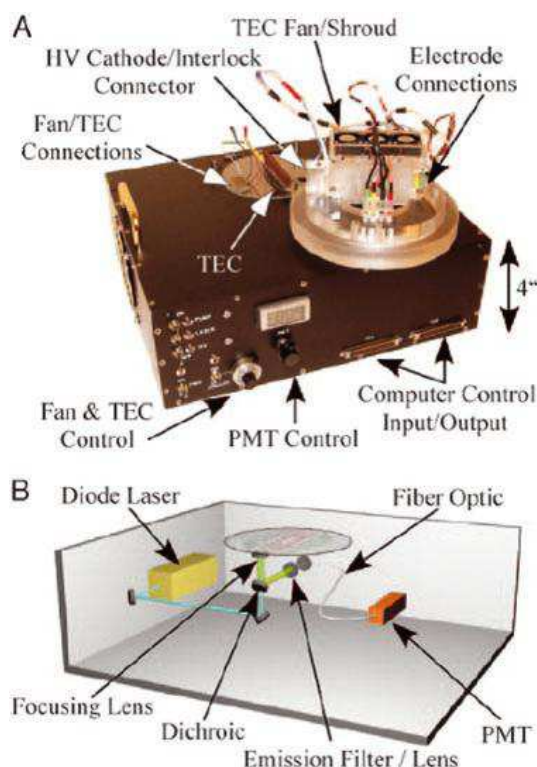


Figure I-II-10. The Mars Organic Analyzer, a portable CE-microchip instrument. The instrument houses a bank of 16 solenoids for pneumatic control of microfluidic devices and a stationary optical system with a PMT for LIF detection (with permission [115]).

For PAH separation, previous CD-CZE methods which were developed in the capillary format were transferred to the chip format. CD nature and ratio were optimized, resulting in a BGE consisting of 10 mM SBE- β -CD, 40 mM Me- β -CD, 5 mM carbonate buffer at pH 10. Under these conditions, 9 PAHs, mainly composed of 5 or 6 aromatic rings, were baseline separated in 300 s (Figure I-II-11) with LODs ranging from 2000 mg/L to 6 μ g/L. Finally, this method was successfully applied to the analysis of environmental and Martian analogue samples, proving the capability of the MOA to analyze PAHs in real world samples.

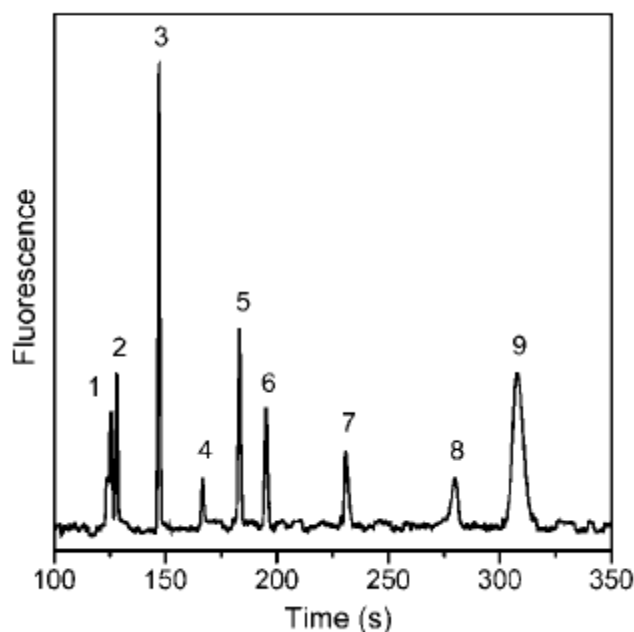


Figure I-II-11. Separation of the Mars 9 PAH mixture using the MOA instrument. (1) 9,10-diphenylANT, (2) dibenzo[b,def]CHR, (3) ANT, (4) anthanthrene, (5) BaP, (6) BjFA, (7) FA, (8) perylene, (9) benzo[ghi]FA (with permission [43]).

A similar instrument but with additional functionality, the Multichannel Mars Organic Analyzer (McMOA) was later developed in the same lab [45]. In this case, the detection optics were designed so that the objective is mounted on a linearly translating stage allowing the detection in several channel locations. A CCD spectrometer for fluorescence spectral measurement is used instead of a PMT, allowing multi-wavelength detection while maintaining similar sensitivities. Moreover, the high voltage power supply allows to drive electrophoresis in up to eight individual channels independently. The McMOA was used to identify the unique fluorescence spectra of 9 PAHs (Figure I-II-12) and then applied to the analysis of a sediment sample from Lake Erie. The presence of BaP and perylene in such samples was confirmed, and a peak co-migrating with anthanthrene was disqualified based on spectral analysis, thus demonstrating the utility of spectral analysis for PAH identification in complex real samples.

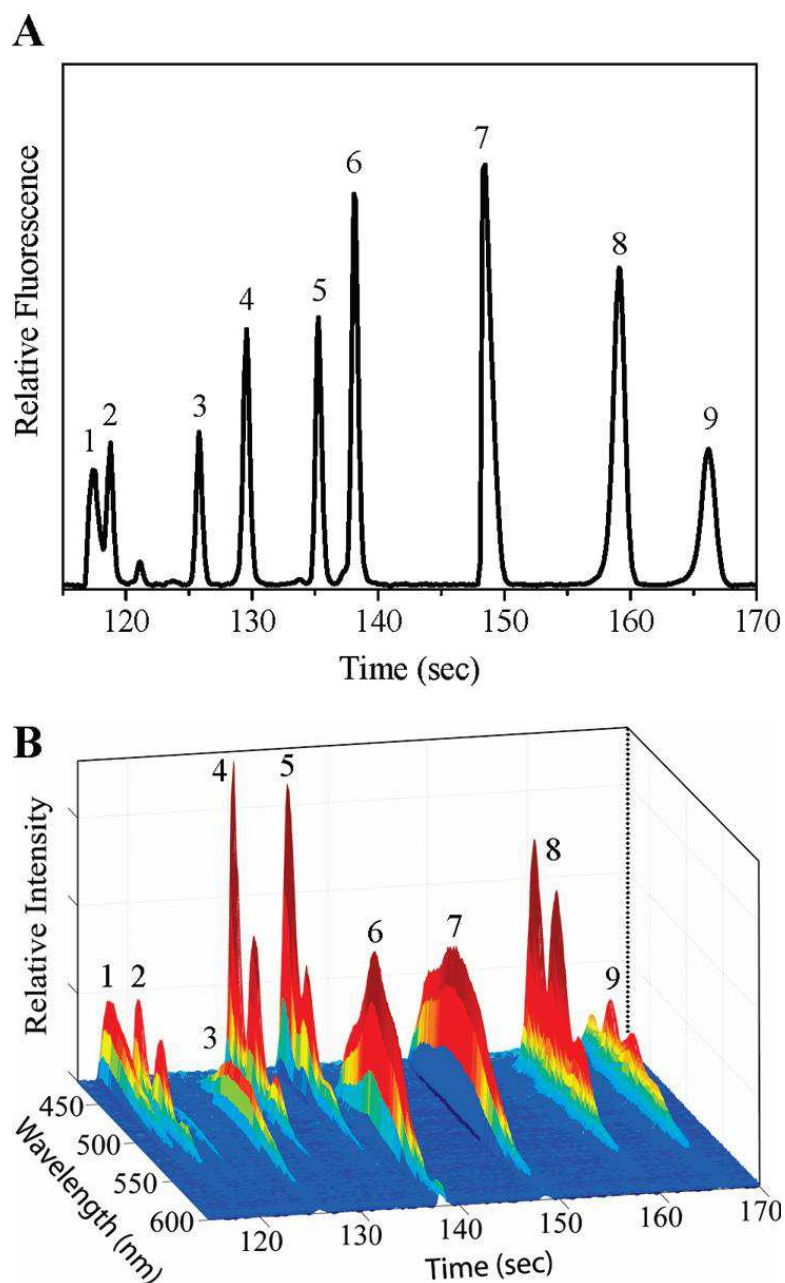


Figure I-II-12. Real-time spectral analysis and separation of PAHs on the Multichannel Mars Organic Analyzer. (A) Electrophoretic separation with standard optical detection and integration of emission between 420 and 600 nm. (B) Real-time 3D fluorescence spectroscopic analysis mode. Peak identification: see Figure I-II-11 (with permission [45]).

Table I-II-3. Analysis of PAHs by chip electrophoresis

PAHs	Separation mode	Chip features	BGE	Detection	Analysis time (s)	Ref.
ANT, PYR, 1,2-benzoFLR, BaP	OT-CEC C ₁₈	Quartz Simple-cross Integrated filter	Gradient: 10 mM Tris (pH 8.2) with 52 % (v/v) ACN for 10 s and 56 % (v/v) ACN until the end of the analysis	LIF (λ_{exc} : 325 nm, λ_{em} > 350 nm)	50	[42]
NPH, PHE, PYR	OT-CEC C ₈	Glass Simple-cross Compatible with Beckman P/ACE 5500 system CE-DAD	5 mM NaCl, 50 % (v/v) ACN	UV 280 nm	390	[110]
16 HAP US-EPA except DBaH, BghiP, and IP	CEC Acrylate-based monolith	Glass Simple-cross or double-T	20 mM Tris (pH 8.5), 80 % (v/v) ACN	LIF (λ_{exc} : 257 nm, λ_{em} > 260 nm)	900	[44]
FA, BaA, BkFA	CEC Acrylate-based monolith	Glass Simple-cross	5 mM phosphate buffer (pH 6.8), 80 % (v/v) ACN	Fluorescence detection (λ_{exc} : 310-390 nm, λ_{em} > 420 nm)	600	[111]
ANT, FA, BaA, BkFA, BaP	CEC Acrylate-based monolith	Glass Simple-cross or double-T	8.75 mM phosphate buffer (pH 7.2), 80 % (v/v) ACN	Fluorescence detection (λ_{exc} : 310-390 nm, λ_{em} > 420 nm)	200	[108]
ANT, FA, PYR, BaA, Pe	CEC Acrylate-based monolith	COC Simple-cross	10 mM Tris buffer (pH 7.4), 80 % (v/v) ACN	Fluorescence detection (λ_{exc} : 330 nm, λ_{em} : N/A)	540	[112]
ANT, FA, PYR, BaA, Pe	CEC Acrylate-based monolith	COC Simple-cross or single channel	2 mM phosphate buffer-5 mM lithium dodecyl sulfate, 70 % (v/v) ACN	Fluorescence detection (λ_{exc} : 330 nm, λ_{em} : N/A)	480	[109]
9,10-diphenylANT, dibenzo[b,def]CHR, ANT, anthanthrene, BaP, BjFA, FA, Pe, benzo[ghi]FA	CD-CZE	Glass Simple-cross	5 mM carbonate buffer (pH 10), 10 mM SBE- β -CD, 40 mM Me- β -CD	LIF (λ_{exc} : 404 nm, λ_{em} > 425 nm)	300	[43]

CD: cyclodextrin, CD-CZE: CD-modified capillary zone electrophoresis, COC: cyclo-olefin copolymer, DAD: diode array detection, Me- β -CD: methyl- β -CD, N/A: information is not available, PAH: polycyclic aromatic hydrocarbon, SBE- β -CD: sulfobutyl ether- β -CD, Tris: tris(hydroxymethyl)aminomethane.

4. Conclusion

This review clearly demonstrates that CE is definitely an interesting alternative to chromatographic methods for PAH analysis. CD-modified CZE and CEC are the two successful approaches. Indeed, MEKC shows important limitations due to the high hydrophobicity of the targeted compounds, especially heavy PAHs belonging to the 15+1 EU priority list for food applications. In that case, high percentages of solvent in BGE are required for PAH solubility and repeatability of the analysis (reduction of PAH wall adsorption), which results in high surfactant contents, and consequently long analysis time and low selectivity. The addition of CDs is not even sufficient to counter-balance these drawbacks.

Besides, the use of an appropriate dual CD mixture in CZE allows the simultaneous separation of the two lists of priority PAHs: the 16 US-EPA PAHs and the 15+1 EU priority PAHs. Finally, these CD-CZE methods have been successfully applied to the separation of 19 PAHs from edible oil extracts, proving their suitability for real world sample analysis. New application examples are now expected to emphasize the development of these methods in routine laboratories. At the same time, CEC has shown impressive performances with some stationary phases, both packed- or monolithic-based phases. This technique is still in its infancy concerning real applications for PAH separations, but the future is promising. Both CD-CZE and monolith-based CEC offers the additional advantage of an easier transfer to chip format. Several papers have recently illustrated the great potential of this new technology for PAH determination.

References

- [1] T. McGrath, R. Sharma, M. Hajaligol, *Fuel* 80 (2001) 1787-1797.
- [2] S.G. Wakeham, C. Schaffner, W. Giger, *Geochim. Cosmochim. Acta* 44 (1980) 403-413.
- [3] M. Rojas, B. Marie, J.M. Vignaud, N. Martinet, J. Siat, G. Grosdidier, I. Cascorbi, K. Alexandrov, *Cancer Lett.* 207 (2004) 157-163.
- [4] European Commission, Opinion of the Scientific Committee on Food on the Risks to Human Health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food SCF/CS/CNTM/PAF/29/Final, 4 December 2002.
- [5] IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol. 3, International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon/World Health Organization (WHO), Geneva, 1973.
- [6] IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol. 32, International Agency for Research on Cancer (IARC), World Health Organization (WHO), Lyon, 1983.
- [7] IARC, Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks of Chemicals to Humans, Overall evaluation of carcinogenicity: An updating of IARC Monographs, vol.1 to 42, Supplement 7, International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon, 1987.
- [8] United States Environmental Protection Agency, Appendix A to 40 CFR Part 423, Available on: <http://www.epa.gov/region1/npdes/permits/generic/prioritypollutants.pdf>.
- [9] European Union, Commission Recommendation 2005/108/EC, Off. J. Eur. Comm. L34 (2005) 43.
- [10] Polycyclic aromatic hydrocarbons, scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain, EFSA J. 724 (2008) 1.
- [11] Summary and Conclusions of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, in: Sixty-Fourth meeting, Rome, 2005 (JECFA/64/SC).
- [12] European Union (EU), Commission Recommendation (EC) No 835/2011, Off. J. Eur. Union L215 (2011) 4.
- [13] W. Moreda, M.C. Pérez-Camino, A. Cert, *J. Chromatogr. A* 936 (2001) 159-171.
- [14] S. Moret, L.S. Conte, *J. Chromatogr. A* 882 (2000) 245-253.
- [15] P. Plaza-Bolaños, A.G. Frenich, J.L.M. Vidal, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 6303-6326.
- [16] D. Poster, M. Schantz, L. Sander, S. Wise, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 859-881.
- [17] O.S. Fatoki, B.J. Ximba, B.O. Opeolu, *Fresenius Environ. Bull.* 20 (2011) 2012-2020.
- [18] G. Purcaro, S. Moret, L.S. Conte, *Talanta* 105 (2013) 292-305.
- [19] B.H. Chen, C.Y. Wang, C.P. Chiu, *J. Agric. Food. Chem.* 44 (1996) 2244-2251.
- [20] S. Danyi, F. Brose, C. Brasseur, Y.-J. Schneider, Y. Larondelle, L. Pussemier, J. Robbens, S. De Saeger, G. Maghuin-Rogister, M.-L. Scippo, *Anal. Chim. Acta* 633 (2009) 293-299.
- [21] K. Dost, C. Ideli, *Food Chem.* 133 (2012) 193-199.
- [22] A. Barranco, R.M. Alonso-Salces, A. Bakkali, L.A. Berrueta, B. Gallo, F. Vicente, M. Sarobe, *J. Chromatogr. A* 988 (2003) 33-40.
- [23] V.G. Zuin, L. Montero, C. Bauer, P. Popp, *J. Chromatogr. A* 1091 (2005) 2-10.
- [24] M. João Ramalhosa, P. Paíga, S. Morais, C. Delerue-Matos, M.B. Prior Pinto Oliveira, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 3529-3538.
- [25] ISO 15302. Animal and vegetable fats and oils. Determination of benzo(a)pyrene content. Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography Method (2007).
- [26] ISO 15753. Animal and Vegetable Fats and Oils - Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (2006).
- [27] ISO 22959. Animal and Vegetable Fats and Oils - Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by on-line Donor Acceptor Complex Chromatography and HPLC with Fluorescence Detection (2009).
- [28] ISO 17993. Water Quality Determination of 15 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water by HPLC with Fluorescence Detection After Liquid-Liquid Extraction (2002).
- [29] ISO 7981-2. Water Quality Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Part 2: Determination of Six PAH by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection After Liquid-Liquid Extraction (2005).
- [30] Environmental Protection Agency (EPA). Method 610-Polynuclear Aromatic Hydrocarbons
- [31] M. Amzad Hossain, S.M. Salehuddin, *Arabian J. Chem.* 5 (2012) 391-396.
- [32] S. Wu, W. Yu, *Food Chem.* 134 (2012) 597-601.
- [33] P. Mottier, V. Parisod, R.J. Turesky, *J. Agric. Food. Chem.* 48 (2000) 1160-1166.
- [34] J.K. Houessou, C. Delteil, V. Camel, *J. Agric. Food. Chem.* 54 (2006) 7413-7421.
- [35] N. Barco-Bonilla, R. Romero-González, P. Plaza-Bolaños, J.L. Fernández-Moreno, A. Garrido Frenich, J.L. Martínez Vidal, *Anal. Chim. Acta* 693 (2011) 62-71.
- [36] N.W. Frost, M. Jing, M.T. Bowser, *Anal. Chem.* 82 (2010) 4682-4698.

- [37] M. Geiger, A.L. Hogerton, M.T. Bowser, *Anal. Chem.* 84 (2012) 577-596.
- [38] A. Manz, N. Graber, H.M. Widmer, *Sens. Actuators, B* 1 (1990) 244-248.
- [39] A. Manz, D.J. Harrison, E.M.J. Verpoorte, J.C. Fetting, A. Paulus, H. Lüdi, H.M. Widmer, *J. Chromatogr. A* 593 (1992) 253-258.
- [40] A. Ríos, A. Escarpa, M.C. González, A.G. Crevillén, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 467-479.
- [41] A. Martín, D. Vilela, A. Escarpa, *Electrophoresis* 33 (2012) 2212-2227.
- [42] B.S. Broyles, S.C. Jacobson, J.M. Ramsey, *Anal. Chem.* 75 (2003) 2761-2767.
- [43] A.M. Stockton, T.N. Chiesl, J.R. Scherer, R.A. Mathies, *Anal. Chem.* 81 (2009) 790-796.
- [44] Y. Fintschenko, W.-Y. Choi, S. Ngola, T. Shepodd, *Fresenius J. Anal. Chem.* 371 (2001) 174-181.
- [45] M. Benhabib, T.N. Chiesl, A.M. Stockton, J.R. Scherer, R.A. Mathies, *Anal. Chem.* 82 (2010) 2372-2379.
- [46] S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, *Anal. Chem.* 56 (1984) 111-113.
- [47] S. Terabe, K. Otsuka, T. Ando, *Anal. Chem.* 57 (1985) 834-841.
- [48] S.E. Deeb, M.A. Iriban, R. Gust, *Electrophoresis* 32 (2011) 166-183.
- [49] M.T. Bowser, A.R. Kranack, D.D.Y. Chen, *Trends Anal. Chem.* 17 (1998) 424-434.
- [50] G. Kavran, F.B. Erim, *J. Chromatogr. A* 949 (2002) 301-305.
- [51] Y. Shi, J.S. Fritz, *Anal. Chem.* 67 (1995) 3023-3027.
- [52] O. Brüggemann, R. Freitag, *J. Chromatogr. A* 717 (1995) 309-324.
- [53] M.-M. Hsieh, Y.-C. Kuo, P.-L. Tsai, H.-T. Chang, *J. Chromatogr. A* 924 (2001) 397-405.
- [54] X. Fu, J. Lu, Y. Chen, *Talanta* 46 (1998) 751-756.
- [55] H. Ren, X. Li, M. Qi, C. Stathakis, N.J. Dovichi, *J. Chromatogr. A* 817 (1998) 307-311.
- [56] C.P. Palmer, S. Terabe, *Anal. Chem.* 69 (1997) 1852-1860.
- [57] J.T. Koch, B. Beam, K.S. Phillips, J.F. Wheeler, *J. Chromatogr. A* 914 (2001) 223-231.
- [58] W. Ding, J.S. Fritz, *Anal. Chem.* 69 (1997) 1593-1597.
- [59] W. Ding, J.S. Fritz, *Anal. Chem.* 70 (1998) 1859-1865.
- [60] S.A. Shamsi, C. Akbay, I.M. Warner, *Anal. Chem.* 70 (1998) 3078-3083.
- [61] C. Akbay, I.M. Warner, S.A. Shamsi, *Electrophoresis* 20 (1999) 145-151.
- [62] J.L. Miller, M.G. Khaledi, D. Shea, *Anal. Chem.* 69 (1997) 1223-1229.
- [63] P.G. Muijselaar, H.B. Verhelst, H.A. Claessens, C.A. Cramers, *J. Chromatogr. A* 764 (1997) 323-329.
- [64] Y. Walbroehl, J.W. Jorgenson, *Anal. Chem.* 58 (1986) 479-481.
- [65] T. Kaneta, T. Yamashita, T. Imasaka, *Anal. Chim. Acta* 299 (1995) 371-375.
- [66] Y. Shi, J.S. Fritz, *J. High. Resolut. Chromatogr.* 17 (1994) 713-718.
- [67] E.S. Ahuja, J.P. Foley, *J. Chromatogr. A* 680 (1994) 73-83.
- [68] R.O. Cole, M.J. Sepaniak, W.L. Hinze, J. Gorse, K. Oldiges, *J. Chromatogr. A* 557 (1991) 113-123.
- [69] S. Terabe, Y. Miyashita, O. Shibata, E.R. Barnhart, L.R. Alexander, D.G. Patterson, B.L. Karger, K. Hosoya, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A* 516 (1990) 23-31.
- [70] S. Terabe, Y. Miyashita, Y. Ishihama, O. Shibata, *J. Chromatogr. A* 636 (1993) 47-55.
- [71] B. Jiménez, D.G. Patterson, J. Grainger, Z. Liu, M.J. González, M.L. Marina, *J. Chromatogr. A* 792 (1997) 411-418.
- [72] C. Akbay, S.A. Shamsi, I.M. Warner, *J. Chromatogr. A* 910 (2001) 147-155.
- [73] M.J. Sepaniak, C.L. Copper, K.W. Whitaker, V.C. Anigbogu, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2037-2041.
- [74] O.H.J. Szolar, R.S. Brown, J.H.T. Luong, *Anal. Chem.* 67 (1995) 3004-3010.
- [75] R.S. Brown, J.H.T. Luong, O.H.J. Szolar, A. Halasz, J. Hawari, *Anal. Chem.* 68 (1996) 287-292.
- [76] A.-L. Nguyen, J.H.T. Luong, *Anal. Chem.* 69 (1997) 1726-1731.
- [77] L. Ferey, N. Delaunay, D.N. Rutledge, C.B.Y. Cordella, H. This, A. Huertas, Y. Raoul, P. Gareil, *Talanta*, submitted.
- [78] L. Ferey, N. Delaunay, D.N. Rutledge, A. Huertas, Y. Raoul, P. Gareil, *J. Vial, J. Chromatogr. A* 1302 (2013) 181-190.
- [79] L. Ferey, N. Delaunay, D.N. Rutledge, A. Huertas, Y. Raoul, P. Gareil, *J. Vial, I. Rivals, Anal. Chim. Acta*, submitted.
- [80] J.H. Knox, I.H. Grant, *Chromatographia* 32 (1991) 317-328.
- [81] C. Yan, R. Dadoo, H. Zhao, R.N. Zare, D.J. Rakestraw, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2026-2029.
- [82] C. Yan, R. Dadoo, R.N. Zare, D.J. Rakestraw, D.S. Anex, *Anal. Chem.* 68 (1996) 2726-2730.
- [83] B. Xin, M.L. Lee, *Electrophoresis* 20 (1999) 67-73.
- [84] R. Dadoo, R.N. Zare, C. Yan, D.S. Anex, *Anal. Chem.* 70 (1998) 4787-4792.
- [85] M.G. Garguilo, D.H. Thomas, D.S. Anex, D. J. Rakestraw, *J. Chromatogr. A* 883 (2000) 231-248.
- [86] Q. Tang, B. Xin, M.L. Lee, *J. Chromatogr. A* 837 (1999) 35-50.
- [87] S. Constantin, R. Freitag, *J. Chromatogr. A* 887 (2000) 253-263.

- [88] A.L. Crego, J. Martínez, M.L. Marina, J. Chromatogr. A 869 (2000) 329-337.
- [89] J.-L. Liao, N. Chen, C. Ericson, S. Hjerten, Anal. Chem. 68 (1996) 3468-3472.
- [90] H. Fu, C. Xie, J. Dong, X. Huang, H. Zou, Anal. Chem. 76 (2004) 4866-4874.
- [91] L.J. Sondergeld, M.E. Bush, A. Bellinger, M.M. Bushey, J. Chromatogr. A 1004 (2003) 155-165.
- [92] J.D. Hayes, A. Malik, Anal. Chem. 72 (2000) 4090-4099.
- [93] J.D. Hayes, A. Malik, Anal. Chem. 73 (2001) 987-996.
- [94] S.M. Ngola, Y. Fintschenko, W.-Y. Choi, T.J. Shepodd, Anal. Chem. 73 (2001) 849-856.
- [95] N. Delaunay-Bertoncini, C. Demesmay, J.-L. Rocca, Electrophoresis 25 (2004) 3204-3215.
- [96] M.-P. Barrioulet, N. Delaunay-Bertoncini, C. Demesmay, Electrophoresis (2005) 4104-4115.
- [97] M. Kato, K. Sakai-Kato, T. Toyo'oka, M.T. Dulay, J.P. Quirino, B.D. Bennett, R.N. Zare, J. Chromatogr. A 961 (2002) 45-51.
- [98] J.P. Quirino, M.T. Dulay, R.N. Zare, Anal. Chem. 73 (2001) 5557-5563.
- [99] F.A. Sima Vaz, A. Damasio Moutinho, J.P. Rodrigues Furtado de Mendonça, R. Tavares de Araujo, S.J. Lima Ribeiro, F.C. Polachini, Y. Messaddeq, M.A. Leal de Oliveira, Microchem. J. 100 (2012) 21-26.
- [100] M.-M. Wang, H.-F. Wang, D.-Q. Jiang, S.-W. Wang, X.-P. Yan, Electrophoresis 31 (2010) 1666-1673.
- [101] J. Ou, G.T.T. Gibson, R.D. Oleschuk, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 3628-3634.
- [102] S. Karenga, Z.E. Rassi, Electrophoresis 32 (2011) 1044-1053.
- [103] H. Han, J. Li, X. Wang, X. Liu, S. Jiang, J. Sep. Sci. 34 (2011) 2323-2328.
- [104] M.-M. Wang, X.-P. Yan, Anal. Chem. 84 (2012) 39-44.
- [105] Q. Qu, C. Gu, X. Hu, Anal. Chem. 84 (2012) 8880-8890.
- [106] P. Rezanka, S. Ehala, J. Koktan, D. Sykora, P. Zvatora, M. Vosmanska, V. Kral, I. Miksik, V. Cerovsky, V. Kasicka, J. Sep. Sci. 35 (2012) 73-78.
- [107] J. Tang, T. Bao, Z. Chen, Anal. Methods 4 (2012) 4140-4145.
- [108] G. Proczek, V. Augustin, S. Descroix, M.-C. Hennion, Electrophoresis 30 (2009) 515-524.
- [109] Y. Ladner, G. Crétier, K. Faure, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 8001-8008.
- [110] S. Constantin, R. Freitag, D. Solignac, A. Sayah, M.A.M. Gijs, Sens. Actuators, B 78 (2001) 267-272.
- [111] V. Augustin, G. Proczek, J. Dugay, S. Descroix, M.-C. Hennion, J. Sep. Sci. 30 (2007) 2858-2865.
- [112] K. Faure, M. Albert, V. Dugas, G. Crétier, R. Ferrigno, P. Morin, J.-L. Rocca, Electrophoresis 29 (2008) 4948-4955.
- [113] A.M. Skelley, J.R. Scherer, A.D. Aubrey, W.H. Grover, R.H.C. Ivester, P. Ehrenfreund, F.J. Grunthaner, J.L. Bada, R.A. Mathies, Proc. Nat. Acad. Sci. 102 (2005) 1041-1046.
- [114] A.M. Skelley, R.A. Mathies, J. Chromatogr. A 1021 (2003) 191-199.
- [115] M.F. Mora, A.M. Stockton, P.A. Willis, Electrophoresis 33 (2012) 2624-2638.

CHAPITRE III : Analyse de matrices alimentaires sur microsystemes électrophorétiques (article)

MICROCHIP CAPILLARY ELECTROPHORESIS DEVICES FOR FOOD ANALYSIS

Trends in Analytical Chemistry, submitted in September 2013

Ludivine Ferey^{1,2,3}, Nathalie Delaunay^{1*}, Yann Raoul³, Alain Huertas⁴, Douglas N. Rutledge²

¹Laboratory of Physicochemistry of Electrolytes, Colloids and Analytical Sciences (PECSA), UMR 7195 CNRS/ESPCI ParisTech/UPMC, 75005 Paris, France

²AgroParisTech, UMR 1145, Ingénierie Procédés Aliments, 16 rue Claude Bernard, F-75005 Paris

³Sofiprotéol, 75008 Paris, France

⁴Lesieur, 92600 Asnières sur Seine, France

Keywords: microchip, capillary electrophoresis, food analysis

Abbreviations: **AAs:** amino acids, **BGE:** background electrolyte, **BSA:** bovine serum albumin, **CCD:** charge-coupled device, **C⁴D:** capacitively coupled contactless conductivity detector, **CE:** capillary electrophoresis, **CNT:** carbon nanotube, **CSEID:** class-selective electrochemical index determination, **CSPE:** carbon screen-printed electrode, **Cu(II)-MPS:** copper (3-mercaptopropyl) trimethoxysilane, **CZE:** capillary zone electrophoresis, **ED:** electrochemical detection, **EOF:** electroosmotic flow, **FITC:** fluorescein isothiocyanate, **Fluo:** fluorescence detection, **GM:** genetically modified, **GMO:** genetically modified organisms, **HPLC:** high-performance liquid chromatography, **IAD:** individual antioxidant determination, **IEF:** isoelectrofocusing, **ITP:** isotachophoresis, **LE:** leading electrolyte, **LED:** light emitting diode, **LIF:** laser-induced fluorescence detection, **LOD:** limit of detection, **LOQ:** limit of quantitation, **MEKC:** micellar electrokinetic chromatography, **MFA:** monofluoroacetate, **NBD-F:** 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole, **OPA:** o-phthalaldehyde, **PCR:** polymerase chain reaction, **PCR-RFLP:** PCR-restriction fragment length polymorphism, **PDMS:** polydimethylsiloxane, **PFSG:** programmed field strength gradient, **PMMA:** polymethyl methacrylate, **RT-PCR:** reverse transcription-PCR, **PVA:** poly(vinyl alcohol), **SA:** serum albumin, **SDS:** sodium dodecyl sulfate, **SDS-PAGE:** sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, **SPE:** solid-phase extraction, **μTAS:** micro-total analysis systems, **t-ITP:** transient isotachophoresis.

Abstract

One of the current trends of analytical chemistry is the miniaturization of separation techniques to attain better performance, shorter analysis time, and reduced reagent consumption. Capillary Electrophoresis (CE)-microchips, the first generation of micro-total analysis systems (μTAS), are the most used microsystems in food analysis. The scope of this review is to gather and discuss the different applications of such miniaturized devices in this field. Various analytes of food significance such as natural antioxidants, amino acids, proteins, dyes, vanilla flavours, DNA probes, heavy metals, toxins, allergens etc. have been successfully monitored using CE-microchips, either to assess food quality or to ensure food safety. Also, to approach the high complexity of food matrices and therefore to improve the sensitivity and the selectivity of the analysis, the integration of sample preparation steps onto the chip and the use of new tools from nanotechnology for the detection step have been approached. However, even if the number of studies dealing with complex food samples is increasing, sample preparation is still mainly performed off-chip. Today, the development of real μTAS, integrating all the analytical steps on-chip, is therefore awaited with particular interest in food analysis.

1. Introduction

Since the invention of the transistor in 1947 and the integrated circuit in 1959, the same strategies of miniaturization and functional integration were applied to a broad range of disciplines such as mechanics, optics and chemical analysis. Today, the miniaturization of separation systems represents one of the major developments of analytical chemistry, in order to support its rapid developments and growing interest such as in biotechnology, environmental monitoring, and food safety. Indeed, the field of separation sciences needs constant evolution to meet the social requirements for more and more numerous and complex analyses.

Traditionally, chemical analyses have been performed in specialized laboratories whereas, today, the trend is to move them on site, closer to the place where they need to be performed. Miniaturization plays a key role in their decentralization since smaller, easier to operate, and low-power consumption equipments are needed. Moreover, in laboratories, miniaturization can significantly enhance throughput (short analysis time), minimizing sample and solvent consumption and cost. One key approach for miniaturization is the concept of micro-total analysis system (μ TAS) also called “lab-on-a-chip”, introduced in 1990 by Manz et al. [1]. The term “analytical microsystems” has also been used sometimes. A chip is a structure of about 10 cm² composed of a network of microfluidic channels used to transport liquids within the chip, and which are typically 50-100 μ m wide, 5-20 μ m deep and 1-10 cm long. Ideally, a μ TAS integrates all the analytical steps (sample pretreatment, analyte separation, and detection) onto a single device. Moreover, this technology enables to process several samples in parallel channels into a single automated procedure leading to more analyses per unit of time at a lower cost per analysis [2-5].

Chips can be made from silicon, glass, or plastic. Silicon and glass chips are fabricated using techniques initially developed for microelectronics [6, 7]. This includes deposition of dielectric layers, photolithography, and wet etching or dry reactive ion etching to create microfluidic channels. Polymer-based chips can be obtained using different techniques such as hot embossing, injection molding, and laser ablation [8]. Even if glass chips are the most commonly used owing to their well-known and advantageous chemical and physical properties, microfabrication on polymers is faster and cheaper, offering great possibilities for mass production [9]. In the future, similarly to what has happened in the microelectronics field, mass production of polymer chips will allow a better dissemination of these systems at a lower cost.

Up to now, a large majority of chips used for analytical purposes involved electrokinetic separations, as it is easier to generate flow motion in microsystems *via* an electric potential control at the channel extremities than via a pressure constraint. Bioanalytical and clinical analyses have been the most popular field of application of capillary electrophoresis (CE) microchips given their suitability for use in decentralized analyses (“point-of-care-testing”) [10-13]. CE-microchips for environmental applications are continually growing, taking into account demands of “green analytical chemistry” [14, 15]. Today, we are observing the introduction of CE-microchips into the field of food analysis. Although this first generation of μ TAS is still probably in an early stage, it is emerging in important fields such as the determination of food composition, their beneficial or dangerous effects on human health, the presence or absence of harmful contaminants or residues, the authentication of foods, the transgenic food analysis and the detection of frauds, toxic products, and allergens [16-18]. CE-microchips with more and more elaborate layouts are beginning to assess more complex food samples. This review focuses specifically on CE-microchips dedicated to the emerging field of food analysis. It covers mainly publications that appeared from 2005 to 2013. However, some older papers are also included to illustrate some historical aspects.

2. CE-microchips in food analysis: review of applications

CE-microchips are emerging tools for the assessment of food quality, which is increasingly compromised by sophisticated adulteration procedures used to achieve higher profits, for authentication of foods and discovery of frauds. In addition, these electrophoretic microsystems will probably play an important role to assess food safety through the detection of contaminants (pesticides, heavy metals, polycyclic aromatic hydrocarbons...), allergens, bacteria ... Indeed, in recent years, food safety has undoubtedly attracted great interest within national and international organizations, whose directives and regulations force industries to multiply their quality control activities. Another important issue is the determination of the presence of genetically modified organisms (GMOs). Once again, CE-microchips start to prove their potential and reliability in this considerable application area [19-21].

Traditionally, food controls are performed in quality control laboratories because they require complex apparatus and skilled operators. However, in the near future, one can imagine that the “food lab-on-chip” approach, on condition of sufficient autonomy and simplicity, will make it possible to control a product directly on production sites. To achieve this goal, processes taking place in a μ TAS should include sample pretreatment, injection, separation of

molecules and detection. However, until now, most researches have been made on the separation and detection systems so that, now, the main challenge is to integrate sample pretreatment, still performed outside the chip. This is why this area has without doubt a very exciting future in food analysis as this step is mandatory due to the complexity of food matrices.

The state of the art of CE-microchips for food analysis was reviewed for the first time by Escarpa et al. in 2007 [16]. The microdevices were mainly made from glass and polymer materials (polydimethylsiloxane (PDMS), polymethyl methacrylate (PMMA)) with simple geometries and layouts (simple cross or double-T) coupled mainly to the well-established laser-induced fluorescence (LIF) detection and electrochemical detection (ED) in both amperometry (end-channel configuration) and conductivity (contactless) modes. The first approaches were focused on the exploration of fast separations and suitable detection of prominent analytes with food significance. The first “real samples” analyzed were simple, such as nutraceuticals and dietary supplements, for which no extensive sample preparation, still carried out “off-chip”, was required. In 2008, a second review from the same group reported new analyte separations on chips of food significance involving DNA probes, biogenic amines (BAs), vanilla flavors, and dyes, breaking new barriers in transgenic food analysis, detection of frauds and toxins [17]. Simple microchip layouts were again the most common designs and were still mostly coupled to ED and LIF detection, though some less conventional detection modes in chips were involved, such as UV. Recently, a large number of interesting works about the use of more sophisticated CE-microchips for more complex food sample analysis purposes have appeared in the literature, as illustrated by two reviews [18, 20].

This review here will focus on the different applications of CE-microchips in food analysis found in the literature from 2005 to date with an emphasis on more recent or advanced works for food quality and food safety purposes. For each work, analytical performances of the microchip will be pointed out to show how it answers the analytical demand. In order to take a global vision of the most relevant analytical information, Table I-III-1 gives details about the analytical approach (separation and detection modes, microchip features, separation conditions, sample pretreatment, pre-validation elements of the method such as analysis time, limits of detection (LODs) or quantitation (LOQs), repeatability, reproducibility etc.), and most innovative aspects of the study.

2.1 Food Quality and Food authenticity

As there is a growing public concern on nutritional value of foods and their authenticity, the first part of this article will focus on the main CE-microchips dedicated to food quality and food authenticity evaluation.

2.1.1 Antioxidants

Nowadays, given their important role in human health, the determination of antioxidants constitutes a great deal of research in food analysis. Using CE-microchips, polyphenolic compounds such as phenolic acids and complex flavonoids have been studied in a wide variety of samples including wines [22, 23], soft drinks [24], fruit skins and pulps [23, 25], tea [23, 26, 27], edible oils [28] etc. using different pretreatment steps, separation modes, and detectors.

A new strategy was developed for the determination of total isoflavones in soy samples, involving the methodological calibration and analysis on CE-microchip with an end-channel ED [29]. The integrated calibration was carried out by injecting a controlled amount of genistein and calculating a calibration factor with the obtained signal. Sequentially, the same amount of real sample was injected and the new signal obtained corresponded to all isoflavones. Since the calibration factor was a constant of the analysis, the concentration of total isoflavones in the sample was calculated as genistein equivalents. The proposed route allowed the ultrafast calibration and analysis of total isoflavones in soy samples (milk and tablets) in only 120 s. For the first time in microsystems, the accuracy (less than 6 %) was evaluated using a secondary standard from the Drug Master File (SW/1211/03) as reference material.

As the main challenge of food analysis is the complexity of matrices, nanotechnology is increasingly integrated to miniaturized analytical devices to improve selectivity and sensitivity. Owing to their unique properties such as a large active surface for electrodes of small dimensions, an enhancement of electronic transfer, and a strong sorption capacity, carbon nanotubes (CNTs) are ideal materials for electrochemical sensing in food analysis. Single-walled and two multi-walled CNTs (MWCNT) were tested for the analysis of antioxidants, water-soluble vitamins, vanilla flavors, and total isoflavones found in representative food samples (vitamin supplements, vanilla beans, and apple peel and pulp) [30]. When comparing unmodified screen-printed electrodes with CNTs, higher resolutions (improved by a factor 2 due to higher peak efficiency) and sensitivity (x4 to 16) were

achieved using nanomaterials as ultrasensitive ED. Figure I-III-1 presents electropherograms for (A) a standard mixture of five antioxidants without or with different CNT materials, (B) apple peel extracts without and with MWCNT, and (C) apple pulp and peel extracts using MWCNT. Given both qualitative and quantitative results, the performance of CNTs enabled to successfully analyze complex real samples without extensive pre-concentration or purification steps.

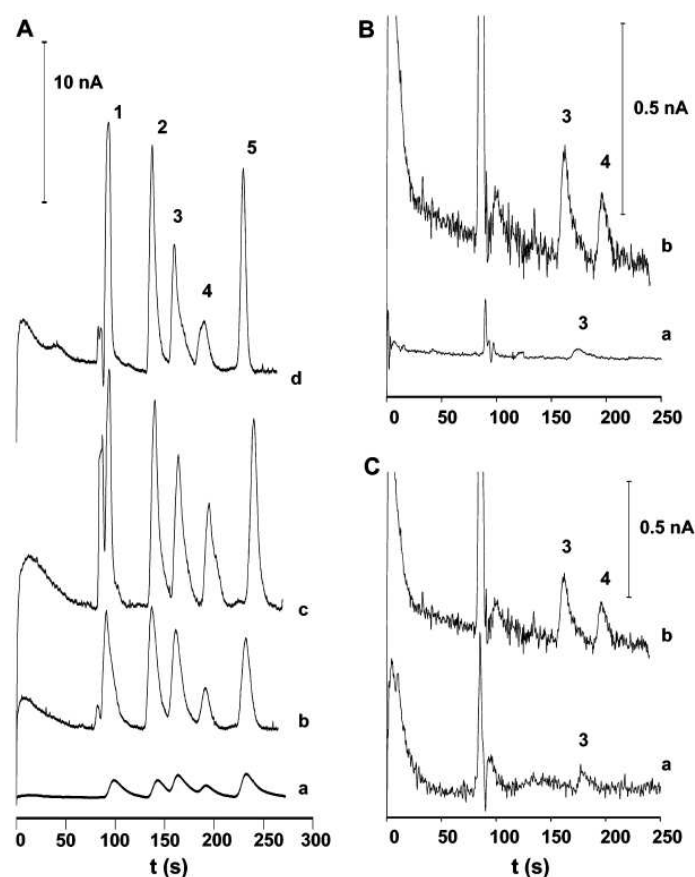


Figure I-III-1. Enhancement of sensitivity using nanomaterials integrated to CE-microchips for food analysis. (A) Electropherograms of a standard mixture of five antioxidants: (a) without and (b-d) with different CNTs. (B) Electropherograms corresponding to apple peel extracts: (a) without and (b) with MWCNT. (C) Analysis of apple extracts with MWCNT: (a) pulp and (b) peel. Peaks: (1) arbutin, (2) phloridzin, (3) catechin, (4) rutin, (5) ascorbic acid (with permission [30]).

Complex natural antioxidants were successfully determined in real world samples using a glass simple-cross capillary zone electrophoresis (CZE) microchip coupled to end-channel amperometric detection [23]. Nine antioxidants ((+)-catechin, rutin, quercetin, chlorogenic, ferulic, caffeic, protocatechuic, vanillic, and gallic acids) were investigated in food samples using two innovative approaches: class-selective electrochemical index determination (CSEID), for fast screening, and individual antioxidant determination (IAD), if the screening is positive. Using the concept of CSEID, flavonoid and phenolic acid classes could be

individually determined in less than 100 s at pH 5 owing to acid-base properties of analytes (Figure I-III-2A). Next, using the IAD approach, a simultaneous separation of the nine previous antioxidants was carried out in less than 260 s (Figure I-III-2B). Good qualitative and quantitative performances for both approaches were obtained. This separation method was successfully applied to real food samples including apple and pear skins and pulps, red and white wines, and green tea tablets, proving the high selectivity of the method and analytical potential of microfluidic technology for quite complex samples.

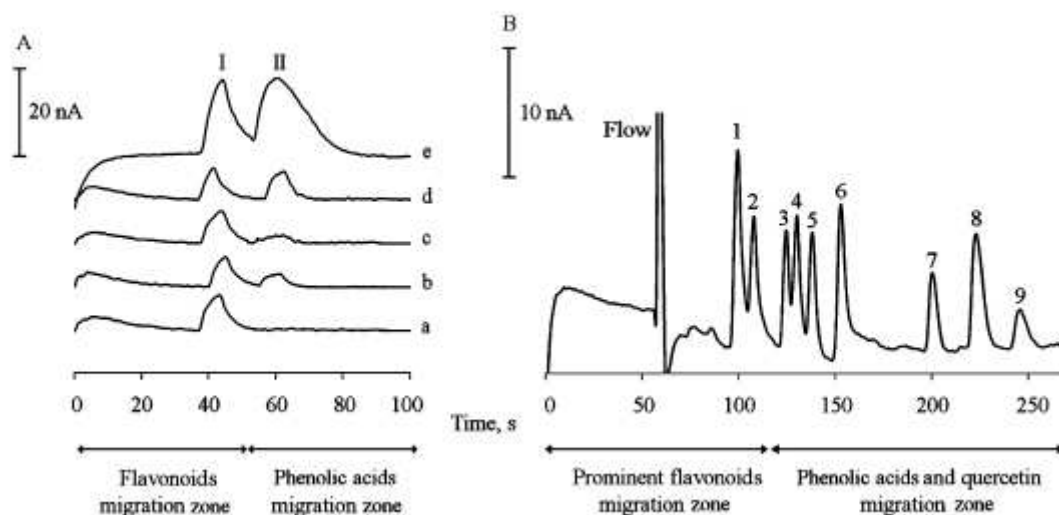


Figure I-III-2. (A) Electropherograms obtained using class-selective electrochemical index determination for different mixtures (a) (+)-catechin, (b) (+)-catechin + gallic acid, (c) (+)-catechin + rutin + ferulic acid, (d) (+)-catechin + ferulic acid + gallic acid, (e) all nine analytes. Peaks: (I) total flavonoids, (II) total phenolic compounds. (B) Electropherogram of the separation of nine antioxidants. Peaks: (1) (+)-catechin, (2) rutin, (3) ferulic acid, (4) chlorogenic acid, (5) vanillic acid, (6) quercetin, (7) caffeic acid, (8) gallic acid, (9) protocatechuic acid (with permission [23]) .

The first study of a CE-microchip for the analysis of phenolic compounds in edible oils was recently published [28]. Using a glass CE-microchip coupled to end-channel amperometric detection, 3 relevant phenolic compounds (tyrosol, hydroxytyrosol, and oleuropein glucoside) were studied in olive oils. Under optimized conditions of injection via sample stacking phenomenon, separation (15 mM sodium tetraborate buffer (pH 9.5) with 10 % MeOH), and detection (0.1 M aqueous sulfuric acid in 5 % MeOH), the 3 antioxidants could be analyzed in about 60 s with adequate LODs (7-36 μ M) and intra- and inter-day repeatabilities for migration times (RSDs < 1 % (n = 11) and RSDs < 7 % (n = 3), respectively) and peak heights (RSDs < 4 % (n = 11) and RSDs < 8 % (n = 3), respectively). When applying this method to olive oils, an important and negative matrix effect was highlighted, probably due to the competitive adsorption of non-electroactive interferences onto the gold electrode. The standard addition methodology was therefore used for the quantitation in real samples:

tyrosol and hydroxytyrosol were detected whereas oleuropein glucoside was not, because of its low concentration. To pre-validate the method, recovery assays were performed and good recoveries for the 3 analytes were obtained (106-113 %). However, it is worthy to note that the pretreatment steps, including two extraction steps, evaporation, dissolution and filtration, were laborious and therefore still carried out off-chip, which negated the concept of the fully portable device and prevented field analysis.

2.1.2 Amino acids

Analytical determination of free amino acids (AAs) is an important way to assess food composition during quality control activities. If, up to now, ED has been preferred to analyze antioxidants due to its inherent sensitivity and selectivity, for AA analysis, LIF detection, which is also highly sensitive and specific, has been employed as these compounds do not have electrochemical properties.

The first contribution of LIF detection in microchip platforms for AA analysis in food was demonstrated with Japanese green tea [31]. Five AAs (arginine, theanine, glutamine, asparagine, and serine) were off-chip derivatized with 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F) and separated in less than 2 min using a phosphate buffer containing 0.05 mM sodium dodecyl sulfate (SDS) to avoid adsorption of AAs on the PMMA microchip walls, and therefore to preserve a high-separation efficiency. After a polyvinylpyrrolidone-based solid-phase extraction (SPE) during which polyphenols were removed from tea, the 3 main green tea AAs (theanine, arginine, and glutamine) were detected. This step was mandatory, otherwise polyphenols prevented the derivatization of AAs. Quantitative data obtained from the CE-microchip analysis coincided well with the ones obtained by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC).

Taurine (2-aminoethanesulfonic acid) is an AA associated with different benefic physiological functions, such as antioxidation activity, neuromodulation, membrane stabilization, and modulation of intracellular calcium levels. Nevertheless, uncontrolled concentrations in plasma and urine have been associated with several diseases, such as epilepsy, myocardial infarction, and cancer. Fast and reliable analytical methods for taurine determination in food and beverages are therefore needed for food quality control purposes. A method for the quantitative determination of this AA in energy and sport drinks, by means of a rapid on-chip CE analysis and wavelength-resolved fluorescence detection was developed [32]. The home-built detector system yielding information-rich 3D electropherograms was the first wavelength-resolved detection system coupled to on-chip separation. After a fast and simple

off-chip sample preparation method (involving dilution and addition of a fluorogenic labelling reagent), the separation of the taurine derivative from the internal standard and the hydrolysis product of the reagent was achieved in only 12 s, while peak purity was assessed by the extracted emission spectra. The LOD of taurine was evaluated as low as 1 μM and the method was successfully validated by comparison with results from HPLC coupled to fluorescence detection (HPLC-Fluo).

Micellar electrokinetic chromatography (MEKC) microchip with light emitting diode (LED)-induced fluorescence has also been developed for the quantitative analysis of AAs in different food samples (sport beverages, jelly-form beverages, and tablet-form functional foods) [33]. It is worthwhile to note that a LED is significantly less expensive and cumbersome than a laser, improving potential portability of the μTAS . As compared to glass material, improved separation of AAs was obtained on a PMMA chip by addition of a cationic starch derivative to the separation buffer, which decreased electroosmotic flow (EOF) and AA adsorption on the channel surface. After off-chip derivatization with NBD-F, the separation of 10 AAs over a set of 17 compounds was achieved within 350 s. This analytical method allowed the determination of several AAs in functional foods in less than 10 min, for the entire procedure, proving the potential of miniaturized analytical systems for the analysis of real world food samples.

Recently, free AAs in milk were determined using CE-microchip coupled to LIF detection. Seven Cy5-labeled AAs were separated within 150 s using a 100 mM sodium borate buffer (pH 10.0). The linear range was found between 0.01 and 1.0 μM and the LODs ranged from 1.0 to 5.9 nM. AAs were successfully analyzed in spiked milk samples with recoveries between 95 and 104 % [34].

2.1.3 Organic and inorganic ions

In routine quality control of foods and beverages, small organic and inorganic ions also belong to the most targeted compounds. Indeed, they are naturally present in many foods and play important roles in several physiological activities. Moreover, low molecular ions can be added to food products to enhance their organoleptic properties (color, flavor, aroma, and taste) as well as their stability and to control their antioxidant activities. Due to the lack of suitable fluorescent functions, amperometric and conductimetric detection techniques are the most widespread for the analysis of small ionic compounds using microchip devices, with conductimetry being the most popular owing to its universality for charged species.

A CZE method was developed for the simultaneous analysis of 23 organic and inorganic acids found in wines on a PMMA chip with integrated conductivity detection [35]. Under optimized conditions, 22 compounds were separated (oxalate and fluoride anions still co-migrating) and a quantitative determination of organic acids responsible for some important organoleptic characteristics of wines (tartaric, malic, acetic, succinic, lactic, and citric acids) was assessed using model samples and test wine samples. The method was simple and fast (10 min analysis time), while affording reproducible migration times (0.8-2.0 % RSD values, $n = 25$) and quantitative data (2.7-6.3 % RSD values on peak areas, $n = 25$). An easy off-chip sample pretreatment (filtration and 100-400 fold dilution) was only required to work in the linear concentration ranges. Given the low concentrations targeted, t-ITP sample stacking was used, by addition of fluoride to the sample, as leading ion. Given the rapidity of the separation, the simple sample preparation procedure, and the multi-analyte information obtained, this method has a promising future in food control laboratories for wine sample analysis.

A capacitively coupled contactless conductivity detector (C^4D) for the ion analysis of beverages by CE-microchip was also used [36]. Using appropriate electrolytes, 5 inorganic cations (ammonium, potassium, calcium, sodium, and magnesium) and 12 organic and inorganic anions (chloride, sulfate, oxalate, tartrate, malate, citrate, succinate, pyruvate, acetate, lactate, phosphate, and pyroglutamate) were separated in 35 and 90 s, respectively, and determined in water, wine, fruit juice, beer, and milk samples. Simple sample preparation procedures, still carried out off-chip, were followed: water, wines, fruit juices, and beer were just diluted in background electrolyte (BGE) and filtered, whereas milk samples were denatured, centrifuged, and finally the supernatant was diluted in BGE and filtered. LODs ranged from 90 to 250 $\mu\text{g/L}$ for inorganic cations and anions, and from 200 to 2000 $\mu\text{g/L}$ for organic anions and phosphate. This application clearly demonstrates the applicability of CE-microchip with C^4D to the analysis of real beverage samples.

The determination of the concentration levels of methyl- and ethyl-derivatives of ammonia such as methylamine, dimethylamine, trimethylamine, diethylamine, and triethylamine is crucial for quality control in the food storage and distribution processes. The combination of headspace single-drop microextraction (off-chip), microchip CE and, also here, contactless conductivity detection was presented as a novel approach for the efficient extraction and determination of these five volatile aliphatic amines [37]. After optimizing various extraction and separation parameters, the five aliphatic amine species were separated in less than 40 s using a PMMA microchip and integrated thin-film gold electrodes for C^4D . The study was carried out using the commercially available microfluidic ChipGenie edition E (Microfluidic ChipShop GmbH, Jena, Germany), which integrates both the separation and the detection

electronics in a compact portable device. Linear concentration ranges were found between 0.1 and 10 mg/L for the ethylamines and between 0.5 to 10 mg/L for the methylamines. This method was applied to the quantitative determination of aliphatic amines, markers of biodegradation, in real seafood samples such as fish and shrimp tissues. In the future, this approach promises to result in a fully integrated and portable total microanalytical system with great potential for the monitoring of important processes in quality control.

2.1.4 Vanilla flavors

The detection of frauds represents a continual challenge in the analytical field. Indeed, an increasing number of food products are adulterated to achieve illegal higher profits. Although added compounds are usually not harmful, they reduce food quality and nutritional value, requiring fast and reliable analytical methods for the detection of frauds. Several studies have been devoted to the detection of frauds in vanilla flavor, one of the most used in the food industry. The basic vanilla flavors obtained from *Vanilla planifolia* extracts are vanillin (VAN), p-hydroxybenzaldehyde (PHB), vanillic acid (VANA), and p-hydroxybenzoic acid (PHBA). Common adulterations of vanilla flavors consist in adding ethyl vanillin (EVA) or synthetic VAN, that is why the detection of the three natural markers PHB, VANA, and PHBA are necessary to distinguish authentic samples from adulterated ones. The separation of EVA and VAN using microchip format in the presence of other food enhancers (vanillic alcohol, ethyl maltol, and maltol) was proposed, involving ED with optimized detection cell medium [38]. However, this separation method could not discriminate authentic vanilla flavors from adulterated samples. In consequence, two years later, the same group developed a new CE-microchip application for the simultaneous separation of EVA, unequivocal proof of frauds, with VAN, PHB, VANA, and PHBA [39]. To prove the suitability of this method, vanilla bean (*V. planifolia*) extracts and other vanilla-related foodstuff samples (liquid vanilla and vanilla tea) were analyzed. A simultaneous separation of all components with resolutions superior to 1.5 was obtained in less than 300 s on a glass simple cross chip using a 10 mM borate buffer (pH 9.5) and ED. It is worthwhile to note that the BGE was optimized with EVA migrating in first position, followed by VAN, and then PHB, VANA, and PHBA. Indeed, with the same analytical conditions, there is one screening and one confirmatory approach, avoiding the need to change the technique from screening to confirmatory mode. For the analysis of vanilla extracts, the simultaneous absence of EVA and the presence of VAN, PHB, VANA, and PHBA were unequivocal proof of their natural origin. On the contrary, the direct detection of EVA in black vanilla and VAN in white vanilla and vanilla tea with the absence of PHB, VANA and PHBA clearly indicated two types of

frauds. The extraction steps of vanilla samples were complex and time-consuming and therefore performed “off-chip”. However, both qualitative and quantitative results demonstrate the ability of CE-microchips in the fast and reliable detection of frauds. The LOQs for all markers in both vanilla extracts and real samples ranged from 0.06 to 0.3 mg/L.

2.1.5 Dyes

Other significant compounds that are the focus of attention in food quality are artificial dyes. Colorants are widely added to food products to enhance their color and therefore their attractiveness. Although most dyes do not lead to adverse health effects, several ones have demonstrated some toxicity. Consequently, the use of natural and synthetic dyes is regulated by law and new analytical methods are needed for a rapid identification and quantitation of colorants in foodstuffs. A rapid separation (less than 300 s) of five azo dyes frequently added to food products (Yellow AB, Red 2G, Sunset Yellow, New cocchine, and Amaranth) using a glass simple cross CE-microchip with ED was published [40]. This method was proved to be suitable for real samples analysis such as soft drinks and colored candies using simple “off-chip” sample preparation steps. Under optimal detection conditions, obtained LODs (from 3.4 to 15.1 μM) were below values set by the regulation for azo dyes in food.

An in-channel configuration for the amperometric detection of two synthetic food dyes (Green S and Patent Blue) was also developed in PDMS CE-microchip [41]. Thanks to the use of a ground-floating electrically isolated potentiostat, decoupling strategies were not required. Moreover, as compared with the more conventional end-channel configuration, this electrode alignment directly into the end of the separation channel led to better peak resolutions and higher sensitivities, since no gap was present between the channel outlet and the working electrode, therefore preventing from additional band broadening. Under optimized injection, separation, and detection conditions, the target dyes from commercial soft drinks and candies were satisfactory resolved and detected in less than 250 s. Finally, this PDMS-based microchip CE combined with ED offers unique advantages: mass production possibilities due to the fast and cheap microfabrication techniques for polymers and inherent miniaturization of ED owing to its high compatibility with microfabrication techniques, which will be probably exploited for performing “in-field” controls.

Nevertheless, the previous study required the implementation of a SPE step before introduction of the sample into the chip reservoir. Indeed, given the well-known complexity of food matrices, the integration of sample preparation “on-chip” constitutes one of the major remaining challenges. However, implementation of on-chip preconcentration, separation, and

ED steps for the analysis of food dyes in different food samples was already reported [42]. The uncommon microchip layout used consisted in three parallel channels: the first two for the field-amplified sample stacking and the subsequent field-amplified sample injection to on-line preconcentrate the organic dyes anions, which were then separated using MEKC and electrochemically detected in the third channel (Figure I-III-3A). Several experimental parameters affecting the analytical performances were studied, i.e. buffer concentration, water plug length, preconcentration time, electrode-to-channel distance, detection potential, and separation field strength. The on-chip preconcentration, separation, and ED, unfortunately still coupled to a necessary off-line SPE pretreatment step, was employed to analyze food dyes in real samples such as juices, traditional Korean alcohol, fishes, noodles, and red pepper powders. Although eight dyes were successfully separated in less than 240 s in standard mixtures, two dyes only were effectively detected in real samples (Figure I-III-3B and Figure I-III-3C, respectively). Good average recoveries (from 93 to 108 %) were obtained, even if large variations in the detector responses and migration times, and an unstable baseline were obtained, perhaps due to the presence of unknown salts in the matrix. Nevertheless, a preconcentration factor of 10 800 was reached and LODs between 1 and 50 nM were obtained (lower by two orders of magnitude compared with the conventional CE methods). The high sensitivity of the method with its successful application to various real food samples demonstrates its potential for the routine analysis of food colorants in complex samples.

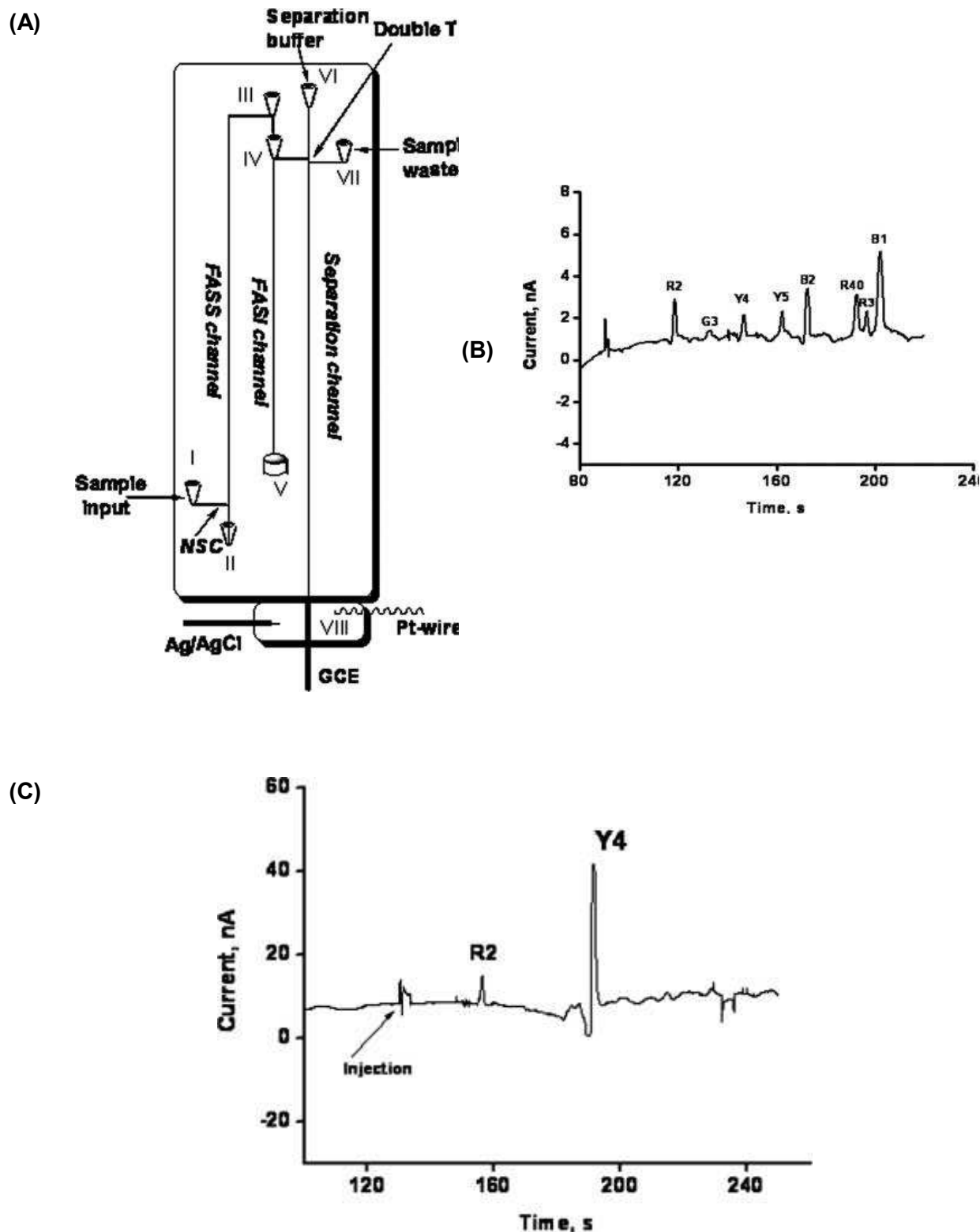


Figure I-III-3. (A) Schematic representation of the microfluidic device integrating electrokinetic preconcentration steps before separation and detection for food dye analysis. CE-microchip analysis of (B) 8 food dye standard mixture or (C) Korean traditional alcohol using preconcentration and MEKC-ED methods (with permission [42]).

2.1.6 Proteins

Others constituents of food, essential to human health, are proteins. Many foods of both animal and plant sources contain proteins, which have a key role on nutritional properties of foods. Many food proteins are enzymes which are able to enhance the rate of certain biochemical reactions. These reactions can have either a favorable or detrimental effect on the overall properties of foods. The total concentration, type, molecular structure, and functional properties of proteins in foods are therefore targeted by analysts. Given their different molecular structures and their large concentration ranges, protein analysis is one of the most challenging topics in food analysis. CE-microchips have been used for proteins analysis in a variety of food samples such as chicken eggs [43], fish muscle [44], wheat [45], milk [46-49], and cheese [50].

The development of a glass double-T CZE chip coupled to LIF detection for the separation and determination of five β -casomorphins in cheese samples was reported [50]. β -casomorphins are a group of peptides derived from the enzymatic digestion of milk protein casein. As they can affect the gastrointestinal, central nervous, endocrine and cardiovascular systems, their determination at trace levels is necessary to provide a study of their physiological effect and clinical pathology in the human body. As β -casomorphins are not naturally fluorescent, fluorescein isothiocyanate (FITC) was used as the off-chip derivatization reagent. Once the optimum conditions of FITC-derivatization reaction and microchip separation were determined, the five β -casomorphins were analyzed within 30 min, with LODs going from 18.7 to 75.1 nM and good repeatabilities for peak heights (RSD of 3.0-5.9 %, $n = 5$). Using this method, two β -casomorphins were successfully detected in cheese samples with recoveries of 89-109 %, proving the reliability of the method.

The first commercially available automated microfluidic electrophoresis platform, Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), coupled to fluorescence detection has often been used for protein analysis from different food matrices. Whey protein fractions from 40 Mediterranean water buffalo milks were analyzed with Bioanalyzer 2100 in combination with a Protein 80 kit [46]. In that case, gel electrophoresis was involved. The method allowed a fast and complete separation of the three major whey proteins (serum albumin (SA), α -lactalbumin, and β -lactoglobulin) in 3 min. As the performance of the separation was similar to traditional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), CE-microchip appeared to be a convenient alternative with considerably higher throughput. Chip-specific calibration curves were used to quantitate the samples loaded onto the same chip as the standards, giving linear instrumental response with average R^2 coefficients between 0.93

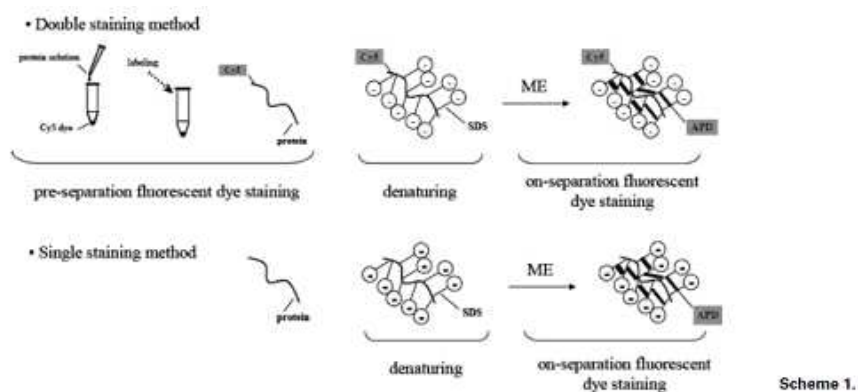
and 0.95 over all the chip runs. For comparison purposes, the samples were also analyzed by reversed phase HPLC and validation procedures were carried out for both. For CE-microchip, repeatability (calculated on a single chip) and ruggedness (using 30 repetitions over 3 chips) were highly satisfactory for migration times (between 0.1 and 1 %) whereas higher RSD were obtained for peak areas (in the range of 7 and 12 % depending on the protein). This probably came from between-chip variations, thus limiting the use of CE-microchip as a quantitative method in that case.

Still using Bioanalyzer 2100, a highly sensitive double-fluorescent staining in gel electrophoresis microchip for milk proteins analysis was developed [47]. The staining method consisted of two steps (Figure I-III-4A): a covalent bonding of the extracted proteins to an amine-reactive fluorescent dye (Cy5) and a denaturation of the Cy5-attached protein with SDS followed by staining, during electrophoresis, with Agilent Fluorescent Dye (AFD, Agilent Technology) which was non-covalently attached to hydrophobic regions of the SDS-protein complex. This double-staining method was compared to a single staining method for which the proteins were just stained with AFD (Figure I-III-4B). Both methods were applied to the analysis of bovine milk proteins (bovine serum albumine (BSA), lysozyme, and β -galactosidase). Detection sensitivity was found to be 50-100 times higher using the double-fluorescent dye staining, with LOD decreased to 200 pg of protein. Finally, the double-staining method was successfully applied to the analysis of a real biological bovine milk protein mixture. Enhancement in peak intensities was obtained for α - and β -lactoglobulin, which were hardly detected in the single-staining method, confirming the utility of this new staining method as a highly sensitive detection method.

The Agilent Bioanalyzer 2100 was also used to study the effect of aquaculture on food quality, i.e. on chemical and biochemical differences in fish muscles [44]. In this study, water-soluble muscle protein products from farm and wild sea fishes were compared using a proteomic approach integrated with fatty acids and heavy metal analyses. Bioanalyzer 2100 was used with denaturing gel electrophoresis to produce a protein content profile from farmed and wild samples, with high throughput capabilities, good resolution, repeatability and sensitivity. The separation and relative quantitation of 13 different proteins were achieved in 60 s showing alterations in protein expression (Figure I-III-5A and Figure I-III-5B). Indeed, large variations of protein relative concentrations between farmed and wild fish muscle tissues were observed: protein peak 7 (31.5 kDa), for example, was more intense in the farmed fish specimen than in the wild one (peak amounted to 20.9 ± 1.4 % total protein in the farmed sample, but only to 10.9 ± 1.4 % in wild sample). Others variations could also be detected: protein peak 13 at 13.4 kDa showed a decrease of 24 % for the farmed sample. Microfluidic analysis offered a valuable tool to detect protein expression changes induced by

aquaculture since it allowed the detection of at least 9 out of 13 protein peaks presenting a significant variation between wild and farmed samples.

(A)



(B)

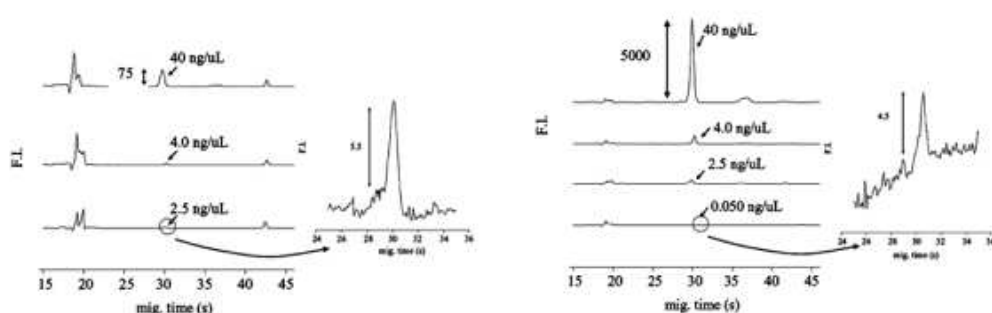
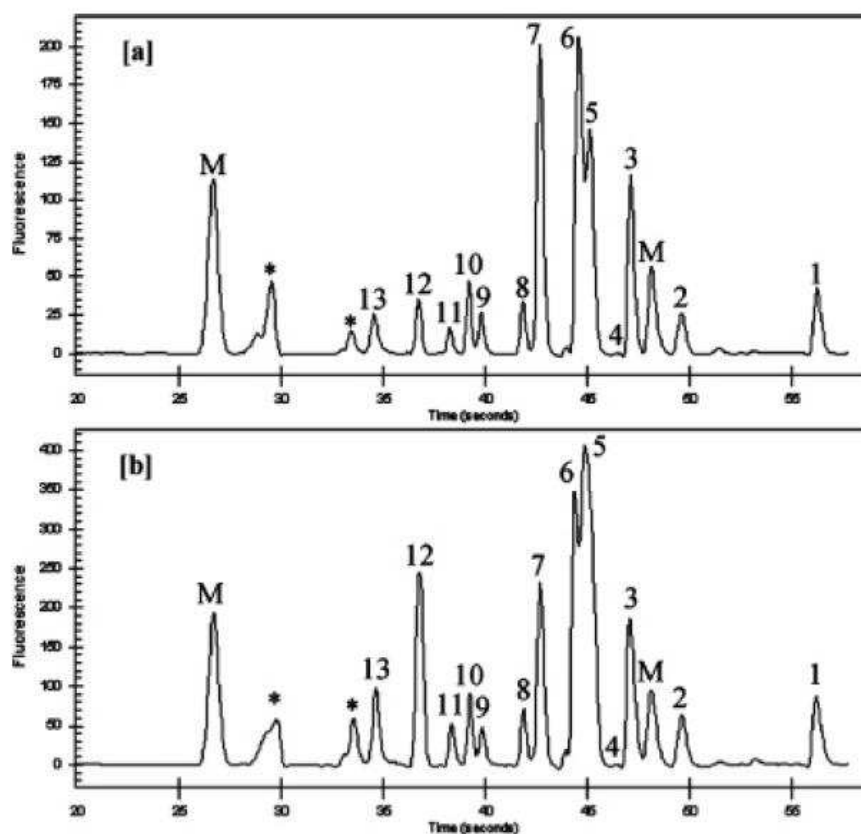


Figure I-III-4. (A) Double- and single-staining methods. (B) Comparison of fluorescence intensities for BSA (68 kDa) signal using the single-staining method (left) and the double-staining method (right). Arrows indicate the concentration of BSA while insets show magnified electropherograms for better observation (with permission [47]).

The same instrument was also applied to identify wheat varieties and to predict wheat quality. A set of 10 samples could be analyzed in 30 min and distinctions between 40 commonly grown Australian wheat varieties was observed [45]. This technique was also successfully applied to the separation of proteins from other crops (other grains and vegetables) which highlighted its ability to analyze protein composition of different grain species.

(A)



(B)

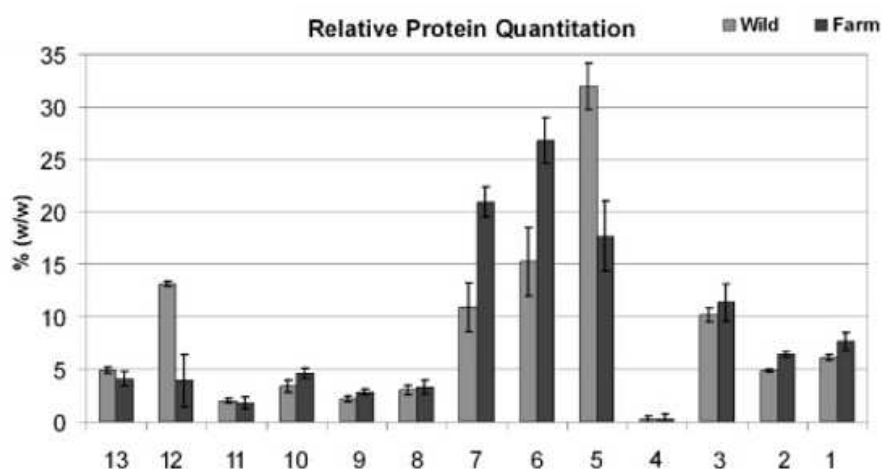


Figure I-III-5. (A) Microfluidic analyses on Agilent Bioanalyzer 2100 of soluble protein extracts from muscle from *D. labrax*. Electropherograms of protein extracts from [a] farmed and [b] wild sample. Peaks 3-13 were used for relative protein quantitation; peaks marked M are internal protein standards; peak marked as * are system peaks. (B) Relative percentage on total protein for each protein in wild and farmed fish samples (with permission [44]).

Using fused-silica chips permanently coated with poly(vinyl alcohol) coupled to a deep UV fluorescence detection with excitation at 266 nm, unlabeled proteins (lysozyme, conalbumin, and ovalbumin) from egg white samples were separated in less than 100 s with sufficient resolutions. For the first time, this study showed the great potential of microchip

electrophoresis for the fast separation of protein mixtures from real food samples at native conditions [43]. One recent study reported also the detection of unlabeled functional proteins, through UV detection after a multi-dimensional separation combining isoelectrofocusing (IEF), transient-isotachopheresis (t-ITP), and CZE [48]. Indeed, to improve resolution of important minor proteins and eliminate time-consuming precipitation of major proteins, IEF was used to isolate minor functional proteins from the major protein fraction on-chip, prior to their enrichment by t-ITP, followed by CZE separation. Five functional proteins (α -lactalbumin, lactoferrin, immunoglobulin G, and β -lactoglobulins (β -LgA and β -LgB)), which are important in baby milk formulas, were isolated from high abundance proteins by a 1D-IEF run and determined using two consecutive t-ITP/CZE runs within 18 min. 60-fold enrichment of isolated protein fractions was demonstrated. This multi-dimensional CE-microchip device was successfully applied to the analysis of proteins in infant milk formulas. Good recoveries (between 93 and 105 %), LODs (from 2.3 to 10 mg-protein/100 g-milk) and repeatability (RSDs (peak area) ≤ 5.3 %, ($n = 3$)) were obtained, thus proving the capability of the device to determine minor proteins in real protein-rich samples. Later, to further improve the throughput and therefore decrease the analysis time, it could be envisaged to perform the t-ITP/CZE runs in parallel.

2.1.7 DNA

In food authenticity testing, CE-microchips were also used for DNA analysis. Depending on the applications, different DNA markers could be targeted to study the origin of raw materials and the authenticity of food products. Meat is an example of a possible fraudulent labeling because of economic profit which aims at replacing expensive meat by cheaper species. With that purpose, the commercial Agilent Bioanalyzer 2100 was used for the identification of different game and domestic meat species [51]. It advantageously replaced the classical gel electrophoresis step, potentially hazardous, time-consuming, and not reliable. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of a mitochondrial 12S rRNA gene fragment and subsequent digestion of the amplicons with endonucleases generated characteristic PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) profiles, that allowed discrimination among ten relevant game and domestic meat species. Owing to its capability of rapidly sizing DNA fragments, the microchip device enabled to confirm the species and improved the PCR-RFLP fragment resolution and detection in comparison with the conventional gel-based method. Indeed, band resolution was so sensitive that some small DNA fragments, not observed with the conventional method, were detected. Therefore, owing to its advantages

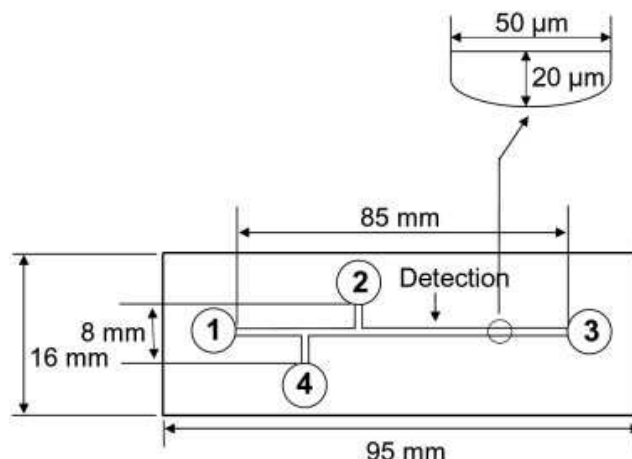
(rapidity, easy handling procedures, and possible analysis of complex DNA banding patterns), this system provides a powerful tool for routine species identification.

The same instrument was used to detect contamination of Arabica coffees with Robusta [52]. A PCR-RFLP approach to monitor a single nucleotide polymorphism within the chloroplastic genome (chloroplastic target used: trnL(UAA)-trnF(GAA) intergenic spacer regions) followed by microchip gel electrophoresis allowed the quantitative determination of this adulteration of Arabica coffees. A 5 % LOD was obtained, which was found to be discriminatory for all of the Arabica and Robusta varieties studied. Once again, its ease of use and its rapidity (60 min per 12 samples after the restriction digest step) prove that it may be suitable for the routine analysis in detection of frauds.

CE-microchips for DNA analysis are not only dedicated to food authenticity testing, but also to the detection of GMOs. A microchip CE-LIF system was used for the analysis of DNA fragments in order to verify GMO in maize [21]. Nowadays, about 80 % of the maize produced in the United States is genetically modified (GM). GM maize is also the only GM crop that is grown commercially in the European Union. Although, for the most part, maize is used for feeding livestock, it is also a raw material for the starch industry, forming the basis of many foods and food additives. Using DBCE-100 from Digital Bio Technology, analytical performances of the double-T CE-microchip (Figure I-III-6A) in terms of speed and resolution were improved using a programmed field strength gradient (PFSG) for the ultra-fast and simultaneous analysis of five transgenic maize varieties as well as the differentiation between GM and non-GM maize (Figure I-III-6B).

Different sieving gels and fluorescent dye concentrations were studied to enhance the separation efficiency and sensitivity. Under the best conditions, a rapid analysis of the PCR products for both the GM and non-GM maize was carried out within 30 s under the PFSG (60 times faster than with other described methods). The method allowed to clearly differentiate the five transgenic maize varieties with higher sensitivity, resolution, and separation efficiency than either slab gel electrophoresis or CE. Moreover, non-GM maize could be differentiated from GM ones, revealing that this method is a powerful tool for a fast detection of GMOs in food.

(A)



(B)

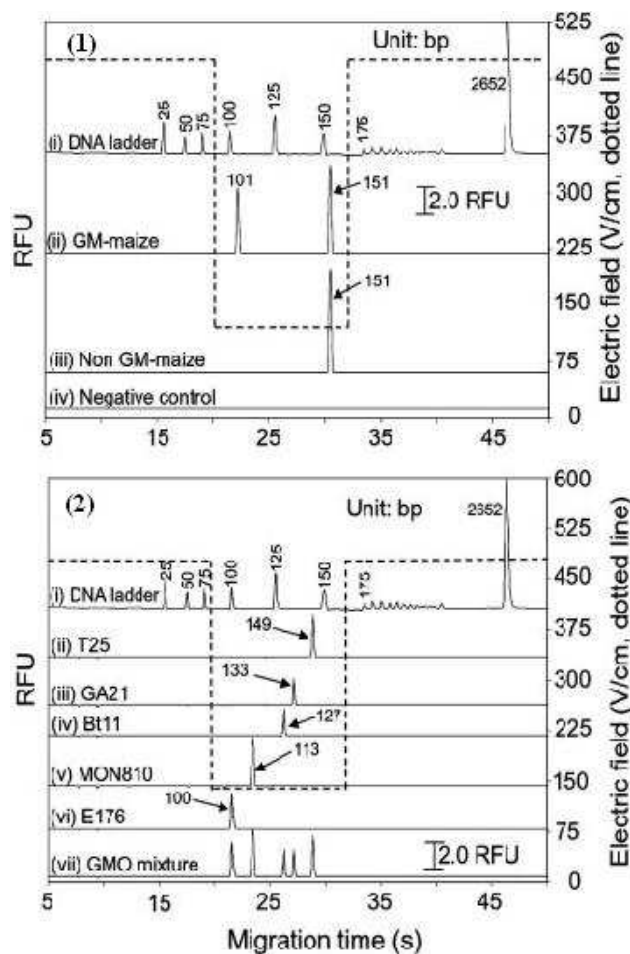


Figure I-III-6. CE-microchip for GMO analysis (A) Double-T microfluidic chip used to analyze the PCR products. (B) CE-microchip PFSG electropherograms of (1) GM and non GM maize, (2) five GM maize varieties with the 25-bp DNA ladder (with permission [21]).

The fast and simultaneous detection of rice knockout mutants in GM rice was performed on a multi-channel CE-microchip with LIF detection [53]. Recording data simultaneously on the three parallel separation channels and applying a PFSG method, T-DNA-inserted rice mutants, two standard wild-type rice lines, and six rice knockout mutants were analyzed

within 4 min (more than 15 times faster than traditional slab gel electrophoresis). The PFSG method was introduced to perform DNA separation faster (763 s with a constant field strength against 256 s under the optimized PFSG), while maintaining a good resolving power ($R_s > 1.5$). Moreover, this method provided identification of rice mutants with high sensitivity (only one-fifth the volume and 20 times lower concentrations of DNA samples than the traditional electrophoretic method). Finally, such a method (multi-channel device with PFSG) yielded high-throughput screening of amplified-PCR products, representing wild-type rice and mutants, proving once again the high potential of CE-microchip in the detection of GMOs. Further increase in sample throughput simply by fabricating more channels on the microchip will undoubtedly allow to even more decrease the analysis time.

2.2 Food Safety

CE-microchips have also been used as a tool for monitoring food safety, for example to detect the presence of BAs [54-56], toxins [57-59], heavy metals [60], bacteria [61, 62], allergens [63, 64] etc.

2.2.1 Biogenic amines

BAs are formed and degraded during the normal metabolism of microorganisms, plants, and animals. In humans, BAs have important physiological functions: they are involved in brain activity, regulation of body temperature and stomach pH, immune response, etc. BAs may be present in a variety of foods and beverages including fish, meat, cheese, and fermented foods, and are produced from the decarboxylation of certain AAs in raw food by the action of microorganisms. In fermented foods, BAs come from enzymatic degradations and yeast activity involved in alcoholic fermentation processes. However, the consumption of foods with high concentrations of BAs can induce toxic effects such as nausea, headache, changes in blood pressure, cardiac palpitations, and renal intoxication. This is why many countries set legal limits for the maximum content of BAs in various foods. Consequently, simple and fast methods need to be developed for the simultaneous analysis of BAs and their AA precursors.

Using conventional electrode materials, the oxidation of the majority of AAs and BAs, which are not electroactive, requires potentials beyond the accessible range, limited by solvent discharge or electrode surface fouling. To overcome these drawbacks, electrodes modified with transition metal compounds were used for the direct detection of BAs and AAs without the need of tedious derivatization schemes [54]. A mixed-valent ruthenium

oxide/hexacyanoruthenate polymeric film electrochemically deposited onto glassy carbon electrodes was thus reported to electrocatalyze the oxidation of BAs and their AA precursors after their separation on a CE-microchip. Using an end-channel configuration, this ruthenium-based coating was evaluated for the determination of aliphatic and heterocyclic amines, as well as their AA precursors such as ethanolamine, tryptamine, and tryptophane. Once parameters affecting both the separation and the detection were optimized, these compounds were well-resolved using a 20 mM phosphate buffer (pH 2.5) and applying a voltage of 2.5 kV (Figure I-III-7). Adopting a 25 mM sulphuric acid as the medium in the detection cell and a constant potential of 1.05 V vs Ag/AgCl, 3 M KCl to the modified working electrode, quite high sensitivities were obtained with LODs of 23 μ M (1.4 mg/L), 27 μ M (4.3 mg/L), and 34 μ M (6.8 mg/L) for ethanolamine, tryptamine, and tryptophane, respectively. Moreover, good repeatabilities (RSDs $\leq$ 4 %, $n = 10$) for peak currents were obtained. However, as the CZE separation mode was used, species with similar charges and chemical structures could not be separated. Indeed, compounds from a same class (aliphatic amines, heterocyclic amines, or AAs) could not be separated from each other, demonstrating that this approach did not allow single amines or AAs to be determined but makes it only possible the separation of the different classes of these compounds. Nevertheless, no trouble was caused by the presence of even large amounts of ethanol (undergoing electrocatalyzed oxidation at less positive potentials), thanks to its different migration time (Figure I-III-7). The procedure was successfully applied to the analysis of spiked double malt dark beers using a simple pretreatment procedure composed of a degassing step followed by filtration and dilution in BGE, making this approach suitable for performing “in-field” food controls.

Another quite interesting work proposed the use of a portable microchip CE-LIF system (The Mars Organic Analyzer (MOA), part of the Urey instrument selected for the 2013 ESA ExoMars mission, Figure I-III-8A) for the determination of neurologically active BAs in fermented beverages, especially tyramine and histamine, produced by the decarboxylation of tyrosine and histidine, respectively [55]. The BAs were first labeled on their primary amino groups with fluorescamine during an off-chip 10-min reaction, then diluted with BGE (8 mM $\text{Na}_2\text{HCO}_3/\text{NaHCO}_3$ at pH 10.4), and finally analyzed in only 120 s on the glass CZE device. The electropherograms revealed a rich fingerprint of the BAs and AAs in beverages and provided direct determination of the tyramine and histamine concentrations in several fermented beverages resulting from different fermentation procedures (wine, beer, and sake) (Figure I-III-8B). The authors also showed from the analysis of red wine samples, that histamine and tyramine are produced during yeast and malolactic fermentation, respectively. These results established the validity of this portable microdevice for point-of-consumption

analysis. However, although the MOA system was effectively miniaturized, the remaining challenge was to miniaturize the electronics within the instrument, to develop convenient software for automated peak identification and quantitation, and to integrate the derivatization step on-chip.

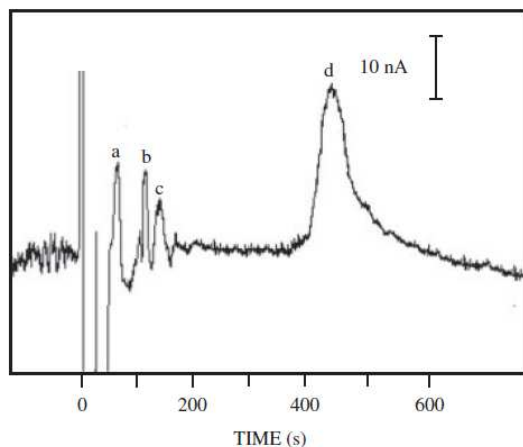


Figure I-III-7. Analysis of a spiked double malt beer using a 20 mM phosphate buffer (pH 2.5). (a) aliphatic amines, (b) heterocyclic amines, (c) amino acids, and (d) ethanol (with permission [54]).

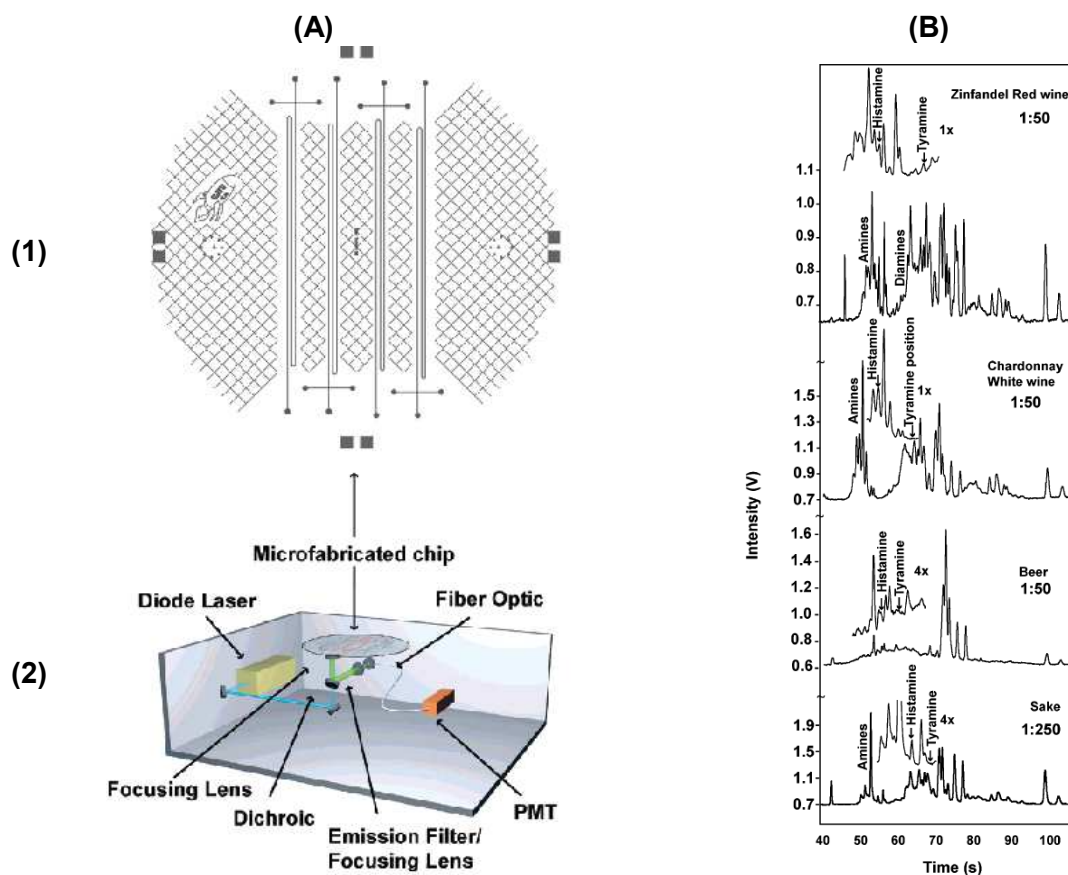


Figure I-III-8. (A) Mars Organic Analyzer with (1) its glass chip composed of 4 folded separation channels and (2) its confocal excitation and detection optics. (B) Comparison of electropherograms for different fermented beverages including red wine, white wine, beer, and sake (with permission [55]).

Another group demonstrated that on-chip derivatization, followed by separation and LIF detection on a PDMS microchip was efficient for the simultaneous analysis of the four most important BAs occurring in food: histamine, tyramine, putrescine, and tryptamine [56]. Amines were first derivatized with o-phthaldialdehyde (OPA) in an optimally designed reaction chamber, then separated and determined in less than 1 min at the levels applicable to real samples using MEKC mode (25 mM sodium borate buffer (pH 10.0) with 25 mM SDS, and 5 % v/v MeOH) (Figure I-III-9). The two PDMS plates were irreversibly bonded using a method new at that time, based on oxidation by corona discharge generated from an easily available, inexpensive source Tesla coil.

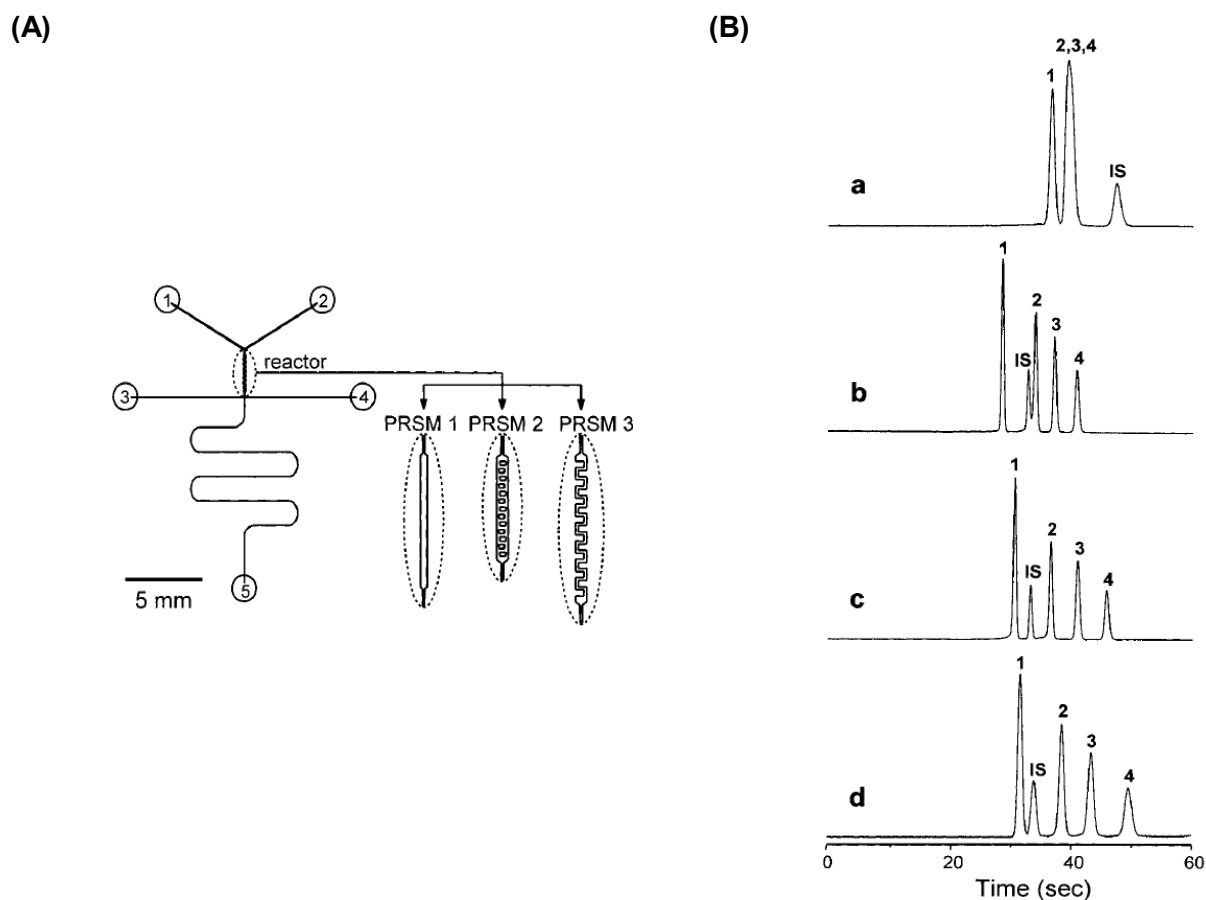


Figure I-III-9. (A) Microchip layout with the 3 tested designs for the derivatization chambers. (B) Effects of SDS concentration (a, 0 mM; b, 10 mM; c, 25 mM; d, 40 mM) on the separation of OPA-BAs in the PDMS chip. Peak identification: 1) histamine, 2) tyramine, 3) putrescine, 4) tryptamine, IS: internal standard (hydrolyzed dansyl chloride (5-(dimethylamino)naphthalene-1-sulfonic acid)) (with permission [56]).

Although PDMS offers great advantages such as cheap microfabrication techniques (leading to possible mass production and therefore to disposable chips), its ability of bonding reversibly and irreversibly to itself but also to a variety of other materials, and also biocompatibility, much more care is needed to control its surface chemistry to generate a

stable EOF. In this work, EOF in PDMS channels was found to be stable in MEKC conditions with separation performances as good as those on a glass chip. Consequently, this contribution extended the applicability of PDMS microchips to food analysis, an area where glass chips are still dominating. Moreover, resolution and LODs (from 0.05 to 0.5 mg/L) of BAs highlighted the suitability of the on-chip derivatization for a rapid and automated determination of BAs in food. This approach was finally successfully applied to the quantitative evaluation of histamine and tyramine in a red wine, using a cleanup with a strong anion exchanger cartridge before the introduction in the chip.

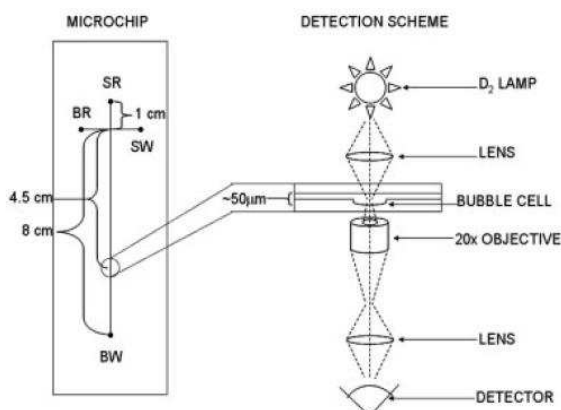
2.2.2 Alkaloids

Alkaloids, which are naturally present in plants, show numerous applications in human medicine at low doses but become toxic at higher doses. For example, colchicine and colchicoside are alkaloids derived from the *Colchicum autumnale* plant that have been used to treat gout and arthritis for more than 2000 years. However, colchicine presents both therapeutic and toxic activity since an overload can lead to vomiting, nausea, diarrhea, and in the worse cases death (lethal dose evaluated between 40-60 mg for a 50-75 kg adult). For the first time in 2006, a CE-microchip coupled to UV detection to analyze colchicine, colchicoside, and their bio-derivatives (thiocolchicine and thiocolchicoside) was reported [57]. UV detection has not been widely used on-chip because of the inherently short path-lengths of channels, resulting in poor sensitivity. This is why, to increase the sensitivity, “bubble cells”, deeper than the separation channel, were integrated during the microfabrication process. As compared to detection within the separation channel, detections through optical cells with average depths 3.5 and 5.5 deeper than that of the separation channel, led to sensitivity enhancements between 2.8 and 3.0 and between 4.4 and 5.8, respectively. Linear responses from 5 to 500 mg/L of colchicine were obtained with LODs ranging from 2 to 6 mg/L, depending on the compound and the dimension of the optical cell. After off-chip liquid-liquid extraction steps, colchicine was determined in spiked milk with documented cases of contamination by the plant toxin. Average recovery rate of 83 % with RSDs of 3.8 % were obtained.

Two years later, in 2008, for the first time, the same group coupled a miniature fiber-optic CCD spectrometer to a quartz microchip for UV-absorbance spectra detection of four toxic alkaloids: colchicine, aconitine, strychnine, and nicotine (Figure I-III-10A) [58]. Sensitive UV-absorbance detection was achieved via the application of on-line electrokinetic preconcentration techniques (micelle stacking) in combination with an etched bubble-cell for increased path-length. The miniature CCD spectrometer allowed the determination of

absorbance spectra, facilitating qualitative and quantitative separations *via* simultaneous spatial and spectral resolutions of solutes. LOQs ranged from 20 to 100 μM , concentrations which are 20-400 times lower than lethal dose, except for aconitine. Finally, the microchip device, combined with an off-chip SPE step, enabled to successfully detect all four toxins in water, fat-free milk, and apple juice samples, spiked with sublethal dose concentrations (Figure I-III-10B). Even if extractions were reproducible ($\text{RSD} < 10\%$), improvement in extraction efficiencies will be needed, given the low recoveries obtained (between 14 and 56 %). However, total analysis time (sample preparation + separation) inferior to 10 min and sensitive analysis of alkaloids were achieved, illustrating that CE-microchips can be applied to a broader range of molecules, not necessarily being limited to those that fluoresce or are electrochemically active. However, further investigation of on-line preconcentration techniques is required to apply this method to routine analysis of toxins in complex food samples.

(A)



(B)

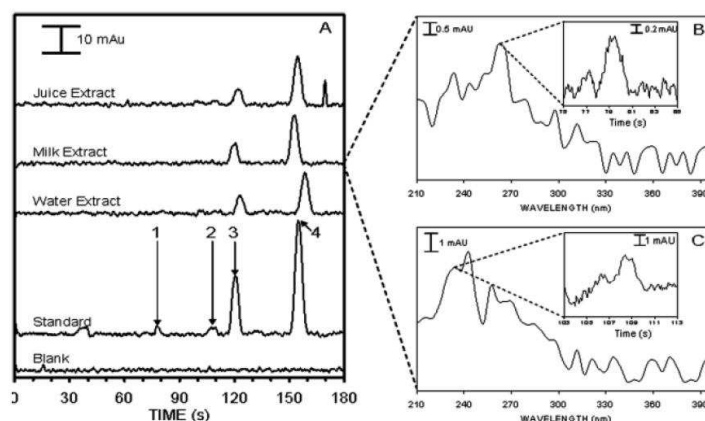


Figure I-III-10. (A) Microchip device integrating UV-absorbance detection. (B) A, electropherograms at 248 nm of SPE extracts of blank, 500 μM standards as well as tap water, skim milk, and apple juice, spiked at 30 μM of each alkaloids: (1) nicotine, (2) aconitine, (3) strychnine, (4) colchicine; B and C, UV-absorbance spectra of nicotine and aconitine, respectively, from milk extract analysis with insets corresponding to peaks of nicotine (261 nm) and aconitine (229 nm), respectively (with permission [58]).

2.2.3 Organic and inorganic ions

A CE-microchip with C^4D detection was proposed for the determination of sodium monofluoroacetate (MFA), an extremely toxic rodenticide, in fruit juices and tap water [59]. Using rapid and simple sample pretreatment steps (filtration and dilution), the total analysis time for MFA anion was no longer than 5 min. Fine optimization of buffer composition enabled to reduce potential interferences from other inorganic and organic anions present in fruit juices, while maximizing the C^4D detection sensitivity of the analyte. Moreover, fruit juices needed to be diluted with water before injection because of their high ionic strength, which induced destacking, and their high sugar content (as high as 1 g/L) that adsorbed on channel walls. After diluting fruit juices at 1:9 ratio, low RSD values (0.16 % in apple juice and 0.29 % in orange juice) were obtained for migration times. Taking into account the dilution factor, LODs ranged from 1 to 2 mg/L, which were adequate for monitoring MFA anion in juice beverages and tap waters. Once again, owing to its inherent advantages (low cost, easy electrode alignment, simplified detector fabrication, absence of electrode fouling, improved isolation of the detector from the separation field etc.), the power of C^4D detection in microchips was demonstrated.

Heavy metals are ubiquitous contaminants in foods and the environment from natural occurrence or industrial and agricultural sources. For human, food products are the main source of heavy metal exposure. Heavy metals have potential for accumulation in the kidney and liver and are characterized by long biological half-lives, posing serious health hazards such as renal failure, symptoms of chronic toxicity, and liver damage. The fast and simultaneous detection of three prominent heavy metals (Pb^{2+} , Cd^{2+} , and Cu^{2+}) using a CE-microchip coupled to direct amperometric detection mode with carbon screen-printed electrodes (CSPEs) was demonstrated [60]. After investigating the injection, separation, and detection conditions, a fast analysis of the three heavy metals took less than 3 min under the best operating conditions, i.e. a 25 mM 2-morpholinoethanesulfonic acid buffer (pH 7.0) and L-histidine, with 1.2 kV separation voltage, and -0.8 V vs Ag/AgCl detection potential. LODs of 1.74, 0.73, and 0.13 μM were calculated for Pb^{2+} , Cd^{2+} , and Cu^{2+} , respectively. When a standard mixture solution was analyzed 10 times, RSD values were inferior to 6 % for peak current and 2 % for migration times, exhibiting good separation and detection performances for prolonged operation. By applying the optimum conditions, 3 spiked juice samples were successfully analyzed with recoveries ranging from 92 to 108 % and RSD values lower than 7 % ($n = 10$), showing good repeatability for the quantitative analysis of real samples. The effect of oxygen using batch system by CSPE compared to that by glassy carbon electrode was studied. Little effect of oxygen on the background signal using CSPEs was noticed,

whereas higher effect of oxygen on the background signal using glassy carbon was found, indicating that the experiment did not need to be performed under oxygen-free conditions. The results showed that this CE-microchip could provide an attractive approach for rapid screening and analysis of different kinds of food containing other metals by simply varying the detection potential. In the future, such a field portable analytical device for metal ions will probably allow the rapid detection of contaminated food or waste materials on site.

Sodium nitrite is a common ingredient added to processed meat and fish as a preservative because it prevents bacterial growth. However, high concentrations of NO_2^- can be damaging to human health causing diabetes and nervous system disorders. Moreover, in the acidic conditions of the stomach, NO_2^- leads to the formation of endogenous carcinogenic N-nitrous compounds (nitrosamines and nitrosamides) implicated in the pathology of gastric cancer. Consequently, fast and accurate analytical methods for the quantitation of NO_2^- in food samples are very necessary. As real food samples contain a large amount of organic and inorganic compounds, a direct analysis of NO_2^- in these matrices remains difficult and extraction and purification steps are thus needed. Nevertheless, given the main disadvantages of conventional extraction and analytical methods (time-consuming, large volumes of reagents/solvents,...), simpler and faster methods to analyze NO_2^- in real samples are increasingly targeted. A CE-microchip with ED using a copper (3-mercaptopropyl)trimethoxysilane (Cu(II)-MPS) complex-modified carbon paste electrode was employed to detect NO_2^- in samples extracted by two off-chip simple and fast extraction techniques (sonication and microwave) [65]. Indeed, Cu(II)-MPS exhibits dual behavior both as thiol and as sol-gel functionalities. The thiol functional group is able to coordinate with copper specifically and therefore copper can be complexed with MPS and can be used as an electrocatalyst for the reduction of NO_2^- . Experimental parameters, affecting both the separation and the detection, such as buffer composition (20 mM acetate buffer with 3 mM cetyltrimethylammonium bromide (to reverse EOF) (pH 5.0)), sample injection time and separation field strength (5 s, -150 V/cm), and detection potential (-190 mV vs Ag/AgCl) were optimized. The performance of this method was demonstrated through the assessment of several criteria such as sensitivity, selectivity, linearity, reproducibility, and recovery. Reproducible responses for the NO_2^- reduction (RSD of 4.3 %) were obtained, revealing the insignificant electrode fouling. The LOD was found to be 0.35 ± 0.05 mg/L with a wide linear range going from 1 to 160 mg/L, when analyzing standard NO_2^- solution. Moreover, no interference from nitrate ions, other inorganic ions, or biological compounds appeared under the optimal experimental conditions. Finally, extracted ham and sausage samples were analyzed using this CE-microchip method and NO_2^- concentrations ranging from 23.3 to

28.2 mg/L for ham and from 9.1 to 12.0 mg/L for sausage, depending on the type and the duration of the extraction, were calculated.

A new study aimed at demonstrating the versatility of Bioanalyzer 2100 and commercially available microchips to perform ITP separations of carboxylic acids with indirect fluorescence detection [66]. This was achieved by quantifying the amount of benzoate anion in soft drinks. Indeed, it is a preserving agent in beverages which reacts with ascorbic acid to form benzene, a carcinogenic compound, the concentration limits of which are regulated in food and beverages. In this work, 8 carboxylate anions (oxalate, pyruvate, fumarate, malate, mandelate, 2-hydroxyisobutyrate, succinate, and acetate) could be separated in less than 150 s with LODs values in the range of 0.12-0.4 mM. However, with a current set at 0 μ A on all unused channels, the repeatability of the ITP system was quite poor, probably because of sample diffusion during the loading step and sample leak into the separation channel during the separation step. Consequently, pinch and pullback currents ($\pm$ 0.05 μ A) were applied to the unused channels, which improved the repeatability of the method (lactate zone length RSD decreased from 8.25 % without to 1.93 % with pinching and pullback). Nevertheless, as the injection volume was reduced, the sensitivity was poorer. Another drawback of this method was its low repeatability during a sequence, evidenced by a decrease in fluorescence intensity of peaks during successive injections. This phenomenon was attributed to an increase in propionate content, coming from the terminating electrolyte, after each separation in the separation channel. Consequently, each successive ITP analysis was initiated with leading electrolyte (LE) containing increased propionate and decreased chloride, β -alanine, and rhodamine 6G, thus decreasing fluorescence intensity and changing concentration of ions in the LE. To solve this problem, it was necessary to either use a new chip for each analysis or flush the channels by applying pressure between runs to completely remove the propionate. However, the analytical potential of this method was proved through the quantitative analysis of benzoate anion in three different soft drinks by standard addition. LOD was 1.15 mM in soft drinks, which was below the regulatory limits (7 mM). The results were validated with a CZE method developed for the analysis of sorbate and benzoate anions in soft drinks.

2.2.4 Sulfonamides

A new, fast, and sensitive CE-microchip method, using cyclic olefin copolymer chips and LIF detection, was developed for the analysis of sulfonamide residues in milk and chicken muscle samples [67]. Due to their antibacterial effects, sulfonamides have been widely added to animal feed, leading to accumulation of these drugs in animal tissues. As high

levels of sulfonamides in food can lead to allergy, carcinogenesis, and formation of resistant bacteria in the human body, many authorities worldwide have set maximum residue limits of these compounds to ensure food safety. This is why the main goal of this study was to develop a method for the fast screening of sulfonamide residues in foods. After an off-chip derivatization using fluorescamine, four sulfonamides (sulfamethazine, sulfamethoxazole, sulfaquinoxaline, and sulfanilamide) were separated in less than 1 min using a buffer composed of 5 mM boric acid and 1 % PVA. LODs between 0.2 and 2.3 $\mu\text{g/L}$ were obtained, which were far below the maximum residue limit. Using a sample preparation still performed off-chip, sulfonamides were successfully determined in real samples (Figure I-III-11); standard addition recoveries of 93.3-100.8 % and 82.9-92.3 % were obtained in milk and chicken muscle samples, respectively. Good repeatability of recoveries was exhibited with RSDs for both intra- ($n = 5$) and inter-day ($n = 3$) below 3.0 %.

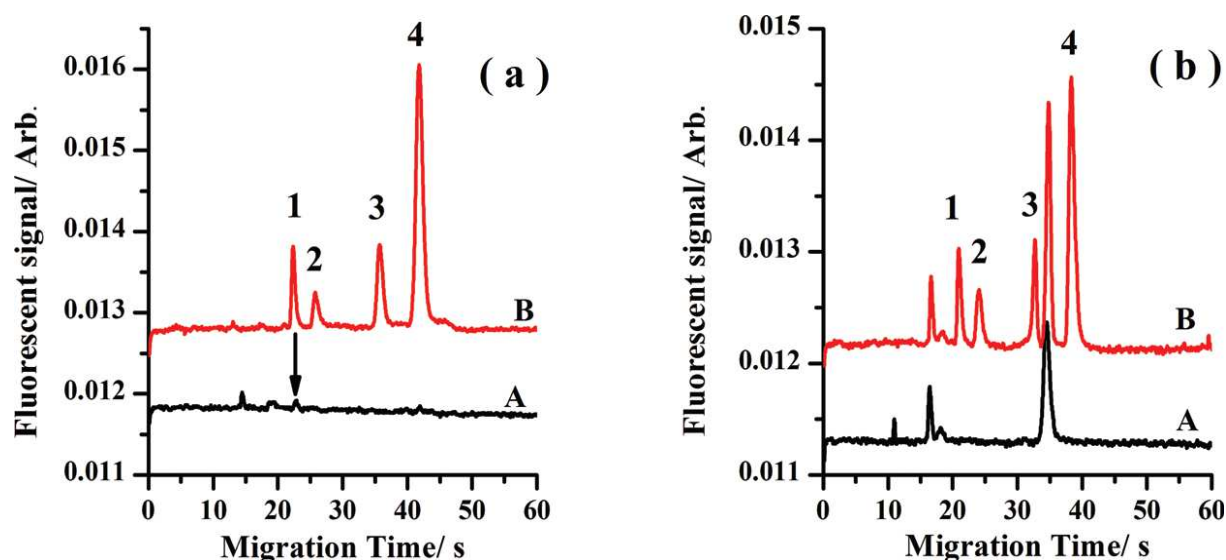


Figure I-III-11. Electropherograms of (a) milk sample (A) unspiked and (B) spiked with sulfonamides at 100 $\mu\text{g/L}$ and of (b) chicken muscle sample (A) unspiked and (B) spiked with sulfonamides at 100 $\mu\text{g/kg}$. Peaks: (1) sulfamethoxazole, (2) sulfaquinoxaline, (3) sulfamethoxazole, and (4) sulfanilamide (with permission [67]).

2.2.5 Proteins

Food allergy represents an important public health problem, which is increasing in prevalence. Currently, there is no treatment for food allergy, it can only be managed by allergen avoidance or treatments of symptoms. Detection of potential allergens in food products is therefore extremely important to enable consumers with allergies to identify any potential allergenic ingredients that may be present. Microchip technology is moving into the field of detection of allergens. For example, the Kunitz Trypsin inhibitor (KTI), the major

trypsin inhibitor in soybean, has been characterized as an anti-nutritional protein and a food allergen in human consumption of soy proteins. This is why, for future breeding programs of soybean cultivars with low levels of KTI, one work compared three methods: one to detect enzyme activity (trypsin inhibitor assay) and two others to quantify the amount of soybean KTI (SDS-PAGE and microchip methods) [64]. Using these methods, KTI was qualitatively and quantitatively determined in 15 soybean experimental lines and varieties. For KTI determination, results demonstrated the superiority of the microchip method, which used Agilent Bioanalyzer 2100, over the two others, in terms of selectivity and sensitivity. Indeed, resolution of all protein bands, especially in the range of low molecular weights such as KTI (average molecular weight: 21.1 kDa), was higher than with SDS-PAGE or with enzymatic assay. Also, the microchip approach detected the presence of the KTI peak in 7 soybean experimental lines, which lacked the KTI band in SDS-PAGE gel, confirming the better sensitivity. Finally, relationships between the KTI content obtained by the microchip method and total trypsin inhibitor enzyme activity were established and statistically confirmed. This study proved that the chip methodology was able to identify and quantitate KTI accurately and quickly (< 23 s) in soybean cultivars.

2.2.6 DNA

Fresh and concentrate orange juices can be contaminated by the thermoacidophilic spore-forming bacterium *Alicyclobacillus acidoterrestris* which have survived the pasteurization process. As such a contamination can lead to considerable food safety problems, an early and fast screening of this bacteria in fruit juices is therefore a major goal for the food industry. The semi-quantitative detection of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in orange juice by reverse transcription (RT)-PCR coupled to gel electrophoresis microchip with LIF detection was developed [61]. In this study, the Agilent Bioanalyzer 2100 in combination with the DNA LabChip1000 kit enabled separation, detection, and quantification of the RT-PCR products. A linear correlation between the amount of contaminating cells and amplicon concentration of RT-PCR products was established. The viability of *A. acidoterrestris* in orange juices was monitored after a treatment with a natural inhibitor (*Sapindus saponaria*), showing a cell diminution in samples.

In another study, a genetic algorithm - support vector regression chemometric approach was applied to optimize a separation method based on gel electrophoresis microchip with LIF detection for the simultaneous analysis of multiplex PCR products of 4 foodborne pathogenic bacteria: *Vibrio parahemolyticus*, *Salmonella*, *Escherichia coli* (*E. coli*) O157:H7, and *Shigella* [62]. The application of the multivariate strategy improved the separation efficiency

of DNA fragments and decreased the separation time (8 min). High sensitivity was also achieved with LODs as low as 120 CFU/mL of *Vibrio parahaemolyticus*, 290 CFU/mL of *Salmonella*, 87 CFU/mL of *E. coli* O157:H7, and 52 CFU/mL of *Shigella*. Different food samples including pork, beef, chicken, shrimp, fish, vegetables, noodles, and rice were artificially inoculated with 2, 3 or 4 pathogens and cultured several hours. After a DNA extraction and a quadruplex PCR amplification, the products of the pathogens were successfully analyzed on-chip under the optimal conditions (Figure I-III-12). Decayed samples were also analyzed: *Shigella* was detected in beef and vegetables, *Salmonella* in pork, and *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp. In this study, as a fast, reliable, and sensitive tool, chips offered an efficient alternative to routine foodborne pathogenic bacteria detection in the assessment of food safety.

Next, a gel electrophoresis chip method using the Agilent Bioanalyzer 2100 was developed for the simultaneous detection of two emerging allergens in foods: sesame and celery, belonging to the list reported in EU Directive 2007/68/EC [63]. The resulting sensitivity was significantly improved by means of an end-point PCR protocol, compared to conventional agarose gel electrophoresis. The obtained LODs were 100 ppm for celery and 1 ppm for sesame. To simulate real samples, home-made meat balls and commercial soup, artificially spiked with different percentages of sesame/celery were successfully analyzed.

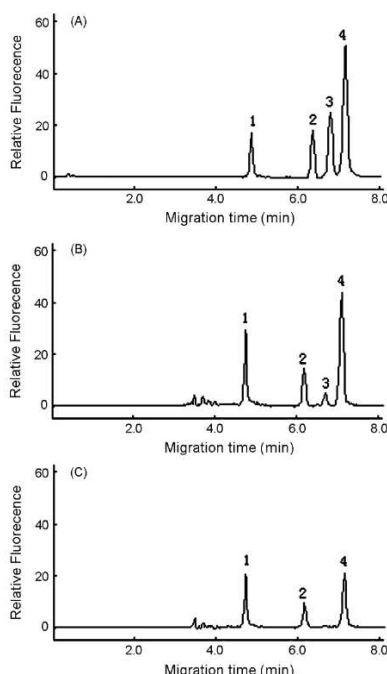


Figure I-III-12. Gel electrophoresis microchip analyses of (A) pork and (B) chicken inoculated with four pathogenic bacteria, and (C) fish inoculated with three pathogenic bacteria. Identification of PCR products: (1) *Vibrio parahaemolyticus*, 175 bp; (2) *Salmonella*, 390 bp; (3) *E. coli* O157:H7, 497 bp; (4) *Shigella*, 620 bp (with permission [62]).

3. Conclusion

Although CE-microchips already play a key role in the bioanalytical and clinical fields, their applications are growing in food analytical community to assess food quality and safety. Indeed, owing to their benefits such as ultrafast separations, extremely low consumption of both sample and reagent, potential portability, and high compatibility with integration of all analytical steps, microfluidic devices will offer a very interesting alternative to well established procedures in food analysis. Given these clear advantages, associated with low cost and high analytical throughput, CE-microchips are entering exciting new areas such as the detection of frauds, checking the authenticity of foods, transgenic food analysis, as well as detection of heavy metals, emerging allergens, toxins, etc.

Simple microchip layouts coupled to ED in both amperometry and conductivity formats or LIF detection are still the most often employed CE-microchip setups. ED still remains prominent due to its high compatibility with miniaturization (without loss of performance) and with microfabrication techniques, high sensitivity, low price and low power requirements.

Nowadays, the inherent complexity of food matrices is being more and more approached using different strategies to enhance the selectivity and the sensitivity of the analyses. Sample pretreatment steps usually include concentration and/or purification steps to extract and preconcentrate the target analyte from the sample matrix. Nevertheless, the pretreatment of real food samples, currently analyzed using microchip technology, are still mainly performed “off-chip”. Indeed, “on-chip” sample pretreatment remains the major challenge in the development of integrated microfluidic analytical devices. A second challenge is the integration of nanomaterials, i.e. carbon nanotubes or magnetic nanoparticles to develop ultra-sensitive detection systems, which are indispensable due to the small path-length of the devices and low concentrations of analytes. Up to now, although CE-microchips are increasingly used with complex food samples, the association of nanotechnologies and total integration is still in its infancy and constitutes a major objective for the future development of microchips. In conclusion, the first chip platforms are working well for DNA or protein analysis, but more sophisticated generations will become a necessity for their future applications in analytical laboratories and in-field.

Table I-III-1. Applications of CE-microchips to food analysis

Class of Analytes	Sample	Separation and detection modes + chip features	BGE	Sample pretreatment	Analytical performances	Observations	Ref.
Antioxidants							
phenolic acids: chlorogenic, gentisic, ferulic, vanillic	Wine	CZE-ED Glass CSPEs (end-channel)	15 mM borate buffer (pH 9.5) with 10 % of MeOH	Filtered and diluted in BGE (7/3, v/v)	Separation time: 300 s RSDs (t_m) $\leq$ 3.0 % (n = 10) RSDs (peak areas) < 7.0 % (n = 10) RSDs (peak heights) $\leq$ 6.1 % (n = 10) LODs = 10 μ M	Real detection of chlorogenic and vanillic acids in unspiked wine No quantitative data	[22]
flavonoids, phenolic acids	Apple and pear skins and pulps, wines, and green tea tablets	CZE-ED Glass (end-channel)	CSEID: 10 mM MES buffer (pH 5) IAD: 10 mM borate buffer (pH 9)	Apples & pears: peeled, extracted (MeOH), centrifuged, and diluted (BGE) Wines: diluted (BGE) Green tea tablets: extracted (MeOH), centrifuged, and diluted (BGE)	CSEID: Separation time < 100 s LODs < 8 μ M IAD: Separation time: 260 s LODs < 6 μ M	Novel concept: CSEID Comparison of CSEID and IAD approaches with traditional methods	[23]
Vitamin C and preservatives (benzoate, sorbate)	Vitamin C tablets, Soft drinks	CZE-C ⁴ D PMMA	Histidine/tartrate buffer (pH 6.5) with 0.06 % HP- β -CD and 0.125 mM CTAB	Beverages: diluted (water or BGE), filtered, and sonicated Vitamin C tablets: dissolved (water) and diluted (BGE)	Separation time < 50 s RSDs (t_m) $\leq$ 0.4 % (n = 5) RSDs (peak areas) $\leq$ 3.5 % (n = 5) LODs: 3-10 mg/L	Quantitative data Method validation	[24]
arbutin, (+)-catechin, ascorbic acid, rutin, phlorizdin	Pear pulps and juices	CZE-ED Glass glassy carbon disk electrode (end-channel)	50 mM borate buffer (pH 9.0)	Pulps: extracted (MeOH), centrifuged, and filtered Juices: centrifuged and filtered	Separation time < 240 s Linear ranges: 50-125 mg/L (arbutin) and 100-250 mg/L (ascorbic acid) Repeatability: RSDs (t_m) < 1 % RSDs (peak areas) $\leq$ 5 % Reproducibility: RSDs (t_m) $\leq$ 3 % RSDs (peak areas) < 10 %	Real detection of arbutin and ascorbic acid No quantitative data	[25]

Class of Analytes	Sample	Separation and detection modes + chip features	BGE	Sample pretreatment	Analytical performances	Observations	Ref.
Catechin, epigallocatechin gallate, epicatechin, epicatecatechin,	Green tea extracts (nutraceutical)	MEKC-ED PDMS Gold electrode (end-channel)	50 mM phosphate buffer (pH 7.0) with 30 mM SDS	Extracted (MeOH/water, 80/20, v/v), filtered, and diluted (BGE)	Separation time: 180 s LODs: 8-14 μ M RSDs (t_M) $\leq$ 4.2 % (n = 3)	Real detection of 4 catechins Quantitative data Results compared to HPLC analysis	[26]
flavonoids, phenolic acids	Tea	CZE-ED SU-8/Pyrex Pt electrode (end-channel)	25 mM sodium acetate buffer (pH 5.0 adjusted with NaOH)	Extracted by maceration with MeOH, filtered, first diluted in MeOH and then in BGE	Separation time < 100 s RSDs (t_M) $\leq$ 2.6 % (n = 3) RSDs (peak height) $\leq$ 2.1 % (n = 3)	CSEID of phenolic acids and flavonoids Good correlations between the HPLC and CE-microchip results Further comparison done with the traditional Folin-Ciocalteu antioxidant capacity assay	[27]
phenolic compounds: tyrosol, hydroxytyrosol, oleuropein glucoside	Olive oil	CZE-ED Glass Gold electrode (end-channel)	15 mM sodium borate buffer (pH 9.5) with 10 % of MeOH	Extracted (n-hexane + MeOH/water (6/4, v/v)) (x 2), evaporated, dissolved (10 mM sodium borate buffer (pH 9.5) with 10 % of MeOH), and filtered	Separation time: 61 s Repeatability (n = 11): RSDs (t_M) < 0.8 % RSDs (peak heights) < 3.7 % Reproducibility (n = 3): RSDs (t_M) < 6.9 % RSDs (peak heights) < 7.9 % LODs: 9-33 μ M (oils)	Sample stacking Real detection of tyrosol and hydroxytyrosol in oils Important and negative matrix effect: standard addition method used for quantitation	[28]
isoflavones	Soy milk and soy tablets	CZE-ED Glass carbon disk electrode (end-channel)	10 mM borate buffer (pH 8)	Extracted by sonication (EtOH), centrifuged, and diluted (BGE)	Separation time < 120 s RSDs (t_M) < 1 % LODs: 5-8 μ M LOQs: 20-30 μ M	No analyte separation: total isoflavone determination Optimization of the detection medium (increased sensitivity) Integrated calibration protocol	[29]

Class of Analytes	Sample	Separation and detection modes + chip features	BGE	Sample pretreatment	Analytical performances	Observations	Ref.
vitamins, vanilla flavors, isoflavones	Fruit, vitamin supplements, and vanilla foods	CZE-ED Glass CNT film based electrode (end-channel)	Vitamins: 10 mM phosphate buffer (pH 7); Polyphenols: 50 mM borate (pH 9); Vanilla flavors: 20 mM borate buffer (pH 9.5); Isoflavones: 10 mM borate (pH 8)	Becozyne tablets: pulverized and dissolved (BGE); Vanilla Pod: chopped, macerated (water + EtOH), and filtered; Apple peel and pulp: extracted separately (MeOH) and centrifuged	Separation time < 300 s LODs: 0.8-12 μ M	CNTs as new electrodes gave better resolution (x 2), and sensitivities (x 4-16) compared to unmodified CSPEs	[30]
Amino acids							
arginine, theanine, glutamine, serine, asparagine	Green Tea	CZE-LIF PMMA	5 mM phosphate buffer with 0.05 mM SDS (pH 5.5)	Extracted (boiled water), filtered, SPE (removal of polyphenols), and derivatized (NBD-F)	Separation time: 120 s RSD chip-to-chip (t_m): 3 % (n = 4)	SPE purification necessary to remove polyphenols preventing AA from derivatization	[31]
Taurine	Energy and sport drinks	CZE-wavelength-resolved fluorescence Glass	50 mM borate buffer (pH 9.3)	Diluted , derivatized (NBD-Cl)	Separation time < 12 s LOD = 1 μ M	Emission spectra recorded Peak purity calculation Method validated by comparison with HPLC-Fluo data	[32]
16 AAs	Sport and jelly-form beverages, tablet-form functional foods	MEKC-LEDIF PMMA or glass	100 mM borate buffer (pH 9.5) with 30 mM SDS and 1 % cationic starch derivative	Beverages: diluted and labeled (NBD-F) Tablet : powdered, diluted (BGE), and labeled (NBD-F)	Total analysis time < 10 min RSDs (t_m) < 2.8 % (except arginine: 7.8 %) Linearity: 10-350 μ M	Comparison between glass and PMMA materials Use of a cationic starch derivative to reduce EOF and AA adsorption	[33]
lysine, methionine, phenylalanine, threonine, valine, tryptophan, leucine	Milk	CZE-LIF Glass	100 mM sodium borate buffer (pH 10.0 adjusted with NaOH)	Dialyzed for 24 h, diluted (20 mM sodium borate), and derivatized (sulfoindocyanine succinimidyl ester)	Separation time < 150 s Linear range: 0.01-1 μ M LODs: 1.0-5.9 nM RSDs (t_m) $\leq$ 4.5 % (n = 5) RSDs (peak heights) $\leq$ 5.4 % (n = 5)	All AAs detected in milk samples except lysine and tryptophan	[34]

Class of Analytes	Sample	Separation and detection modes + chip features	BGE	Sample pretreatment	Analytical performances	Observations	Ref.
Organic and inorganic ions							
23 organic and inorganic acids	Wine	CZE- conductivity detection PMMA	35 mM MES, 3.4 mM Bis-tris, 6 mM Bis-tris propane, 0.2 % PVA, 20 mM α -CD, 10 mM β -CD (pH 5.9)	Filtered and diluted (solution of sodium fluoride (ITP stacker) and N-acetylserine (internal standard))	Separation time: 10 min Reproducibility (n = 25 on 5 days) RSDs (t_m) $\leq$ 2 % RSDs (peak areas) $\leq$ 6.3 % LODs : 120-250 μ g/L	Pre-choice of the BGEs thanks to simulation Complex selectivity optimization in chip ITP stacking	[35]
Cations: Na^+ , Ca^{2+} , K^+ , NH_4^+ , Mg^{2+} , Anions: Cl^- , SO_4^{2-} , oxalate, tartrate, malate, citrate, succinate, acetate, lactate, phosphate, formate, pyruvate, pyroglutamate	Beverages (Tap water, Wine, Beer, Fruit juices, and Milk)	CZE-C ⁴ D PMMA	Inorganic cations: 10.5 mM histidine/50 mM acetic acid/2 mM 18-crown-6 (pH 4.1) Organic and inorganic anions: 10 mM histidine/7 mM glutamic acid (pH 5.75)	Water, wine, beer, and fruit juices: diluted (BGE) and filtered Milk: denaturated (glacial acetic acid), centrifuged, diluted (BGE) and filtered	Inorganic cations: Separation time < 35 s RSDs (t_m) < 0.25 % (n = 6) RSDs (peak areas) < 2.6 % (n = 6) RSDs (peak heights) $\leq$ 1.7 % (n = 6) LODs: 90-200 μ g/L 13 anions: Separation time: 70-90 s RSDs (t_m) < 0.4 % (n = 6) RSDs (peak areas) < 4.6 % (n = 6) RSDs (peak heights) < 1.7 % (n = 6) LODs: 150-2000 μ g/L	Universal electrolyte solution for anionic analyses in beverages Detection cell with low detection volume	[36]
NO_2^-	Ham and sausage	MEKC-ED Glass Cu(II)-MPS complex-modified carbon paste electrode (end-channel)	20 mM acetate buffer, 3 mM CTAB (pH 5.0).	Standard method: chopped, immersed (aqueous solution), heated, cooled, ammonium acetate buffer and water added, and filtered. New methods: sonication or microwave replacing previous heating step,	Analysis time < 200 s RSD (run to run analysis) < 5 % LOD = 0.35 mg/L linear range: Ham: 1.1-155 mg/L Sausage: 1.2-150 mg/L	No interference from 12 other inorganic ions	[65]

Class of Analytes	Sample	Separation and detection modes + chip features	BGE	Sample pretreatment	Analytical performances	Observations	Ref.
Aliphatic amines (methylamine, dimethylamine, trimethylamine, diethylamine, triethylamine)	Fish and shrimp	CZE-C ⁴ D PMMA ChipGenie edition E	histidine/MES buffer 8/2 (pH 6.6)	Extracted by ultrasonic irradiation with a 5 µL drop of BGE and dilution 10-fold in BGE (HS-SDME)	Separation time < 40 s Repeatability: RSDs (peak areas) ≤ 10.4 % (n = 7) Reproducibility: RSDs (peak areas) ≤ 19.8 % (n = 7 on 4 days) LODs < 400 ng/mL Linear ranges: 0.5-10 mg/L	Accelerated decay of shrimp tissue due to improper storage studied Standard addition method used to determine amines in real samples	[37]
MFA	Fruit juices (apple, cranberry, orange), Tap water	CZE-C ⁴ D Glass	20 mM citric acid and L-histidine (pH 3.5)	Fruit juices: filtered and diluted (water)	Analysis time < 120 s RSDs (t _m) < 0.30 % (n = 3) RSDs (peak heights) < 3.6 % (n = 3) LODs: 138-173 µg/L Linear range in juices: 0.5-80 mg/L	Optimization of BGE for avoiding co-migration with interferent ions and promoting sensitivity	[59]
Pb ²⁺ , Cd ²⁺ , Cu ²⁺	Fruit juices	CZE-ED Glass CSPE (end-channel)	25 mM MES buffer (pH 7.0) with 25 mM L-histidine	Blended, centrifuged, filtered, and diluted (BGE)	Separation time < 180 s RSDs (t _m) < 2 % (n = 10) RSDs (peak heights) < 6 % (n = 10) LODs: 1.74, 0.73, and 0.13 µM for Pb ²⁺ , Cd ²⁺ , and Cu ²⁺ Linear range: 0.1-1 mM	CSPE less sensitive to oxygen than glassy carbon one's	[60]
oxalate, pyruvate, fumarate, malate, mandelate, 2-hydroxyisobutyrate, succinate, and acetate, benzoate	Soft drinks	ITP-indirect fluorescence detection Agilent 2100 Bioanalyzer	LE: 20 mM HCl + 1 % PVP + 50 µM rhodamine 6G + β-alanine TE: 50 mM propionic acid	Sonicated for 15 min	LODs: 0.12-0.4 mM (carboxylic acids) LOD: 1.15 mM (benzoate) RSDs (length of lactate step): 8.25 % without and 1.93 % with pinching and pullback	Benzoate quantified by standard addition Results validated with a CZE method	[66]

Class of Analytes	Sample	Separation and detection modes + chip features	BGE	Sample pretreatment	Analytical performances	Observations	Ref.
Vanilla Flavors							
vanillic alcohol, ethyl maltol, maltol, ethyl vanillin, vanillin	Natural vanilla, vanilla sugars, liquid vanilla, and cereal snack	CZE-ED Glass glassy carbon electrode (end-channel)	20 mM borate buffer (pH 9.5)	Natural vanilla: macerated (water and EtOH); Vanilla sugars: diluted (water) and filtered Liquid vanilla: diluted (BGE); Cereal snack: macerated (EtOH)	Separation time: 200 s Repeatability: RSD (peak heights) $\leq$ 9 % Reproducibility: RSD (peak heights) $\leq$ 11 % LODs: 0.09-0.31 mM	Optimization of the detection medium (increased sensitivity) Real detection of vanillin or ethyl vanillin in samples	[38]
Ethyl vanillin and <i>V. planifolia</i> markers (vanillin, p-hydroxy benzaldehyde, vanillic acid, and p-hydroxybenzoic acid)	Natural vanilla beans, vanilla tea, and liquid vanilla	CZE-ED Glass glassy carbon electrode (end-channel)	10 mM borate buffer (pH 9.5)	Vanilla beans: chopped, macerated (water + EtOH), and diluted (BGE) Liquid vanilla: diluted (BGE) Vanilla teas: extracted (hot water) and dissolved (BGE)	Separation time < 300 s Standards: RSDs (t_m) < 5 % (n = 10) RSDs (peak heights) < 5 % (n = 10) Real samples: RSDs (t_m) < 3 % (n = 5) RSDs (peak heights) < 12 % (n = 5) LOQs: 0.06-0.30 mg/L	Screening/confirmatory approaches with reduced analysis times avoiding the need to change the technique from screening to confirmatory mode	[39]
Dyes							
Yellow AB, Red 2G, Sunset Yellow, New Coccine, and Amaranth	Soft drinks and film-coated candies	CZE-ED Glass glassy carbon electrode (end-channel)	10 mM phosphate buffer (pH 11)	Soft drinks: degased and diluted (BGE) Candies: dissolved (BGE), centrifuged, and diluted (BGE)	Separation time < 300 s RSDs (t_m) $\leq$ 1.2 % (n = 10) RSDs (peak areas) $\leq$ 3.2 % (n = 10) LODs: 3.4-15.1 μ M	Real detection of sunset yellow in real samples	[40]
Green S and Patent Blue E6131	Soft drinks and film-coated candies	CZE-ED PDMS carbon fiber electrode (in-channel)	40 mM carbonate–bicarbonate buffer (pH 10.5)	Soft drinks: degased and SPE (C18) Candies: dissolved (water) and SPE (C18)	Separation time < 250 s RSDs (peak heights) = 7 % (n = 7) LODs: 10-17 μ M	Better resolution and higher sensitivity (x 2) for in- compared to end-channel ED	[41]

Class of Analytes	Sample	Separation and detection modes + chip features	BGE	Sample pretreatment	Analytical performances	Observations	Ref.
brilliant blue FCF, indigo carmine, fast green FCF, allura red, amaranth, erythrosine, Ponceau 4R, tartrazine, and sunset yellow FCF	Juice, alcohol, salted fish, noodles, and red pepper powders	MEKC-ED Glass glassy carbon electrode (end-channel)	10 mM phosphate buffer (pH 7.0) with 10 mM SDS	SPE (C18), filtered, pH adjusted to 8.0 with NaOH, and diluted (100-fold with 1.0 mM phosphate (pH 8.0))	Separation time < 240 s RSDs (t_M) < 3.5 % (n = 5) RSDs (peak heights) < 8.0 % (n = 5) LODs: 1.0-5.0 nM	On-chip preconcentration Three parallel channels: FASS, FASI, and MEKC-ED steps sensitivity x 10 800	[42]
Biogenic amines							
ethanolamine, tryptamine, and tryptophane	Beer	CZE-ED Glass glassy carbon electrode with Ru-based film (end-channel)	20 mM phosphate buffer (pH 2.5)	Degased, filtered, and diluted (BGE)	Separation time < 500 s RSDs (peak heights) ≤ 3.6 % LODs: 1.4-6.8 mg/L Linear range: 50-500 µM	Optimization of the detection medium Only class separation (aliphatic amines, heterocyclic amines, and AA)	[54]
tyramine and histamine	Wine, sake, and beer	CZE-LIF Glass Mars Organic Analyzer	8 mM Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃ buffer (pH 10.4)	Labeled (fluorescamine) and diluted (BGE)	Separation time < 120 s	Portable device	[55]
histamine, tyramine, putrescine, tryptamine	Wine	MEKC-LIF PDMS (chip with pre-column derivatization)	25 mM sodium borate buffer (pH 10.0) with 25 mM SDS and 5 % MeOH	SPE (strong anion exchanger cartridges), and diluted (BGE) Derivatized on-chip with OPA	Separation time < 60 s Repeatability (n = 5): RSDs (t_M) < 0.6 % RSDs (peak areas) ≤ 1.6 % Reproducibility (n = 5): RSDs (t_M) ≤ 7.0 % RSDs (peak areas) < 9.5 % Linear range: 0.2-40 mg/L for histamine and tyramine, 0.4-40 mg/L for putrescine, and 1-80 mg/L for tryptamine LODs: 0.05-0.5 mg/L	New PDMS-bonding technique (oxidation by corona discharge) On-chip derivatization Optimization of the reaction chamber design PDMS as good as glass chip in the same reaction and separation conditions	[56]

Class of Analytes	Sample	Separation and detection modes + chip features	BGE	Sample pretreatment	Analytical performances	Observations	Ref.
Alkaloids							
colchicine, thiocolchicine, colchicoside, thiocolchicoside	Milk	MEKC-UV Quartz	25 mM CHES buffer (pH 9.0) with 10 mM SDS	Mixed with phosphate buffer (pH 8), extracted twice (CH ₂ Cl ₂), centrifuged, dried organic phases dissolved (MeOH), filtered, evaporated, and dissolved (BGE)	Colchicine: linearity: 5-500 mg/L LODs: 2-6 mg/L LOD (in milk with extraction) = 660 µg/L	Optical cells with extended path-lengths integrated into the separation channel: better sensitivity (x 5) Comparison between two optical cells of different dimensions	[57]
colchicine, nicotine aconitine, strychnine,	Water, milk, and apple juice	MEKC-UV Quartz	10 mM Tris base buffer with 80 mM sodium cholate	Acidified (HNO ₃), centrifuged, SPE, and sodium acetate in BGE added	Separation time < 200 s LOQs: 20-100 µM LOQs (SPE included): 9-86 µM	Chip with bubble-cell for increased path-length and coupled to portable CCD spectrometer On-line micelle stacking	[58]
Sulfonamides							
sulfamethazine, sulfamethoxazole, sulfaquinoxaline, sulfanilamide	Milk and chicken muscle	CZE-LIF COC	5 mM boric acid buffer with 1 % (w/v) PVA	Milk: acidified, diluted (MeOH), vortexed, sonicated, filtered, and derivatized (fluorescamine); Chicken: homogenized, extracted (ACN), vortexed, sonicated, filtered, evaporated, and dissolved (ammonium acetate + ACN saturated n-hexane), lower ACN layer filtered and derivatized	Separation time: 1 min LODs: 0.2-2.3 µg/L RSDs (t _m) < 1 % (n = 5) RSDs (peak areas) < 3 % (n = 5)	Real detection of sulfamethoxazole in milks	[67]
Proteins							
lysocyme, conalbumin, ovalbumin	Chicken egg whites	CZE-deep UV fluorescence Fused-silica	40 mM phosphate buffer (pH 3.0) PVA-coated chips	Diluted (10-fold in water)	Separation time < 100 s	No quantitative data Real detection of 3 unlabeled proteins in egg whites	[43]

Class of Analytes	Sample	Separation and detection modes + chip features	BGE	Sample pretreatment	Analytical performances	Observations	Ref.
water-soluble proteins	Muscle tissues from farmed and wild fishes	CGE-LIF Agilent 2100 Bioanalyzer	Protein 50 and Protein 200+ LabChip kits	Tissues: reduced to little pieces, water added, homogenized, and centrifuged	Separation time < 60 s	Results demonstrated that aquaculture induced significant chemical and biochemical differences in fish muscle and therefore had an impact on food quality	[44]
polypeptides	Wheat and other crops (grains and legumes)	CGE-LIF Agilent 2100 Bioanalyzer	Protein 200+ LabChip kit	Extracted and centrifuged	10 samples in 30 min Total analysis time (extraction, centrifugation and analysis) for 10 samples < 1 h Reproducibility for 1 extract: RSD (peak height and apparent molecular size) < 1 % (n = 10) Reproducibility for multiple extractions of 1 sample: RSD < 2 %	Distinction between 40 wheat varieties Good resolution of proteins from different crops	[45]
whey proteins (β -lactoglobulin, α -lactalbumin, and serum albumin)	Milk	CGE-LIF Agilent 2100 Bioanalyzer	Protein 80 series II kits	Milk: centrifuged to obtain whey, diluted (water), filtered, denatured, and diluted (water)	Analysis time < 3 min Repeatability (n = 10): RSDs (t_m) < 0.2 % RSDs (peak areas) $\leq$ 11.3 % Reproducibility (n = 30 over 3 chips): RSDs (t_m) < 1 % RSDs (peak areas) < 12 %	Quantitation in 40 Mediterranean water buffalo milks Validation of HPLC and MCE procedures and comparisons	[46]
α -lactoalbumin, β -lactoglobulin, caseins	Milk	CGE-LIF Agilent 2100 Expert Bioanalyzer	Protein 200+ LabChip kit	Milk: diluted (0.3 M NaCl, 0.2 % w/w Triton-100), centrifuged, acidified, labeled with Cy5, and denatured	Analysis time < 45 s	Better sensitivities (x 50–100) of double staining method (double fluorescent dye) than single one Double-staining method: possible quantitation	[47]

Class of Analytes	Sample	Separation and detection modes + chip features	BGE	Sample pretreatment	Analytical performances	Observations	Ref.
α -lactalbumin, lactoferrin, immunoglobulin G, β -lactoglobulins (β -LgA and β -LgB)	Infant milk	2D-microchip IEF/t-ITP/CZE-UV PMMA	IEF buffer: 8 M urea, 2 % pharmalyte, 1 % Triton X100, 0.1 g/L PEO, 0.5 g/L HEMC, 0.25 % TEMED. Anolyte: 50 mM HAc, 0.1 g/L PEO, and 0.5 g/L HEMC (pH 3.0). Catholyte: 40 mM NaOH, 0.1 g/L PEO, and 0.5 g/L HEMC (pH 10.0). LE: 50 mM Tris-HCl, 0.1 g/L PEO, and 0.5 g/L HEMC (pH 7.9). TE: 50 mM HAc, 0.1 g/L PEO, and 0.5 g/L HEMC (pH 3.0) BGE for CZE: LE	Dissolved (IEF buffer) and centrifuged	Total time: 18 min Linear range: 0.005-2 mg/mL LODs: 2.3-10 mg-protein/100 g-infant milk RSDs (peak area) $\leq$ 4.9 % (n = 3) (standards) RSDs (peak area) $\leq$ 5.3 % (n = 3) (milk)	1 st step : 1-D IEF to isolate 2 fractions of minor functional proteins from the major protein casein 2 nd and 3 rd steps: 2D t-ITP/CZE (x 2) 60 folds enrichment of isolated protein fractions	[48]
α -lactalbumin, β -lactoglobulin, BSA	Milk	CGE-LIF SU-8	5 mM borate buffer (pH 8.5), 3.5 mM SDS with 10 % dextran (sieving polymer) and 10 % (v/v) EOTrol LN (acrylamide derivative) (coating agent)	UHT milk: precipitated (acid), filtered, and derivatized Raw milk: heated and centrifuged (fat removal), precipitated (acid), centrifuged, filtered, and derivatized	Separation time < 300 s LODs: 17-70 nM Repeatability: RSDs (t_m) $\leq$ 4 % (n = 3) Reproducibility: RSDs (t_m) $\leq$ 10 % (n = 3)	Real detection of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in UHT and raw milks	[49]
5 β -casomorphins	Cheese	CZE-LIF Glass	15 mM boracic acid-sodium borate buffer (pH 10.5)	Mixed with pepsase and HCl, centrifuged, adjusted to pH 7, filtered, and derivatized (FITC)	Separation time < 30 min RSD (t_m) < 4 % (n = 5) RSDs (peak areas) < 6 % (n = 5) LODs: 18.7-75.1 nM Recoveries: 89-109 %	Real detection of 2 β -casomorphins in cheese	[50]

Class of Analytes	Sample	Separation and detection modes + chip features	BGE	Sample pretreatment	Analytical performances	Observations	Ref.
Protein (Kunitz trypsin inhibitor)	Soybean	CGE-LIF Agilent 2100 Bioanalyzer	Protein 230+ LabChip kit	Seed powder: extracted (30 mM Tris-HCl at pH 8.0 containing 0.01 M β -mercaptoethanol), centrifuged, mixed with sample buffer containing lithium dodecylsulfate, diluted in water, and heat-denatured	Separation time < 23 s	Better selectivity of the microchip method than the SDS-PAGE one Real detection of KTI peak in 7 soybean experimental lines which lacked the KTI band in SDS-PAGE gel: better sensitivity of the microchip method than the SDS-PAGE one	[64]
DNA							
Mitochondrial 12S rRNA	Game and domestic meats	CGE-LIF Agilent 2100 Bioanalyzer	DNA-1000 LabChip kit	DNA extracted and amplified by PCR-RFLP	Up to 12 samples can be tested in a single run (1–2 h)	Discrimination of DNA fragments ranging from 25 to 1000 bp Small DNA fragments detected compared to traditional agarose gels	[51]
DNA	Coffee Arabica and Robusta green beans	CGE-LIF Agilent 2100 Bioanalyzer	DNA-1000 LabChip kit	DNA extracted and amplified by PCR-RFLP	Analysis time: 12 samples per h after the restriction digest step LOD for Robusta inclusion: 5 %	Detection of contamination of Arabica coffees with Robusta ones	[52]
DNA	GM and non-GM maize	CGE-LIF Glass DBCE-100 (Digital Bio Technology)	Trisborate EDTA (pH 8.3), 0.5 mg/L ethidium bromide with 2.5 % 2-HEC (sieving matrix)	DNA extracted and amplified by PCR	Analysis time < 30 s LODs $\leq$ 0.077 %	PFSG: 4 times faster than under a constant electric field strength Differentiation of GM maize and non-GM maize	[21]
DNA	GM rice	CGE-LIF Glass Multi-channel (3 parallel separation channels)	Trisborate EDTA (pH 8.4), 0.5 mg/L ethidium bromide with 1.0 % PVP (coating matrix) and 0.7 % PEO (sieving matrix)	DNA extracted and amplified by PCR	Separation time < 300 s	PFSG: 3 times faster than conventional CE-microchip method without loss of resolution Varieties of rice mutants identified in 4 min: more than 15 times faster than for traditional slab gel electrophoresis	[53]

Class of Analytes	Sample	Separation and detection modes + chip features	BGE	Sample pretreatment	Analytical performances	Observations	Ref.
DNA of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Escherichia coli</i> 0157:H7 and <i>Shigella</i>	Pork, beef, chicken, shrimp, fish, vegetables, noodle, and rice	CGE-LIF PMMA	148 mM Tris-Borate-EDTA (pH 8.5), HPMC 2.5 %, ethidium bromide 12.5 μ M	DNA extracted and amplified by quadruplex PCR	Analysis time < 8 min RSDs (t_m) < 2.1 % (n = 6) LODs: 52-290 CFU/mL	Chemometric approach (genetic algorithm-support vector regression) to optimize separation	[62]
DNA of allergens (sesame, celery)	Meat balls and commercial soup	CGE-LIF Agilent 2100 Bioanalyzer	DNA-1000 LabChip kit)	DNA extracted and DNA fragments sized	Analysis time < 30 min LOD = 1 mg/L in sesame and 100 mg/L in celery	Sensitivity improvement using end-point PCR protocol, by replacing conventional agarose gel electrophoresis with CE-microchip	[63]
DNA of <i>Alicyclobacillus Acidoterrestris</i>	Orange juices	CGE-LIF Agilent 2100 Bioanalyzer	DNA-1000 LabChip kit	DNA extracted and amplified by RT-PCR	Linear range: 2×10^5 – 2 CFU/mL	Linear correlation between the amount of contaminating cells and amplicon concentration Cell diminution verified in orange juices treated with a natural inhibitor	[61]

AAs: amino acids, BGE: background electrolyte, BSA: bovine serum albumin, CD: cyclodextrin, CCD: charge-coupled device, C⁴D: capacitively coupled contactless conductivity detector, CHES: 2-[N-cyclohexylamine]ethanesulfonic acid, CNT: carbon nanotube, COC: cyclic olefin copolymer, CSEID: class-selective electrochemical index determination, CSPE: carbon screen-printed electrode, CTAB: cetyl trimethyl ammonium bromide, Cu(II)-MPS: copper (3-mercaptopropyl) trimethoxysilane, CZE: capillary zone electrophoresis, ED: electrochemical detection, EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid, EOF: electroosmotic flow, FASI: field-amplified sample injection, FASS: field-amplified sample stacking, FITC: fluorescein isothiocyanate, Fluo: fluorescence detection, GM: genetically modified, HAc: active acetate, HEC: hydroxyethyl cellulose, HEMC: hydroxyethyl methyl cellulose, HP- β -CD: hydroxypropyl-beta-CD, HPLC: high performance liquid chromatography, HPMC: hydroxypropyl methyl cellulose, HS-SDME: headspace single-drop microextraction, IAD: individual antioxidant determination, IEF: isoelectrofocusing, ITP: isotachopheresis, LE: leading electrolyte, LEDIF: light emitting diode-induced fluorescence detection, LIF: laser-induced fluorescence detection, LODs: limits of detection, LOQs: limits of quantitation, MEKC: micellar electrokinetic chromatography, MES: 2-morpholinoethanesulfonic acid, MFA: monofluoroacetate, NBD-F: 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole, NBD-Cl: 4-chloro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole, OPA: o-phthalaldehyde, PCR: polymerase chain reaction, PCR-RFLP: PCR-restriction fragment length polymorphism, PDMS: polydimethylsiloxane, PEO: poly(ethylene oxide), PFSG: programmed field strength gradient, PMMA: polymethyl methacrylate, PVP: poly(vinylpyrrolidone), RT-PCR: reverse transcription-PCR, PVA: poly(vinyl alcohol), SDS: sodium dodecyl sulfate, SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SPE: solid-phase extraction, TE: terminating electrolyte, TEMED: N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine, t-ITP: transient isotachopheresis, t_m : migration time, UHT: ultra-high-temperature

References

- [1] A. Manz, N. Graber, H.M. Widmer, *Sens. Actuators, B* 1 (1990) 244-248.
- [2] P.-A. Auroux, D. Lössifidis, D.R. Reyes, A. Manz, *Anal. Chem.* 74 (2002) 2637-2652.
- [3] A.J. Gawron, R.S. Martin, S.M. Lunte, *Eur. J. Pharm. Sci.* 14 (2001) 1-12.
- [4] J.P. Kutter, *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 352-363.
- [5] D.R. Reyes, D. Lössifidis, P.-A. Auroux, A. Manz, *Anal. Chem.* 74 (2002) 2623-2636.
- [6] T. McCreedy, *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 396-401.
- [7] T. Chován, A. Guttman, *Trends Biotechnol.* 20 (2002) 116-122.
- [8] J. Rossier, F. Reymond, P.E. Michel, *Electrophoresis* 23 (2002) 858-867.
- [9] S.A. Soper, S.M. Ford, S. Qi, R.L. McCarley, K. Kelly, M.C. Murphy, *Anal. Chem.* 72 (2000) 642 A-651 A.
- [10] L.J. Kricka, *Clin. Chim. Acta* 307 (2001) 219-223.
- [11] Y. Liu, C.D. Garcia, C.S. Henry, *Analyst* 128 (2003) 1002-1008.
- [12] K. Huikko, R. Kostianen, T. Kotiaho, *Eur. J. Pharm. Sci.* 20 (2003) 149-171.
- [13] D. Wu, J. Qin, B. Lin, *J. Chromatogr. A* 1184 (2008) 542-559.
- [14] G. Chen, Y. Lin, J. Wang, *Talanta* 68 (2006) 497-503.
- [15] L. Marle, G.M. Greenway, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 795-802.
- [16] A. Escarpa, M.C. González, A.G. Crevillén, A.J. Blasco, *Electrophoresis* 28 (2007) 1002-1011.
- [17] A. Escarpa, M.C. González, M.A. López Gil, A.G. Crevillén, M. Hervás, M. García, *Electrophoresis* 29 (2008) 4852-4861.
- [18] Y.T. Atalay, S. Vermeir, D. Witters, N. Vergauwe, B. Verbruggen, P. Verboven, B.M. Nicolai, J. Lammertyn, *Trends Food Sci. Technol.* 22 (2011) 386-404.
- [19] M. Asensio-Ramos, J. Hernández-Borges, A. Rocco, S. Fanali, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 3764-3800.
- [20] A. Martín, D. Vilela, A. Escarpa, *Electrophoresis* 33 (2012) 2212-2227.
- [21] K.S. Kumar, S.H. Kang, *Electrophoresis* 28 (2007) 4247-4254.
- [22] M. Scampicchio, J. Wang, S. Mannino, M.P. Chatrathi, *J. Chromatogr. A* 1049 (2004) 189-194.
- [23] N. Kovachev, A. Canals, A. Escarpa, *Anal. Chem.* 82 (2010) 2925-2931.
- [24] W.S. Law, P. Kubáň, J.H. Zhao, S.F.Y. Li, P.C. Hauser, *Electrophoresis* 26 (2005) 4648-4655.
- [25] A.J. Blasco, I. Barrigas, M.C. González, A. Escarpa, *Electrophoresis* 26 (2005) 4664-4673.
- [26] R.W. Hompesch, C.D. Garcia, D.J. Weiss, J.M. Vivanco, C.S. Henry, *Analyst* 130 (2005) 694-700.
- [27] R. Castañeda, D. Vilela, M.C. González, S. Mendoza, A. Escarpa, *Electrophoresis* 34 (2013) 2129-2135.
- [28] M.d.P. Godoy-Caballero, M.I. Acedo-Valenzuela, T. Galeano-Díaz, A. Costa-García, M.T. Fernández-Abedul, *Analyst* 137 (2012) 5153-5160.
- [29] A.J. Blasco, A.G. Crevillén, P. de la Fuente, M.C. González, A. Escarpa, *Analyst* 132 (2007) 323-329.
- [30] A.G. Crevillén, M. Avila, M. Pumera, M.C. González, A. Escarpa, *Anal. Chem.* 79 (2007) 7408-7415.
- [31] M. Kato, Y. Gyoten, K. Sakai-Kato, T. Toyo'oka, *J. Chromatogr. A* 1013 (2003) 183-189.
- [32] S. Gotz, T. Revermann, U. Karst, *Lab Chip* 7 (2007) 93-97.
- [33] H. Ueno, J. Wang, N. Kaji, M. Tokeshi, Y. Baba, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 898-903.
- [34] M. Wu, S. Cheng, G. Li, Z. Wang, Q. Wang, P. He, Y. Fang, *Chin. J. Chem.* 30 (2012) 2517-2521.
- [35] M. Masár, K. Poliaková, M. Danková, D. Kaniansky, B. Stanislawski, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 905-914.
- [36] P. Kubáň, P.C. Hauser, *Electrophoresis* 26 (2005) 3169-3178.
- [37] J.J.P. Mark, A. Kumar, H. Demattio, W. Hoffmann, A. Malik, F.-M. Matysik, *Electroanalysis* 23 (2011) 161-168.
- [38] M. Ávila, M.C. González, M. Zougagh, A. Escarpa, Á. Ríos, *Electrophoresis* 28 (2007) 4233-4239.
- [39] M. Ávila, M. Zougagh, A. Escarpa, A. Ríos, *Electrophoresis* 30 (2009) 3413-3418.
- [40] N. Dossi, E. Piccin, G. Bontempelli, E. Carrilho, J. Wang, *Electrophoresis* 28 (2007) 4240-4246.
- [41] N. Dossi, R. Toniolo, A. Pizzariello, S. Susmel, F. Perennes, G. Bontempelli, *J. Electroanal. Chem.* 601 (2007) 1-7.
- [42] K.-S. Lee, M.J.A. Shiddiky, S.-H. Park, D.-S. Park, Y.-B. Shim, *Electrophoresis* 29 (2008) 1910-1917.
- [43] P. Schulze, M. Ludwig, F. Kohler, D. Belder, *Anal. Chem.* 77 (2005) 1325-1329.
- [44] G. Monti, L. De Napoli, P. Mainolfi, R. Barone, M. Guida, G. Marino, A. Amoresano, *Anal. Chem.* 77 (2005) 2587-2594.
- [45] S. Uthayakumaran, I.L. Batey, C.W. Wrigley, *J. Cereal Sci.* 41 (2005) 371-374.
- [46] J.N. Buffoni, I. Bonizzi, A. Pauciullo, L. Ramunno, M. Feligini, *Food Chem.* 127 (2011) 1515-1520.

- [47] H. Okada, N. Kaji, M. Tokeshi, Y. Baba, *Electrophoresis* 29 (2008) 2533-2538.
- [48] R. Wu, Z. Wang, W. Zhao, W.S.-B. Yeung, Y.S. Fung, *J. Chromatogr. A* 1304 (2013) 220-226.
- [49] M. del Mar Barrios-Romero, A.G. Crevillén, J.C. Diez-Masa, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 2530-2537.
- [50] Z. Wang, W. Wang, W. Wang, L. Xu, G. Chen, F. Fu, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 196-201.
- [51] V. Fajardo, I. González, J. Dooley, S. Garret, H.M. Brown, T. García, R. Martín, *J. Sci. Food Agric.* 89 (2009) 843-847.
- [52] S. Spaniolas, S.T. May, M.J. Bennett, G.A. Tucker, *J. Agric. Food. Chem.* 54 (2006) 7466-7470.
- [53] H. Nan, S.-W. Lee, S.H. Kang, *Talanta* 97 (2012) 249-255.
- [54] N. Dossi, R. Toniolo, A. Pizzariello, S. Susmel, G. Bontempelli, *Electrophoresis* 32 (2011) 906-912.
- [55] C.N. Jayarajah, A.M. Skelley, A.D. Fortner, R.A. Mathies, *Anal. Chem.* 79 (2007) 8162-8169.
- [56] K.W. Ro, K. Lim, H. Kim, J.H. Hahn, *Electrophoresis* 23 (2002) 1129-1137.
- [57] Q. Lu, C.L. Copper, G.E. Collins, *Anal. Chim. Acta* 572 (2006) 205-211.
- [58] C.I.D. Newman, B.C. Giordano, C.L. Copper, G.E. Collins, *Electrophoresis* 29 (2008) 803-810.
- [59] Q. Lu, P. Wu, G.E. Collins, *Electrophoresis* 28 (2007) 3485-3491.
- [60] O. Chailapakul, S. Korsrisakul, W. Siangproh, K. Grudpan, *Talanta* 74 (2008) 683-689.
- [61] M. Funes-Huacca, L.C. Regitano, O. Mueller, E. Carrilho, *Electrophoresis* 25 (2004) 3860-3864.
- [62] Y. Li, Y. Li, B. Zheng, L. Qu, C. Li, *Anal. Chim. Acta* 643 (2009) 100-107.
- [63] J.D. Coisson, E. Cereti, C. Garino, M. D'Andrea, M. Recupero, P. Restani, M. Arlorio, *Food Res. Int.* 43 (2010) 1237-1243.
- [64] A.M. Torbica, D.R. Živančev, Z.T. Nikolić, V.B. Đorđević, B.G. Nikolovski, *J. Agric. Food. Chem.* 58 (2010) 7980-7985.
- [65] M.J.A. Shiddiky, K.-S. Lee, J. Son, D.-S. Park, Y.-B. Shim, *J. Agric. Food. Chem.* 57 (2009) 4051-4057.
- [66] P. Smejkal, M.C. Breadmore, R.M. Guijt, F. Foret, F. Bek, M. Macka, *Electrophoresis* 33 (2012) 3166-3172.
- [67] L. Wang, J. Wu, Q. Wang, C. He, L. Zhou, J. Wang, Q. Pu, *J. Agric. Food. Chem.* 60 (2012) 1613-1618.

CONCLUSION

La détermination des HAP dans les huiles alimentaires présente plusieurs difficultés liées à leur forte hydrophobie, à la complexité des mélanges qu'ils sont susceptibles de former et à leur faible niveau de concentration (de l'ordre du $\mu\text{g/kg}$). Ces caractéristiques rendent les étapes d'extraction et de pré-concentration particulièrement délicates. De plus, les techniques analytiques mises en œuvre doivent être sensibles et sélectives.

La préparation de l'échantillon fait majoritairement intervenir une étape d'extraction sur phase solide (SPE) avec des supports conventionnels de type C18, Florisil, silice, C18/Florisil, polystyrène/divinylbenzène etc. Ces types de phases souffrent d'un manque de sélectivité qui peut engendrer des co-extractions de composés interférents de polarité similaire aux HAP. Ainsi, il est généralement nécessaire d'ajouter une étape d'extraction liquide/liquide avant l'étape de SPE. Les extraits sont ensuite le plus souvent analysés en chromatographie en phase liquide couplée à une détection par fluorescence, qui a l'avantage d'être plus sensible et plus sélective que la détection UV. Le mécanisme de séparation étant alors uniquement basé sur des différences d'hydrophobie des HAP, il est parfois difficile d'atteindre des sélectivités suffisantes. Ainsi, l'analyse de mélanges complexes d'HAP comme celui composé des 15+1 HAP EU, ciblés dans les matrices alimentaires, nécessite d'avoir recours à des gradients d'élution complexes et/ou une mise en série de plusieurs détecteurs. Aujourd'hui, la chromatographie en phase gazeuse couplée à une détection par spectrométrie de masse constitue la principale technique alternative pour l'analyse des HAP dans les huiles. Elle permet de détecter les HAP non fluorescents et cela avec de grandes sensibilités de détection. Cependant, l'utilisation de colonnes traditionnelles (5% phényl/ 95 % méthylpolysiloxane) rend difficile la séparation de certaines paires d'HAP et les composés lourds, tels que les dibenzopyrènes de la liste des 15+1 HAP EU, interagissent trop fortement avec la phase, dégradant alors les limites de quantification. L'utilisation de phases plus polaires paraît alors plus adaptée. Aujourd'hui, bien que ces techniques permettent d'analyser les HAP dans les huiles avec des sélectivités et des sensibilités suffisantes, les temps d'analyse restent élevés (de l'ordre de 35 à 50 min).

Dans le cadre de cette étude bibliographique, l'électrophorèse capillaire (CE) s'est affirmée comme une technique alternative intéressante aux méthodes chromatographiques. Parmi les différents modes électrophorétiques appliqués à l'analyse des HAP, l'électrophorèse capillaire de zone modifiée par des cyclodextrines (CD-CZE) et l'électrochromatographie (CEC) sont apparus comme les plus prometteurs. En effet, la chromatographie électrocinétique micellaire (MEKC), qui sépare les HAP en fonction de différences d'hydrophobie, ne permet pas d'atteindre des sélectivités suffisantes. Cela s'explique par le

caractère hydrophobe des HAP qui impose de travailler en présence de quantités élevées de solvants organiques dans l'électrolyte pour atteindre une bonne solubilité des HAP et, par conséquent, une bonne répétabilité des analyses. Afin d'obtenir une séparation des HAP suffisante, les tensioactifs doivent alors être ajoutés en grandes concentrations dans l'électrolyte, ce qui augmente le temps de l'analyse et dégrade sa sélectivité. L'ajout de cyclodextrines n'a pas été suffisant pour pallier ce manque de sélectivité. En revanche, le mode CD-CZE a permis de séparer des mélanges complexes d'HAP en des temps d'analyse beaucoup plus courts. Avant notre contribution, le mélange le plus complexe alors étudié en CD-CZE était constitué des 16 HAP US-EPA, d'intérêt pour les analyses environnementales. Cette méthode a d'ailleurs été appliquée à l'analyse d'un échantillon réel de sol. Néanmoins, des problèmes de solubilité des HAP dans l'électrolyte et donc de répétabilité (adsorption des HAP sur les parois du capillaire) ont été identifiés. La CEC a également démontré de bonnes performances de séparation des HAP à travers l'utilisation de phases stationnaires particulières ou monolithiques organiques synthétisées *in situ*. Toutefois, cette technique, bien que prometteuse, reste à l'heure actuelle naissante et dans la quasi-totalité des études les HAP sont utilisés comme mélanges modèles pour la caractérisation des phases stationnaires.

Récemment, les méthodes d'analyse en CD-CZE et CEC des HAP en solution standard ont été transposées avec succès au format microsystème. Dans ce format, jusqu'ici, seule la CD-CZE a été appliquée à des échantillons réels, des échantillons d'eaux provenant d'un lac ou de cheminées hydrothermales. Cependant, ces nouvelles approches ne devraient cesser de se développer. En effet, pour pallier à l'encombrement des systèmes d'analyse communément employés, on assiste aujourd'hui à l'essor des microsystèmes analytiques. Plus particulièrement, ce sont les microsystèmes électrophorétiques qui font leur entrée dans le domaine des analyses alimentaires. Ainsi, différents types d'analytes (antioxydants, acides aminés, protéines, ADN, métaux lourds, etc) présents dans des matrices très diversifiées (boissons, œufs, poissons, viandes, fromage, etc) ont déjà été analysés en électrophorèse capillaire en format microsystèmes, en vue de contrôler la qualité des aliments ou d'en assurer la sécurité sanitaire. De part la complexité des matrices alimentaires, plusieurs approches ont été suivies pour améliorer la sélectivité et la sensibilité de l'analyse, comme l'intégration des étapes de prétraitement sur puce ou encore l'utilisation d'outils de la nanotechnologie pour la détection. Ce champ d'application est néanmoins naissant ; les matrices actuellement analysées restent simples et les étapes de préparation de l'échantillon sont majoritairement réalisées hors de la puce. Le développement de Lab-on-a-chip totalement intégrés demeure donc un défi majeur dans le domaine de l'analyse des aliments.

Cette synthèse bibliographique démontre qu'aucune étude sur l'analyse en CE des 15+1 HAP EU n'a été rapportée. Ce mélange a pourtant un intérêt majeur puisqu'il a été identifié comme prioritaire par l'agence européenne de sécurité sanitaire des aliments. De plus, il est constitué d'HAP plus hydrophobes et d'un plus grand nombre d'isomères (e.g. les dibenzopyrènes) que celui des 16 HAP US-EPA, ce qui exige de relever de nouveaux défis en termes de sélectivité mais aussi de solubilité et donc de répétabilité de l'analyse. Par conséquent, l'objectif principal de ce travail de thèse est de développer et d'optimiser des méthodes d'analyse en CE des HAP en vue d'élargir le nombre de composés étudiés et d'améliorer la répétabilité des analyses. Jusqu'à présent, quel que soit le format, les méthodes d'analyses électrophorétiques n'ont jamais été appliquées à l'analyse d'HAP présents dans des échantillons d'huiles alimentaires. Ainsi, cette étude vise à développer de nouveaux outils et méthodes analytiques en vue de la conception d'un microsystème électrophorétique totalement intégré et donc portable pour l'analyse des HAP dans les huiles. De plus, un tel système d'analyse devrait permettre de réduire les coûts et surtout de gagner en temps d'analyse.

PARTIE II – ANALYSE DES HAP PAR ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE

INTRODUCTION

Comme présenté dans la synthèse bibliographique, les deux modes électrophorétiques qui ont été utilisés avec succès pour la séparation des HAP au format microsystème sont l'électrochromatographie (CEC) et l'électrophorèse capillaire de zone modifiée par des cyclodextrines (CD-CZE). Contrairement à la CEC, la CD-CZE est plus simple à mettre en œuvre puisqu'elle ne requiert pas la synthèse d'une phase stationnaire au sein du canal. De plus, l'utilisation de la CD-CZE a démontré de grandes sélectivités d'analyse.

Ce chapitre présente ainsi le développement de nouvelles méthodes d'analyse des HAP en CD-CZE. Ce travail a été réalisé en électrophorèse au format capillaire car il est plus adapté au développement de méthode que le format microsystème. En effet, l'électrophorèse capillaire (CE) est commercialisée de longue date et, par conséquent, plus robuste et automatisée. De plus, une fois la méthode de séparation optimisée en format capillaire, elle est, en théorie, directement transposable au format microsystème, en absence de sources de dispersion supplémentaires et dans des conditions de champ électrique et de température identiques, puisqu'il y a une grande similitude entre la silice fondue qui compose le capillaire et le verre utilisé pour la réalisation des microsystèmes. Etant donné le niveau de concentration très faible de chaque HAP à quantifier, une détection de fluorescence induite par laser (LIF) (laser He-Cd, $\lambda_{\text{exc}} = 325 \text{ nm}$) a été couplée au système CE.

Actuellement, quatre HAP sont réglementés par la Commission européenne. Cependant, afin de développer une méthode de séparation sélective et de devancer les futures réglementations, deux mélanges complexes d'HAP d'intérêt environnemental et agroalimentaire ont été étudiés. Un premier mélange est constitué des huit HAP communs aux listes prioritaires établies par l'agence de protection de l'environnement des Etats-Unis (US-EPA) et l'agence européenne de sécurité sanitaire des aliments (EFSA) regroupant chacune seize HAP. Un deuxième mélange, plus complexe, est composé des dix-neuf HAP pouvant être détectés avec le LIF à 325 nm et appartenant aux vingt-quatre HAP différents répertoriés par les deux organismes.

Les quelques travaux décrivant la séparation de HAP en CD-CZE se sont, jusqu'à présent, limités à l'étude des seize HAP US-EPA et plus précisément aux onze HAP fluorescents aux longueurs d'onde citées ci-dessus. De plus, comme présenté dans la partie bibliographie, des pics parasites ainsi que de fortes traînées de pic ont été identifiés, mettant alors en évidence des problèmes de solubilité des HAP dans l'électrolyte et donc de répétabilité.

Ce chapitre propose donc des améliorations notables en termes de répétabilité et de sélectivité, indispensables pour l'analyse quantitative de mélanges complexes de HAP. Dans un premier temps, la répétabilité de la méthode a été optimisée via une étude approfondie de

la composition de l'électrolyte et de l'échantillon, des séquences de rinçage et du matériau des flacons de l'échantillon, associée à l'ajout d'un étalon interne. Puis, la sélectivité de la séparation du mélange des dix-neuf HAP a été étudiée en faisant varier le rapport des concentrations des CDs neutres (méthyl- β -CD) et anioniques (sulfobutyl éther- β -CD) selon une approche monovariée. Enfin, la séparation des deux mélanges d'intérêt a été optimisée à l'aide d'outils multivariés. En fonction du mélange considéré, deux stratégies d'optimisation différentes, basées sur les plans d'expériences, ont été suivies. L'ensemble de ces méthodes a été appliqué à l'analyse d'extraits dopés issus d'huiles alimentaires.

CHAPITRE I : Développement d'une méthode de séparation des HAP par électrophorèse capillaire et application aux huiles alimentaires (article)

OPTIMIZING SEPARATION CONDITIONS OF NINETEEN POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS BY CYCLODEXTRIN-MODIFIED CAPILLARY ELECTROPHORESIS AND APPLICATIONS TO EDIBLE OILS

Talanta, submitted in July 2013

Ludivine Ferey^{1,2,3,4}, Nathalie Delaunay^{1,5,6*}, Douglas N. Rutledge², Christophe B.Y. Cordella³, Hervé This³, Alain Huertas⁷, Yann Raoul⁴, Pierre Gareil^{1,5,6}

¹Chimie-ParisTech, Laboratory of Physicochemistry of Electrolytes, Colloids and Analytical Sciences (PECSA), 75005 Paris, France

²AgroParisTech, UMR 1145 Ingénierie Procédés Aliments, 75005 Paris, France

³INRA, UMR 1145 Ingénierie Procédés Aliments, 75005 Paris, France

⁴Sofiprotéol, 75008 Paris, France

⁵CNRS, UMR 7195, Paris, France

⁶UPMC Université Paris 06, Paris, France

⁷Lesieur, 92600 Asnières sur Seine, France

Key words: Capillary zone electrophoresis, Cyclodextrins, Polycyclic aromatic hydrocarbons, Fluorescence detection, Edible oils

Non-standard abbreviations: *Acenaphthene (ACP), Acenaphthylene (ACY), Anthracene (ANT), Benzo(a)anthracene (BaA), Benzo(b)fluoranthene (BbFA), Benzo(j)fluoranthene (BjFA), Benzo(k)fluoranthene (BkFA), Benzo(c)fluorene (BcFLR), Benzo(ghi)perylene (BghiP), Benzo(a)pyrene (BaP), Capillary Zone Electrophoresis (CZE), Chrysene (CHR), Cyclodextrin (CD), Cyclopenta(c-d)pyrene (CPcdP), Degree of Substitution (DS), Dibenzo(a,h)anthracene (DBahA), Dibenzo(a,e)pyrene (DBaeP), Dibenzo(a,h)pyrene (DBahP), Dibenzo(a,i)pyrene (DBaiP), Dibenzo(a,l)pyrene (DBalP), European Food Safety Authority (EFSA), Fluoranthene (FA), Fluorene (FLR), Indeno(1,2,3-cd)pyrene (IP), Laser-induced fluorescence (LIF), Methanol (MeOH), 5-Methylchrysene (MCH), Methyl- β -CD (Me- β -CD), Naphthalene (NPH), Phenanthrene (PHE), Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH), Pyrene (Pyr), Sulfobutyl ether- β -cyclodextrin (SBE- β -CD), United States Environmental Protection Agency (US-EPA).*

Abstract

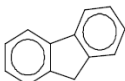
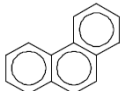
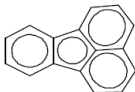
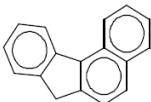
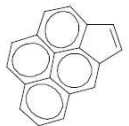
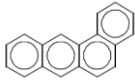
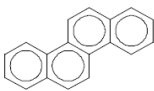
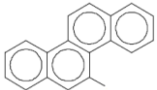
For the first time, the separation of 19 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) listed as priority pollutants in environmental and food samples by the United States Environmental Protection Agency (US-EPA) and the European Food Safety Authority was developed in cyclodextrin (CD)-modified capillary zone electrophoresis with laser-induced fluorescence detection (excitation wavelength: 325 nm). The use of a dual CD system, involving a mixture of one neutral CD and one anionic CD, enabled to reach unique selectivity. As solutes were separated based on their differential partitioning between the two CDs, the CD relative concentrations were investigated to optimize selectivity. Separation of 19 PAHs with enhanced resolutions as compared with previous studies on the 16 US-EPA PAHs and efficiencies superior to 1.5×10^5 were achieved in 15 min using 10 mM sulfobutyl ether- β -CD and 20 mM methyl- β -CD. The use of an internal standard (umbelliferone) with appropriate electrolyte and sample compositions, rinse sequences and sample vial material resulted in a significant improvement in method repeatability. Typical RSD variations for 6 successive experiments were between 0.8 and 1.7 % for peak migration times and between 1.2 and 4.9 % for normalized corrected peak areas. LOQs in the low $\mu\text{g/L}$ range were obtained. For the first time in capillary electrophoresis, applications to real vegetable oil extracts were successfully carried out using the separation method developed here.

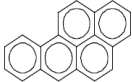
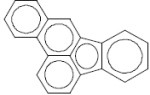
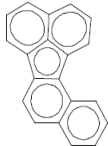
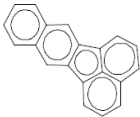
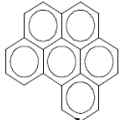
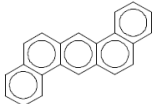
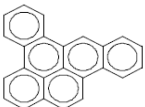
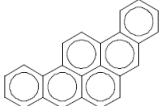
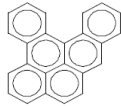
1. Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) form a large group of about 10,000 compounds with two or more fused aromatic rings. Their origin is both anthropogenic (incomplete combustion of organic matter such as oil, wood or fossil fuels due to human activity) [1,2] and natural (e.g. forest fires and volcanoes). However, PAHs are known to have carcinogenic and mutagenic effects caused by the binding of their metabolites to DNA [3]. The exposure of humans to these compounds creates health risks, especially with food contaminated by PAHs released into the environment or production practices (smoking, heating, and drying) [4-7]. Usually, PAHs are not present individually but are encountered as complex mixtures making the assessment of health consequences difficult.

Some decades ago, the United States Environmental Protection Agency (US-EPA) identified the most frequent PAHs in environmental samples as priority organic pollutants, now called "the 16 US-EPA PAHs" [8]. Moreover in 2002, the Scientific Committee on Food of the European Commission (today replaced by the European Food Safety Authority (EFSA)) published another list of 15 priority PAHs for monitoring the contamination in food and the environment, including some compounds of the US-EPA list [9]. In 2005, the Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization Expert Committee on Food Additives highlighted a 16th compound (benzo(c)fluorene, BcFLR), also considered as genotoxic [10] and later, in 2008, BcFLR was officially included into the EU priority PAHs by the EFSA [11]. This new list was commonly called "15+1 EU priority PAHs", so that it can be distinguished from the 16 US-EPA PAHs. 8 PAHs known to be mutagenic or carcinogenic are in common between the two priority lists, resulting in 24 PAHs under regulations (see Table II-I-1).

Table II-I-1. Names, abbreviations, structures, molecular weights and logP of studied PAHs.

Compound	Abbreviation	Structure	M _w (g/mol)	logP ^c
Naphthalene ^a	NPH		128	3.4
Acenaphthylene ^a	ACY		152	3.6
Acenaphthene ^a	ACP		154	3.9
Fluorene ^a	FLR		166	4.2
Anthracene ^a	ANT		178	4.5
Phenanthrene ^a	PHE		178	4.6
Fluoranthene ^a	FA		202	5.1
Pyrene ^a	Pyr		202	5.3
Benzo(c)fluorene ^b	BcFLR		216	5.7
Cyclopenta(cd)pyrene ^b	CPcdP		226	5.5
Benzo(a)anthracene ^{a,b}	BaA		228	5.7
Chrysene ^{a,b}	CHR		228	5.6
5-Methylchrysene ^b	MCH		242	6.0

Compound	Abbreviation	Structure	M _w (g/mol)	logP ^c
Benzo(a)pyrene ^{a,b}	BaP		252	6.0
Benzo(b)fluoranthene ^{a,b}	BbFA		252	6.6
Benzo(j)fluoranthene ^b	BjFA		252	6.2
Benzo(k)fluoranthene ^{a,b}	BkFA		252	6.8
Benzo(ghi)perylene ^{a,b}	BghiP		276	6.7
Indeno(1,2,3-cd)pyrene ^{a,b}	IP		276	6.6
Dibenzo(a,h)anthracene ^{a,b}	DBahA		278	6.7
Dibenzo(a,e)pyrene ^b	DBaeP		302	7.3
Dibenzo(a,h)pyrene ^b	DBahP		302	7.0
Dibenzo(a,i)pyrene ^b	DBaiP		302	7.3
Dibenzo(a,l)pyrene ^b	DBalP		302	7.7

^a16 US-EPA PAHs [8]^b15(+1) EU priority PAHs [11]^c INERIS toxicological and environmental data sheets

To determine complex mixtures of PAHs at low concentrations in food and environmental samples, reliable analytical methods are needed [12,13]. Analytical procedures to quantify PAHs are mostly based on liquid chromatography coupled to diode array detector [14-16] or fluorescence detector [16-19] and gas chromatography coupled to mass spectrometry [20-23]. Capillary electrophoresis (CE) with its high separation efficiencies, low reagent and sample consumption and speed, is an interesting alternative to previous chromatographic methods [24-26]. Capillary zone electrophoresis (CZE), the most classical form of CE, however, is more suited for the analysis of water-soluble and charged species than for neutral and hydrophobic compounds, such as PAHs, but micellar electrokinetic chromatography (MEKC) is well adapted [27-29]. In this case, micelles formed from surfactants allow both the separation of PAHs and the increase in their solubility in the aqueous electrolyte. However, the addition of a micellar phase alone usually does not provide enough selectivity to separate a large number of PAHs, since they are too strongly associated with the micelles. Usually, the addition of modifiers, such as organic solvents or cyclodextrins (CDs), to the buffer is necessary [30-36].

In MEKC, the addition of CDs is the most successful strategy to improve method selectivity, thanks to their ability to form host-guest inclusion complexes with hydrophobic compounds, modifying the partitioning of components between the micellar and aqueous/CD phases [37,38]. For PAH analysis, complexation phenomenon depends mainly on hydrophobic and steric effects [31,39-42]. The separation of 20 PAHs (including the 16 US-EPA PAHs) was attempted by CD-modified MEKC (CD-MEKC) using a high concentration of surfactant (100 mM sodium dodecyl sulfate) with mixtures of native β -CD and γ -CD and urea [40]. However, only 13 PAHs were baseline resolved in 55 min with co-migrations of similar molecules such as benzo(a)pyrene (BaP) / benzo(a)anthracene (BaA) and dibenzo(a,h)anthracene (DBahA) / benzo(k)fluoranthene (BkFA). Moreover, using CD-MEKC separation methods, only a limited amount of organic modifier can be added to the background electrolyte (BGE) before disruption of micelles.

Electrochromatography also appears to be a promising approach for PAH separations: Dadoo et al [43] reported the use of columns packed with 1.5 μ m nonporous octadecylsilica particles to achieve a rapid separation of the 16 US-EPA priority PAHs in less than 10 min. Although good resolutions with high separation efficiencies were obtained (greater than 140 000 theoretical plates) this method suffers from the difficulty to pack capillaries and create stable outlet frits. For this purpose, monolithic stationary phases are more promising [44,45].

An excellent alternative to these approaches is the use of a dual CD system in CZE [46,47]. Enhanced PAH separations using mixtures of neutral and anionic CDs have been

demonstrated in capillary [48-50] and, more recently, in microfluidic chip formats [51]. In this approach, PAHs are separated based on their different complexation constants between the neutral CD, which moves at the speed of the electroosmotic flow (EOF) and the negatively charged CD, which moves more slowly. Mixtures of hydroxypropyl- β -CD or methyl- β -CD (Me- β -CD) with sulfobutyl ether- β -CD (SBE- β -CD) or carboxymethyl- β -CD (CM- β -CD) have been tested for the separation of 6 PAHs [48]. Experimental analysis indicated that SBE- β -CD associated more strongly with PAHs than CM- β -CD, and finally a SBE- β -CD/Me- β -CD system showed better results with respect to resolution and speed of analysis. With this selected system, the 6 PAHs were baseline resolved in about 10 min, including BaP and benzo(e)pyrene isomers.

One year later, the same group demonstrated the unique selectivity offered by the dual SBE- β -CD/Me- β -CD system for the analysis of the 16 US-EPA priority PAHs in contaminated soils [49]. Separation was attempted with a BGE composed of a 50 mM borate buffer (pH 9.2) with 35 mM SBE- β -CD (average degree of substitution (DS): 4) and 15 mM Me- β -CD (DS 12.6). As PAH concentrations in soil extracts were in the ppb range, UV absorbance detection was not suited. Laser-induced fluorescence (LIF) detection (excitation wavelength: 325 nm) was therefore used and a sensitive detection of 11 components among the 16 with LODs in the low $\mu\text{g/L}$ range was obtained. However, several groups of PAHs still remained not fully baseline resolved (e.g. fluorene (FLR) / anthracene (ANT), chrysene (CHR) / phenanthrene (PHE) / BaA and benzo(b)fluoranthene (BbFA) / indeno(1,2,3-cd)pyrene (IP) / pyrene (Pyr)). Given these limitations, one year later the same group tried to introduce one more neutral CD: native γ - and α -CDs were tested [50]. Surprisingly, better PAH separation was obtained with the α -CD, which usually is not expected to interact with the biggest PAHs because of its smaller cavity size. Finally, the overall electrophoretic separation of the 16 US-EPA PAHs was enhanced by adding 4 mM α -CD to the BGE, although ACP / NPH / FLR and BbFA / IP were still not fully baseline resolved. Moreover, "microprecipitation, i.e. spikes" was observed in the electropherogram and BghiP, the most hydrophobic compound, "appeared to interact strongly with SBE- β -CD and/or the capillary wall, and in some cases it did not appear in the electropherogram", proving solubility and therefore repeatability problems [50]. Therefore, the separation of the 16 US-EPA PAHs still needed to be improved. Moreover, until now, no publication dealing with the determination of the 15+1 EU priority PAHs using CE has been published. This paper presents, to our best knowledge, the first development of CD-CZE with LIF detection for separation and sensitive analysis of the two lists of priority PAHs: the 16 US-EPA PAHs and the 15+1 EU priority PAHs, and its application to edible oil extracts.

2. Materials and methods

2.1 Chemicals

BaP (> 99.6 %), BaA (> 99.5 %), CHR (> 99.6 %), BbFA (> 99.5 %), IP (> 99.5 %), benzo(j)fluoranthene (> 98.5 %, BjFA), 5-methylchrysene (> 99.5 %, MCH), dibenzo(a,l)pyrene (> 99.4 %, DBaP), dibenzo(a,i)pyrene (> 99.9 %, DBaIP), dibenzo(a,h)pyrene (> 99.0 %, DBaHP), dibenzo(a,e)pyrene (> 99.0 %, DBaEP) at 10 mg/L in acetonitrile, cyclopenta(c-d)pyrene (> 99.5 %, CPcdP) at 100 mg/L in acetonitrile, BcFLR (> 98.2 %) at 10 mg/L in cyclohexane and a standard mixture of the 16 US-EPA PAHs at 10 mg/L in acetonitrile were purchased from CIL Cluzeau (Sainte-Foy-La-Grande, France). ACP (> 99.0 %), acenaphthylene (> 99.0 %, ACY), ANT (> 98.0 %), BkFA (> 98.0 %), benzo(ghi)perylene (> 98.0 %, BghiP), DBaHA (> 97.0 %), fluoranthene (> 98.0 %, FA), FLR (> 98.0 %), PHE (> 98.0 %), NPH (> 99.0 %), Pyr (> 98.0 %) and umbelliferone ($\geq$ 98.0 %) were supplied by Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France).

Me- β -CD with a DS of 12.6 (average molecular weight of 1310 g/mol), urea for electrophoresis ($\geq$ 99.99 %) and sodium tetraborate decahydrate ($\geq$ 99.5 %) were from Sigma-Aldrich. SBE- β -CD with an average DS of 6.2 (average molecular weight of 2115 g/mol) was supplied by Cydex Pharmaceuticals (Lawrence, KS, USA). Methanol (MeOH), ethanol, cyclohexane, ethyl acetate, and acetonitrile (ACN) (analytical grade) were provided by VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Ultra-pure water was delivered by a Direct-Q3 UV system (Millipore, Molsheim, France).

The final composition of the BGE was: 10 mM sodium borate buffer (pH 9.2), 600 mM urea, 10 mM SBE- β -CD, 20 mM Me- β -CD in 90:10 (v/v) water-MeOH mixture. Three stock solutions of 10 mM sodium tetraborate decahydrate with 2.5 M urea, 100 mM SBE- β -CD and 100 mM Me- β -CD were prepared every week by dissolving the appropriate amounts in ultra-pure water and stored at 4°C. The final BGE was obtained by adding 10 % MeOH (v/v) and appropriate amounts of the three previous stock solutions to reach the final concentrations. All BGEs were daily prepared and filtered through 0.20 μ m cellulose acetate membrane (VWR). Stock PAH mixture solutions were prepared at 1 mg/L in ACN by mixing appropriate volumes of the standard mixture of the 16 US-EPA PAHs and individual PAH standard solutions, and then stored at 4°C. PAH standard mixtures were prepared each day by diluting the stock mixture solution in a 30:70 (v/v) MeOH-BGE mixture to the desired concentration. Stock solution of umbelliferone used as internal standard (IS) was prepared at 1.6 g/L in ethanol and diluted to 1.6 mg/L with ultra-pure water.

2.2 Apparatus and software

All CE experiments were carried out with an Agilent Technologies HP 3D system (Massy, France) hyphenated with LIF detection. Fluorescence excitation radiation was obtained from the 325 nm, 15 mW output of a HeCd laser (Model 3056-M-A02, Melles Griot, Voisins-Le-Bretonneux, France) coupled to a Zetalif Evolution LIF detector (Picometrics, Toulouse, France). All radiations below 350 nm were discarded by the filter. A rise time of 0.05 s and a photomultiplier voltage of 750 V were selected. Separations were performed using 50 μ m id x 49 cm (detection at 33.5 cm) bare fused-silica Polymicro capillaries purchased from Photonlines (Marly-Le-Roi, France). HP 3D ChemStation software controlled the instrument and allowed data acquisition.

2.3 Electrophoretic procedures

Before first use, capillaries were conditioned by successive flushing with 1 M NaOH, 0.1 M NaOH, ultra-pure water and finally BGE, each under 935 mbar for 10 min (about 20 capillary volumes). Every day, the capillary was flushed with water followed by BGE, each under 935 mbar for 10 min. Between each run, different rinse sequences using water and organic solvents such as ACN and MeOH were tested to achieve good repeatabilities. At the end of the day, capillaries were rinsed by flushing successively with water, ACN, MeOH and water each under 935 mbar for 5 min for water (about 10 capillary volumes) and 15 min for organic solvents (about 80 capillary volumes for ACN and 50 capillary volumes for MeOH). Injections were performed hydrodynamically under 18 mbar for 5 s (about 0.3 % of the capillary volume with a viscosity of 1.1 cP at 25°C for a water/MeOH (9/1) mixture). Separations were run at 25°C. Inlet BGE was changed between each run whereas outlet BGE was daily renewed.

2.4 Real samples preparation

Samples of edible oils (sunflower oil and Isio 4[®] oil, which is a mixture of rapeseed, sunflower, grape seed, and high content oleic acid sunflower oils) were provided by Lesieur (Coudekerque, France). Oil extractions were performed with cartridges packed with 25 mg of molecularly imprinted polymers (Affinilute MIP PAH[®], 3 mL, Biotage, Uppsala, Sweden). The procedure published in Biotage application note was followed [52]. About 10 g of oil was exactly weighed into a 10 mL volumetric flask and diluted to volume with cyclohexane.

Cartridges were conditioned with 1 mL of cyclohexane and 2 mL of diluted oil samples were loaded onto the cartridge. After being dried completely under vacuum, the cartridge was washed with 2 x 1 mL of cyclohexane to remove fat content (e.g. lipids, triglycerides, fatty acids). Finally, after a drying step, elution was carried out with 3 mL of ethyl acetate. The eluate was evaporated to dryness under a nitrogen stream and reconstituted in ACN-MeOH-BGE (1:3:6, v/v/v) before CE analysis. Blank oil extracts were spiked only with IS at 100 µg/L. Oil extracts were also spiked with 16PAHs at 100 µg/L (except for MCH, BaP, and DBaP, 150 µg/L, ANT, FA, and BghiP, 200 µg/L, and IP, 400 µg/L).

3. Results and Discussion

As already discussed, the CE separation of the 16 US-EPA PAHs still needed to be improved (not all baseline resolved and solubility problems related to their high hydrophobicity) and the 15+1 EU priority PAHs for food applications were not studied in previous published works [49,50]. This is why, in this work, separation conditions previously published were revisited to improve the selectivity and the repeatability of the method, especially taking into account that additional PAHs with higher hydrophobicity values were also targeted.

3.1 Migration times

When using LIF detection with excitation wavelength at 325 nm, only 16 out of the 24 compounds could be detected at a concentration of 100 µg/L (11 PAHs out of the 16 US-EPA PAHs and 5 PAHs out of the 8 PAHs belonging only to the "15+1 EU priority PAHs" of food interest). From other 8 PAHs, BjFA, ACP, and PHE could be detected at higher concentrations whereas NPH, ACY, CPcdP and FLR did not give measurable fluorescence signal even at 10 mg/L. Finally, BcFLR was only available in cyclohexane and thus could not be added to the working standard mixture of other PAHs containing ACN without creating a microemulsion. For this reason, this compound was studied separately. In the first work by Brown et al. [49], the procedure for the BGE preparation did not allow to understand whether the quoted 50 mM referred to the concentration of used sodium tetraborate decahydrate in the BGE or to the actual concentration of borate species. This parameter was therefore investigated for the analysis of the 16 US-EPA PAHs standard mixture. Upon decreasing the buffer concentration, ionic strength also decreases causing an increase in the electroosmotic mobility and hence a speed up of the PAH migration. Moreover, at lower ionic strength, it

becomes possible to increase the applied separation voltage without generating detrimental heating effect, speeding up the analysis even more. Separations were performed with borate concentration ranging from 80 mM down to 10 mM, which allowed an increase in applied voltage from 15 to 18 kV, and led to halving the analysis time (from 15.6 min at 80 mM to 8.0 min at 10 mM), while maintaining resolution. Experimentally, simultaneous increases in EOF and complexed PAH electrophoretic mobilities of about 20 % and 8 % (for the last migrating peak, BghiP) were respectively obtained. These observed variations in electroosmotic and electrophoretic mobilities can be easily explained from theory by the decrease in ionic strength. Consequently, a borate concentration of 10 mM was thus chosen for the following experiments.

3.2 Peak area repeatability

In previous published work [50], the separation of the 16 US-EPA PAHs suffered from solubility problems clearly evidenced by the presence of spikes and peak tailing on electropherograms. Moreover, the last peak, BghiP, "appeared to interact strongly with SBE- β -CD and/or the capillary wall, and in some cases it did not appear in the electropherogram", revealing notable repeatability problems. In our study, as additional PAHs of food interest were more hydrophobic than the 16 US-EPA PAHs, solubility issues were also expected (see Table II-I-1 for logP values). Similarly to conditions applied by Jiménez et al. [40], urea was added to the BGE in order to increase the solubility of these lipophilic PAHs in the aqueous media. Among the tested concentrations (between 400 mM and 1 M), a urea concentration of 600 mM was selected since it appeared to provide sufficient solubility of PAHs in the BGE.

First tests were carried out on the 11 US-EPA PAHs that can be detected at 100 μ g/L using the 325 nm laser, to evaluate the method repeatability for the analysis of the less hydrophobic studied PAHs (logP between 4.5 and 6.7) in the initial conditions. The BGE was composed of 10 mM sodium borate buffer (pH 9.2), 600 mM urea, 10 mM SBE- β -CD and 20 mM Me- β -CD. PAH standard mixtures were obtained by dilution of the stock solution in 5/95 (v/v) MeOH-BGE mixture to a final concentration of 100 μ g/L each and they were stored in a polypropylene vial for analysis. Once PAH standard mixtures were prepared, analysis was immediately performed. To correctly evaluate the repeatability of the method, 6 successive assays were performed using a default rinsing sequence between each run, which consisted in only one flush of BGE for 5 min. The RSD for peak migration times gave satisfactory values from 0.8 to 1.7 %, whereas for corrected peak areas, unacceptable values between 7 and 19 % were obtained. Moreover, corrected peak areas did not vary randomly, but a constant fall from 12 to 32 % was observed along the 6 repeated analyses.

This lack of repeatability could be explained by PAH adsorption either to capillary silica walls or to polypropylene vials.

At this point, MeOH/BGE ratios between 5 and 15 % (v/v) were investigated to solubilize PAHs in samples. The increase in organic solvent to 10 % allowed an improvement in the corrected peak area RSDs, which fell between 9 and 13 %, according to PAHs, for 6 consecutive analyses. However, when 15 % MeOH was added no further improvement was noticed. Although RSDs were lower, a continuous decrease in corrected peak areas from 11 to 24 % still occurred. Consequently, for further studies of the 11 US-EPA PAHs, standard PAH solutions were diluted in 1/9 (v/v) methanol-BGE mixtures. However, when the 5 PAHs from the "15+1 EU priority PAHs" were additionally studied, 30 % of MeOH was required in the sample because of the high hydrophobicity of the 4 dibenzopyrenes.

The continuous decrease in corrected peak areas was first attributed to adsorption of the hydrophobic PAHs to the inner surface of the polypropylene vials. Therefore, polypropylene vials were replaced by glass ones, leading to RSDs much lower for corrected peak areas, between 4 and 8 %. Nevertheless, a continuous (although lower, from 8 to 17 %) decrease in corrected peak areas over the 6 assays demonstrated that solubility problems were not fully solved yet.

Repeatability was also suspected to depend strongly on PAH solubility in the BGE. This is why an organic solvent is generally added to improve solubilization and therefore to reduce PAH adsorption to capillary walls. MeOH and ACN are the two most commonly used organic solvents in CE [53,54]. However, as CDs are less soluble in ACN than in MeOH, the latter solvent was tested. Separations were performed with BGE containing 10, 15, and 20 % (v/v) methanol. Finally, 10 % MeOH was found to be the best compromise between peak area repeatability and analysis time. Indeed, RSD values were between 3 and 7 % with a random variation of peak area values over the sequence of 6 analyses, proving clearly that method repeatability was improved. Additional assays were carried out by adding ethanol to the BGE instead of MeOH, but this led to higher RSDs for corrected peak areas (20-25 % with a mean decrease of 40 %). Thus, addition of 10 % methanol in BGE was finally retained.

In addition to this, several rinsing sequences were evaluated between two consecutive runs. Under initial conditions, capillary was only rinsed with 11 capillary volumes of BGE. More complex sequences were therefore evaluated by successively flushing varying volumes of water, organic solvent (ACN or MeOH), water and BGE. Finally, the best rinsing conditions were met by successively percolating water for 5 min, MeOH for 10 min, water for 5 min and BGE for 15 min, each under 935 mbar, since lower RSD values in corrected peak areas (3-6 %) were obtained.

Finally, an IS, umbelliferone, was used to further improve repeatability. Hence, the responses measured for each analyte i on the electropherograms were the normalized corrected peak areas $(A_i / t_{mi}) / (A_{IS} / t_{mIS})$. As a result, corresponding RSDs went down to between 1 and 5 %, with area values showing random variation for the 11 US-EPA PAHs.

3.3 Selectivity

Considering that PAHs are separated based on their differential partitioning between neutral and anionic CDs, the selectivity of the method was expected to depend strongly on the two CD concentrations. The CD concentrations may also alter EOF: the neutral CD was expected to reduce EOF due to an increase in BGE viscosity while the anionic CD should also cause a significant decrease in EOF as a consequence of an increase in ionic strength.

Initial experiments were carried out at a fixed Me- β -CD concentration of 20 mM with SBE- β -CD (DS 6.2) varying from 5 to 20 mM. This relatively high concentration of neutral CD was necessary to maintain a good solubility of PAHs in sample and BGE. A minimum anionic CD concentration of 5 mM was selected to provide a sufficient selectivity while 20 mM was the maximum concentration allowing the detection of slowest migrating peaks. For each BGE composition, Joule effect was evaluated by plotting current vs applied voltage. Separation voltage was set to the highest value consistent with the linear range of the current vs applied voltage plot. The corresponding electropherograms of the 16 PAHs, which are fluorescent at a concentration of 100 $\mu\text{g/L}$ using the LIF at 325 nm, in the presence of umbelliferone (IS), are presented in Figure II-I-1 and the corresponding figures of merit gathered in Table II-I-2.

The migration order of PAHs did not follow a general trend with respect to hydrophobicity alone (see Table II-I-1 for logP values) or molecular structure alone, and must be related to both. Electrophoretic behavior of PAHs only depended on the pattern of distribution between the two CDs, with first emerging PAHs having more affinity for the neutral CD, and last emerging ones favoring complexation with the anionic CD. This resulted in a highly selective method enabling baseline resolutions of isomeric compounds such as the heavy dibenzopyrenes: DBahP, DBaiP, DBalP and DBaeP.

The general pattern of improving separation with increasing anionic CD concentration from 0 to 25 mM mentioned by Szolar et al. [48] was not observed here. As shown in Table II-I-2, this trend was only verified for first migrating compounds (e.g. the DBahP/DBahA pair), whereas resolutions between last migrating compounds began to go down with increasing SBE- β -CD concentration (e.g. $R_s(\text{BghiP/DBaeP})$ was 8.4 at 5 mM and 5.0 at 20 mM). Indeed, for compounds having high affinity with the anionic CD, an addition of this CD

prevented the differential partitioning required to achieve a good separation, since these compounds tend to spend a majority of their time in the anionic CD cavity.

Determination of EOF was necessary to study complexed PAH electrophoretic mobilities in different BGEs since electroosmotic mobility was altered by buffer composition. No fluorescent neutral markers could be found, because all the compounds tested were always delayed due to an interaction with the anionic CD. Electroosmotic mobilities were therefore calculated directly from electropherograms, as previously described by Szolar et al. [48]. As was already mentioned in this earlier study, MeOH associated with the anionic CD, slowing down its migration in comparison with water. This is why, the first two peaks recorded on each electropherogram were attributed to water and MeOH, respectively. Consequently, the migration time of the first negative peak appearing on each electropherogram was taken as the electroosmotic migration time. For SBE- β -CD concentrations varying from 5 to 20 mM, electroosmotic mobility significantly decreased from 48.3 to $32.6 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Table II-I-2) representing a loss of about 33 %, mainly due to an increase in the BGE ionic strength.

Absolute values of electrophoretic mobilities of early migrating PAHs, such as DBaH and DBaP, generally increased as a function of SBE- β -CD concentration (Figure II-I-2), suggesting that complexation phenomenon prevailed over the increase in ionic strength. On the contrary, absolute values of electrophoretic mobilities of late migrating PAHs increased first until becoming constant or even decreasing. Indeed, for increasing amounts of anionic CD, PAHs tended to be more incorporated in the hydrophobic CD cavity until ionic strength became predominant over complexation phenomenon, thus decreasing absolute values of electrophoretic mobilities. This was the case for DBaP, BghiP, DBaP, IP, BbFA, Pyr, BaP, FA, BkFA and MCH. In the extreme, for the compound exhibiting the highest electrophoretic mobility (in absolute value), DBaP, the electrophoretic mobility (in absolute value) decreased with the anionic CD concentration even from 5 mM. Over the concentration range studied, DBaP was either totally incorporated in anionic CD cavities, or ionic strength effects prevailed over complexation phenomena in all conditions tested.

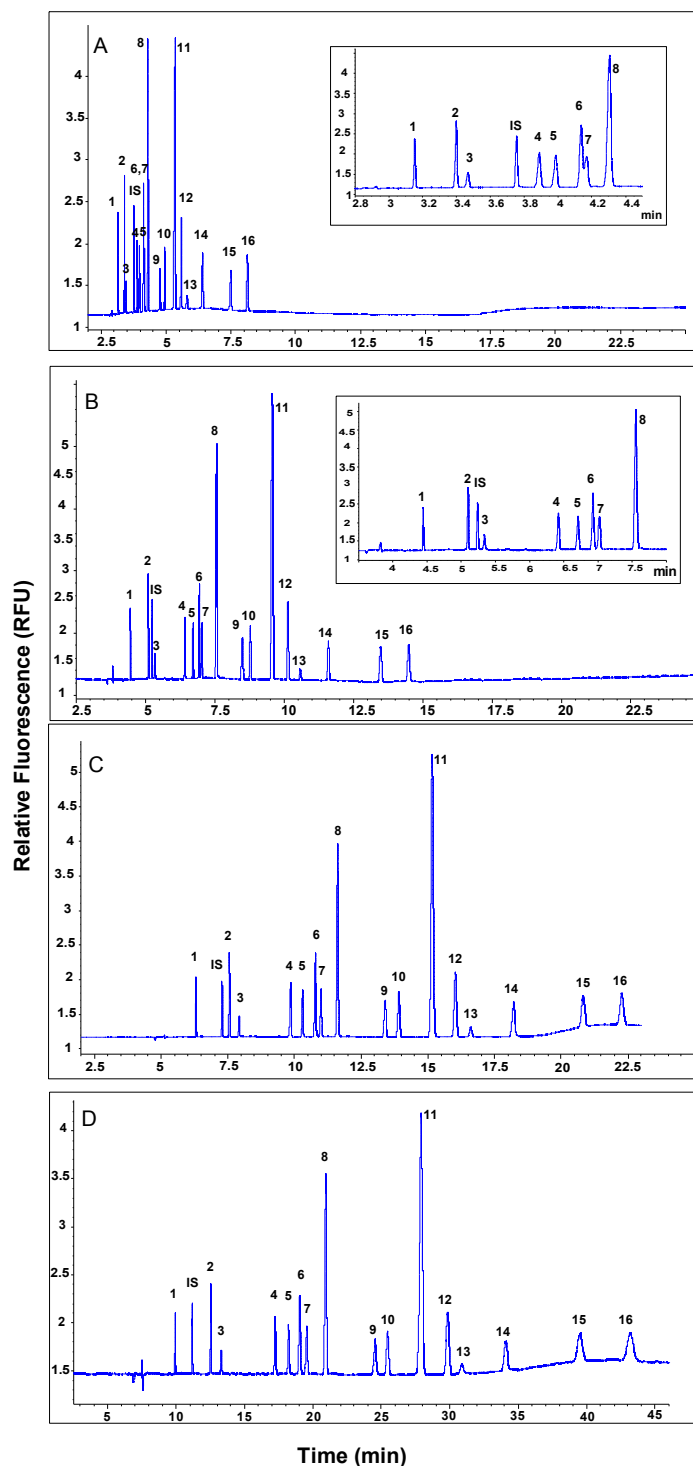


Figure II-I-1. Influence of the SBE- β -CD concentration in the BGE on the electropherograms of a standard mixture of 16 PAHs. Bare fused-silica capillary, 50 μ m I.D. x 49 cm (LIF detection at 33.5 cm). BGE: 10 mM sodium borate buffer (pH 9.2), 600 mM urea, 20 mM Me- β -CD with SBE- β -CD concentrations of (A) 5 mM ($V = 20$ kV); (B) 10 mM ($V = 18$ kV); (C) 15 mM ($V = 15$ kV); and (D) 20 mM ($V = 12$ kV) in 9:1 (v/v) water-MeOH mixture. Temperature, 25°C. Hydrodynamic injection, 5 s, 20 mbar. LIF detection, $\lambda_{exc} = 325$ nm and emission through 350 nm long-pass filter; PMT, 750 V; rise time, 0.05 s. PAH concentration, 100 μ g/L each in ACN-MeOH-BGE 6:34:60, (v/v/v). Umbelliferone concentration, 30 μ g/L. Identification: 1, DBaHP; 2, DBaHA; 3, ANT; 4, CHR; 5, BaA; 6, DBaIP; 7, MCH; 8, BkFA; 9, FA; 10, BaP; 11, Pyr; 12, BbFA; 13, IP; 14, DBaIP; 15, BghiP; 16, DBaEP; IS: umbelliferone.

Table II-I-2. Electroosmotic mobilities, analysis times, theoretical plates (N) and resolutions (Rs) as a function of SBE- β -CD concentration from the electropherograms of a 16 PAH standard mixture shown in Figure II-I-1.

	[SBE- β -CD] (mM)							
	5		10		15		20	
Electroosmotic mobility ($10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	48.3		42.0		38.3		32.6	
Analysis time (min)	8.1		14.5		22.1		45.8	
	N*	R _s	N*	R _s	N*	R _s	N*	R _s
DBahP	6.83		5.97		4.77		3.52	
DBahA	4.47	14.0	4.31	24.3	3.40	28.4	2.59	32.1
ANT	2.79	2.8	3.24	5.8	2.53	6.2	2.22	8.0
CHR	2.51	14.9	2.76	23.8	2.33	26.7	1.72	28.9
BaA	2.64	3.1	2.75	4.8	2.30	5.4	1.70	5.9
DBaiP	3.18	5.0	3.19	5.4	2.42	5.5	1.71	3.8
MCH	2.40	0.9	2.75	1.8	2.17	2.3	1.50	3.3
BkFA	2.40	4.1	2.57	6.0	2.10	6.4	1.49	7.1
FA	1.48	10.9	2.22	15.4	1.89	15.7	1.15	15.0
BaP	2.10	3.8	2.50	4.1	1.92	4.1	1.21	2.9
Pyr	1.17	7.3	2.00	9.6	1.64	9.0	0.91	8.1
BbFA	1.94	4.2	2.23	5.4	1.76	5.7	1.06	5.4
IP	1.87	4.1	2.16	3.9	1.72	3.7	1.03	2.9
DBalP	1.98	10.7	2.07	9.9	1.58	9.3	0.90	8.2
BghiP	1.35	15.7	1.86	14.3	1.40	12.8	0.59	10.6
DBaeP	2.13	8.4	1.85	6.7	1.36	6.2	0.46	5.0

*Number of theoretical plates (10^5) calculated using the equation: $N = 5.54 \times (t_m/w_{1/2})^2$ with $w_{1/2}$, the peak width at half height

As a general trend, the number of theoretical plates decreased upon increasing SBE- β -CD concentration. Indeed, upon increasing SBE- β -CD concentration, EOF decreased while PAH partitioning into the anionic CD increased and therefore PAHs spent a longer time in the capillary. Moreover, early peaks had higher efficiencies than later ones as was expected due to diffusive band broadening. However, this tendency was not observed when SBE- β -CD was varied from 5 to 10 mM, perhaps because of solubility limitations existing at a too low anionic CD concentration. The increase in SBE- β -CD concentration to 10 mM may allow an improvement of PAH solubility in sample and BGE, generating sharper peaks. Eventually, a SBE- β -CD concentration of 10 mM was retained for further optimization, since it corresponded to the best compromise between resolution ($R_s > 1.8$) and analysis time (14.5 min), see Table II-I-2.

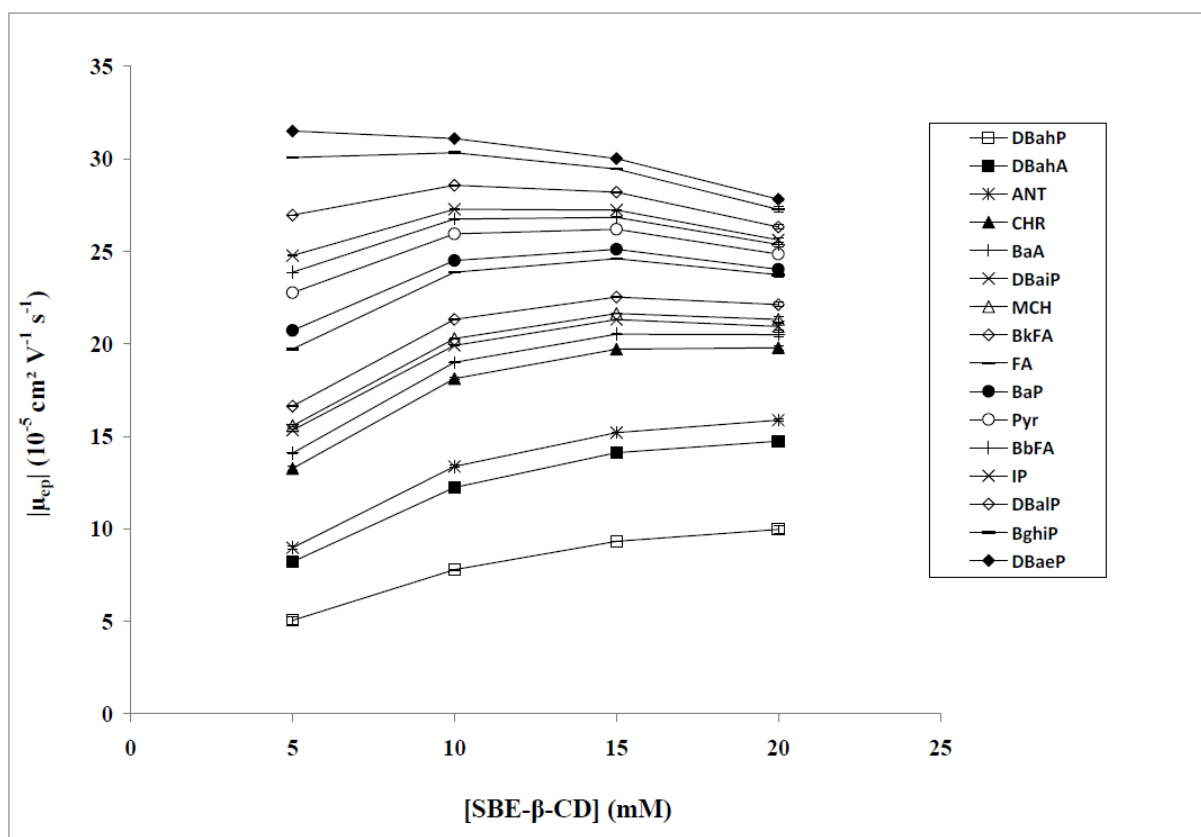


Figure II-I-2. Variation of the electrophoretic mobility (in absolute value) of 16 PAHs as a function of SBE-β-CD concentration (experimental conditions: see Figure II-I-1).

Subsequent experiments were performed by varying the neutral CD concentration while maintaining SBE-β-CD concentration at 10 mM in order to better understand the influence of the neutral CD concentration on separation selectivity. The maximum Me-β-CD concentration was set at 40 mM to limit the increase in viscosity, whereas 5 mM was the bottom limit, to ensure enough solubility of PAHs. The resulting electropherograms of the 16 PAH standard mixture recorded at a constant voltage of 18 kV are shown in Figure II-I-3. The increase in BGE viscosity between 5 and 40 mM Me-β-CD induced a decrease in the electroosmotic mobility from 45.8 to $38.2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

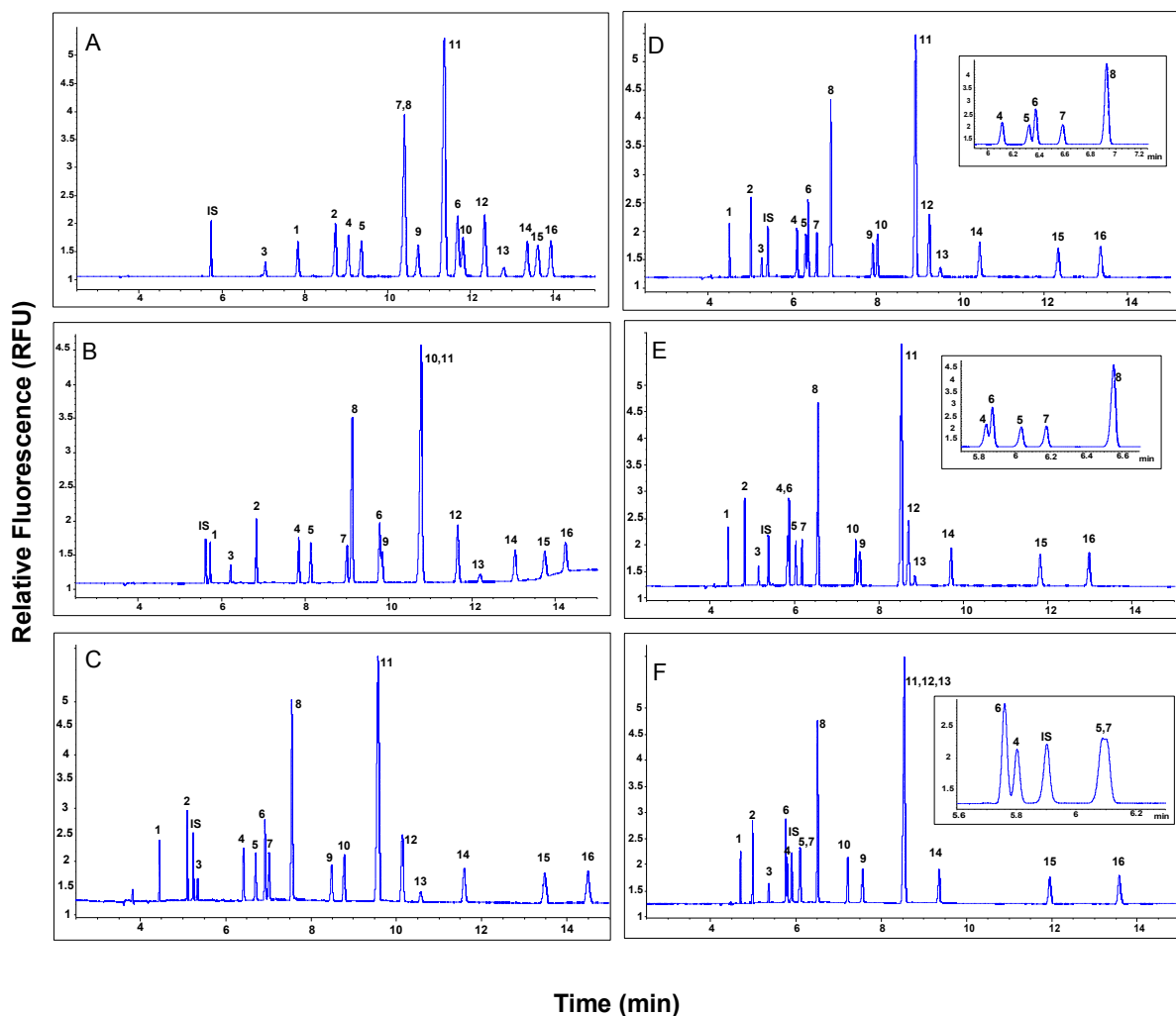


Figure II-I-3. Influence of the Me- β -CD concentration in the BGE on the electropherograms of a standard mixture of 16 PAHs. BGE: 10 mM sodium borate buffer (pH 9.2), 600 mM urea, 10 mM SBE- β -CD with Me- β -CD concentrations of (A) 5 mM; (B) 10 mM; (C) 20 mM; (D) 25 mM; (E) 30 mM; and (F) 40 mM in 9:1 (v/v) water-MeOH mixture. Applied voltage, 18 kV. Other conditions and identification: see Figure II-I-1.

Upon varying the Me- β -CD concentration, several reversals in PAH migration order were observed, as opposed to the situation with SBE- β -CD concentration variations, for which PAHs always migrated in the same order. This emphasizes the higher impact the neutral CD has on selectivity. As expected, because of a competition effect, the higher the neutral CD concentration in the BGE, the lower the PAH electrophoretic mobility (in absolute value), as shown in Figure II-I-4. Moreover, the increase in BGE viscosity upon increasing Me- β -CD concentration reinforced this effect. More accurately, a higher decrease in electrophoretic mobility (in absolute value) occurred between 5 and 40 mM Me- β -CD for the early emerging peaks than for the late emerging ones, e.g. decreases by about 85 % and 76 % were noted for DBaHP and DBaEP, respectively. This behavior is consistent with the fact that an increase in neutral CD concentration had a higher impact on the PAHs with more affinity for this type

of cyclodextrin than on those with less affinity for it. Eventually, the decrease in electrophoretic mobility (in absolute value) for PAHs mostly associated with the anionic CD is probably explained by viscosity effect.

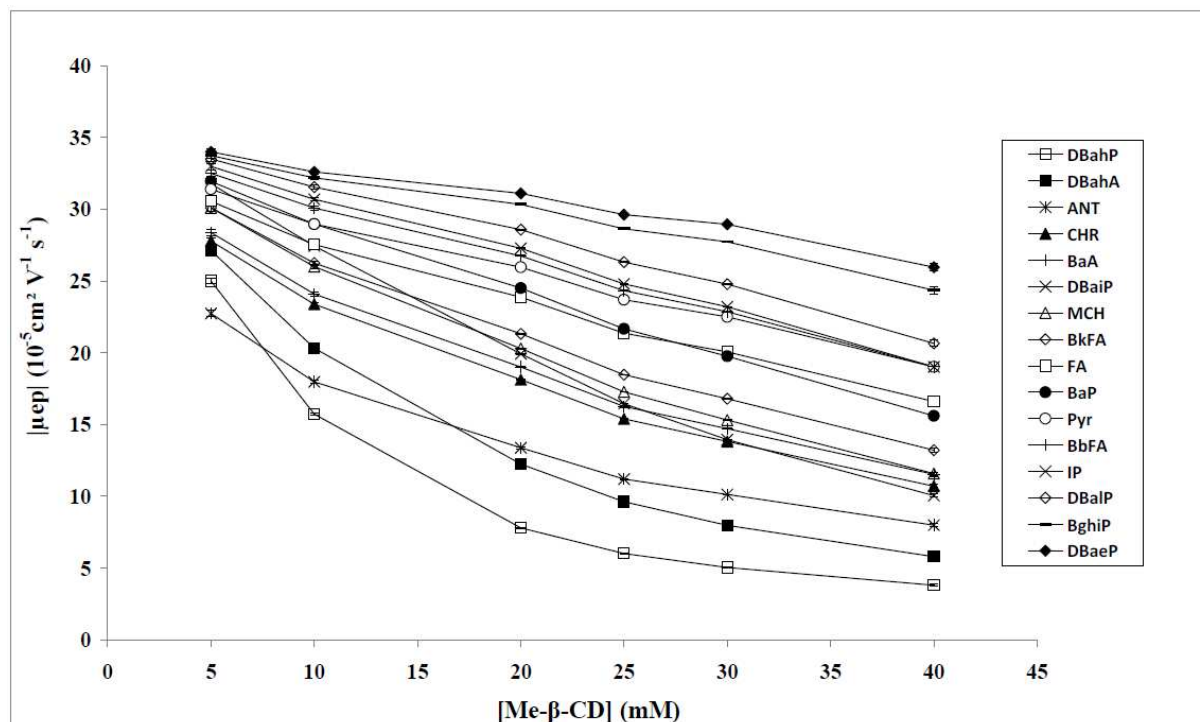


Figure II-I-4. Variation of the electrophoretic mobility (in absolute value) of 16 PAHs as a function of Me-β-CD concentration (experimental conditions: see Figure II-I-3).

Eventually, the CD composition allowing the best compromise between separation selectivity, efficiency and analysis time was 20 mM Me-β-CD and 10 mM SBE-β-CD. Under these optimized conditions, in order to provide a deeper insight into method selectivity, three new PAHs (BjFA, ACP, and PHE) that could not be detected at the 100 µg/L level were added to the studied standard mixture at 1 mg/L for ACP and PHE and 200 µg/L for BjFA. ACP and PHE were fully baseline resolved from other PAHs whereas BjFA co-migrated with Pyr. As BcFLR was provided in cyclohexane, this compound was injected separately from the mixture in the presence of umbelliferone (IS) and analyzed in the same electrophoretic conditions. By comparing its normalized migration time ($t_{\text{MBcFLR}}/t_{\text{MIS}}$) with normalized migration times of other PAHs, BcFLR was found to be separated from all other PAHs and to migrate between BkFA and FA (normalized migration times: $t_{\text{MBcFLR}}/t_{\text{MIS}} = 1.60 \pm 0.015$, $t_{\text{MBkFA}}/t_{\text{MIS}} = 1.47 \pm 0.01$, $t_{\text{MFA}}/t_{\text{MIS}} = 1.66 \pm 0.013$ and estimated resolutions: $R_s(\text{BcFLR/BkFA}) = 7.7 \pm 0.2$ and $R_s(\text{FA/BcFLR}) = 2.0 \pm 0.2$). Finally, 19 PAHs were baseline resolved in less than 15 min with efficiencies greater than 1.5×10^5 and resolutions greater than 1.5 for all pairs, except for BjFA and Pyr, which still co-migrated. The resulting electropherogram is presented in

Figure II-I-5 with its corresponding electrophoretic figures of merit given in Table II-I-3. A considerable improvement of method selectivity and repeatability was therefore achieved in comparison with previously published work [49,50]. For a signal to noise ratio of 10, the limits of quantitation of the method were roughly estimated, from 5 repetitions, between 6.0 and > 1000 µg/L depending on the PAH (Table II-I-3).

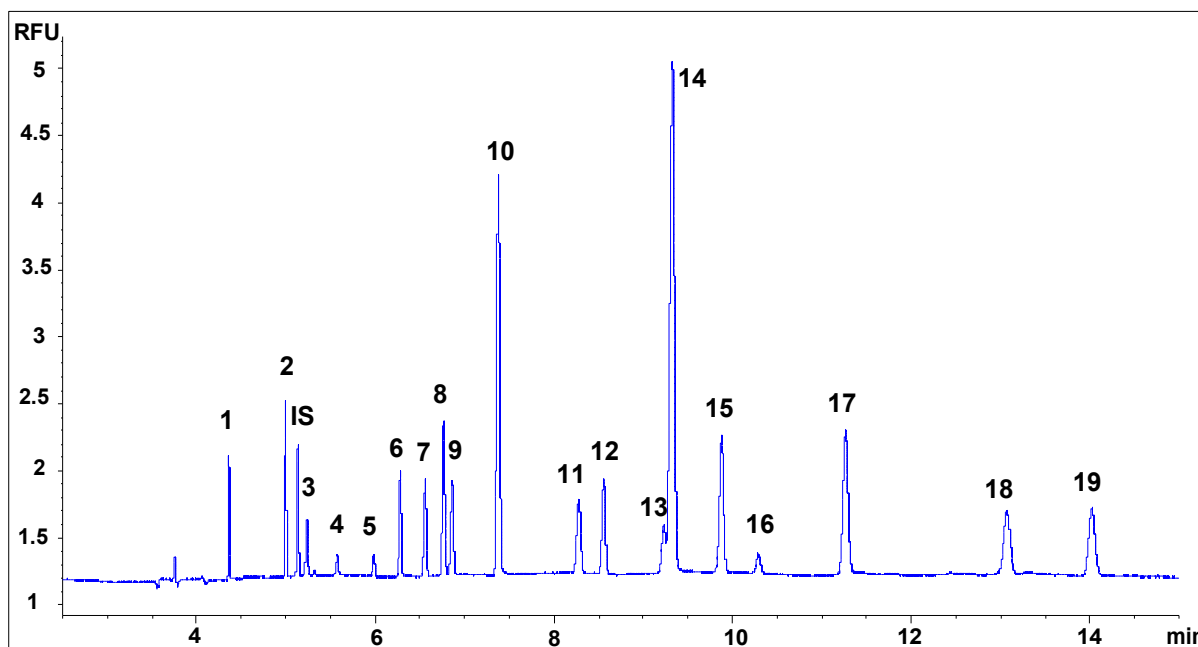


Figure II-I-5. Electropherogram of a standard mixture of 19 PAHs. BGE: 10 mM sodium borate buffer (pH 9.2), 600 mM urea, 10 mM SBE- β -CD, and 20 mM Me- β -CD in 9:1 (v/v) water-MeOH mixture. Temperature, 25°C. Applied voltage, 18 kV. PAH concentration, 100 µg/L (except for ACP and PHE, 1 µg/L, and BjFA, 200 µg/L) in ACN-MeOH-BGE 6:34:60, (v/v/v). Other conditions: see Figure II-I-1. Identification: 1, DBahP; 2, DBahA; 3, ANT; 4, ACP; 5, PHE; 6, CHR; 7, BaA; 8, DBaiP; 9, MCH; 10, BkFA; 11, FA; 12, BaP; 13, BjFA; 14, Pyr; 15, BbFA; 16, IP; 17, DBaIP; 18, BghiP; 19, DBaeP; IS: umbelliferone.

Table II-I-3. Migration times (t_{mi}), theoretical plates, limits of quantitation (LOQ) and relative standard deviations (RSD) for migration times and normalized corrected areas for the CD-CZE analysis of a 19 PAH standard mixture (conditions, see Figure II-I-5).

PAH	t_{mi} (min)	Theoretical plates (10^5)	LOQ* ($\mu\text{g/L}$)	RSD for migration times (n = 6) (%)	RSD for normalized corrected areas (n = 6) (%)
DBaHP	4.4	5.37	20	0.8	2.2
DBaHA	5.0	4.32	15	0.9	2.0
IS	5.1	3.91	20	0.8	2.3
ANT	5.2	3.16	50	0.8	1.2
ACP	5.6	1.64	> 1000	0.9	2.1
PHE	6.0	2.41	> 1000	0.9	2.2
CHR	6.3	2.91	25	0.9	2.1
BaA	6.6	2.65	30	1.0	3.8
DBaIP	6.8	2.76	20	1.1	4.1
MCH	6.9	2.34	30	1.0	3.7
BkFA	7.4	2.42	10	1.0	2.2
FA	8.3	1.85	40	1.1	3.4
BaP	8.6	2.43	30	1.2	2.1
BjFA	9.2	2.95	125	1.3	3.3
Pyr	9.3	1.56	10	1.3	3.3
BbFA	9.9	2.08	20	1.3	2.9
IP	10.3	1.95	140	1.4	4.9
DBaIP	11.3	1.89	20	1.5	3.5
BghiP	13.1	1.52	45	1.6	4.3
DBaEP	14.0	1.72	40	1.7	3.9

* LOQs were roughly estimated at 100 $\mu\text{g/L}$ (except for ACP and PHE, 1 mg/L , and BjFA, 200 $\mu\text{g/L}$) for a signal to noise ratio of 1

3.4 Application to real samples

The developed CD-CZE method was applied to real samples, two edible oils: a sunflower oil and an Isio 4[®] oil, which is a mixture of rapeseed, sunflower, grape seed, and high content oleic acid sunflower oils. Each oil was first extracted with a commercial molecularly imprinted polymer dedicated to PAH analysis. The obtained extract was next evaporated to dryness and reconstituted in ACN-MeOH-BGE (1:3:6, v/v/v) before CE analysis. Oil extracts were first spiked only with IS at 100 $\mu\text{g/L}$ and next with 16 PAHs at 100 $\mu\text{g/L}$ (except for MCH, BaP, and DBaEP, 150 $\mu\text{g/L}$, ANT, FA, and BghiP, 200 $\mu\text{g/L}$, and IP, 400 $\mu\text{g/L}$), listed by US-EPA and/or EFSA as priority pollutants in environmental and food samples and representing the full migration window of studied PAHs. The spiked levels were selected in order to insure a

signal to noise ratio of at least 30 for all PAHs, allowing an estimation of potential matrix effect.

Figure II-I-6 presents the resulting typical electropherograms obtained for a standard mixture (A), a sunflower oil extract (B), and an Isio 4[®] oil extract (C).

When both oil extracts were spiked with IS at 100 µg/L (Figure II-I-6B (1) and Figure II-I-6C (1)), the resulting electropherograms are quite clean with a flat baseline. Only a small peak appears, for both oil extracts, corresponding to normalized migration time of Pyr. The Isio 4[®] extract was spiked with 6 µg/L of Pyr, which corresponded to the estimated Pyr concentration, and the resulting electropherogram shows (Figure II-I-6C (3)) a unique peak with an increased area value by a factor of about 2, confirming the presence of Pyr in the oil extract.

When both oil extracts were spiked with IS plus 16 PAHs, the resulting electropherograms (Figure II-I-6B (2) and Figure II-I-6C (2)) show that the separation was maintained from a qualitative point of view. As Isio 4[®] is made from a mixture of rapeseed, sunflower, grape seed, and high content oleic acid sunflower oils, it seems that the developed CE method is thus reliable for different kinds of edible oil extracts.

From a quantitative point of view, Table II-I-4 presents the average normalized corrected areas and normalized heights for CE analyses ($n = 3$) of PAHs in standard mixture, spiked sunflower oil extract, and spiked Isio 4[®] oil extract.

After comparing the average results obtained for each PAH in each extract with the ones obtained with the standard mixture (homogeneity of the variance plus Student test with a 5% risk), it was observed that the normalized corrected areas were not significantly different for all PAHs except DBaHP, DBaIP, and DBaLP in sunflower oil extract and DBaLP and BghiP in Isio 4[®] oil extract. For these compounds, belonging to the most hydrophobic tested PAHs, a matrix effect was measured inducing an under-estimation of the PAH amount between 7 to 21%. Comparing normalized heights obtained with standard mixture and oil extracts, they were not significantly different for all PAHs except DBaHP, DBaIP, IP, DBaLP, BghiP, and DBaEP in sunflower extract and DBaHP, DBaIP, and DBaLP in Isio 4[®] extract. Once more, a difference appeared for the most hydrophobic tested PAHs, inducing a decrease in LOQs for the determination of these compounds in real samples. This matrix effect observed for the most hydrophobic PAHs would necessitate for the validation step either calibration in oil samples or standard addition method. The full validation study is currently being performed in the laboratory and will be presented in another paper. Nevertheless, using the CE method developed here, PAHs in different spiked edible oil extracts were successfully separated.

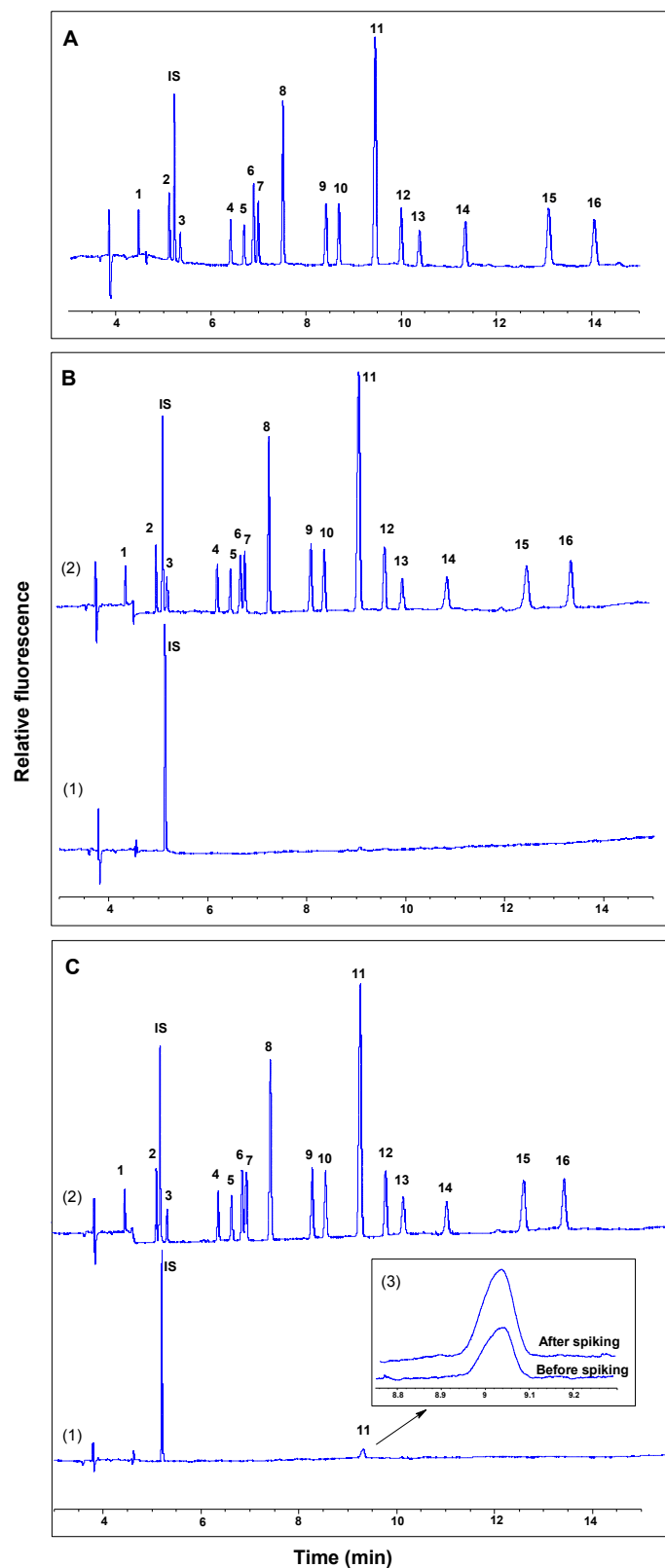


Figure II-I-6. CE analysis of (A) standard mixture, (B) sunflower oil extract, and (C) Isio 4[®] oil extract, (1) spiked with IS at 100 µg/L, (2) spiked with IS at 100 µg/L plus 16 PAHs and (3) superimposition of blank oil and the same oil spiked with IS at 100 µg/L and Pyr at 6 µg/L. CE conditions and PAH identification: see Figure II-I-5 and Figure II-I-1, respectively. PAH concentration, 100 µg/L (except for MCH, BaP, and DBaP, 150 µg/L, ANT, FA, and BghiP, 200 µg/L, and IP, 400 µg/L) in ACN-MeOH-BGE 1:3:6 (v/v/v).

Table II-I-4. Normalized corrected areas and normalized heights for CE analyses (n = 3) of standard mixture, spiked sunflower oil extract, and spiked Isio 4[®] oil extract. Experimental conditions: see Figure II-I-6.

PAH	Standard mixture		Sunflower oil		Isio 4 [®] oil	
	Normalized corrected areas	Normalized heights	Normalized corrected areas	Normalized heights	Normalized corrected areas	Normalized heights
DBahP	0.23 ± 0.02*	0.24 ± 0.01	0.19 ± 0.02	0.19 ± 0.01	0.21 ± 0.02	0.21 ± 0.01
DBahA	0.37 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.34 ± 0.02	0.34 ± 0.01	0.37 ± 0.02	0.37 ± 0.01
ANT	0.20 ± 0.02	0.17 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.16 ± 0.01
CHR	0.29 ± 0.02	0.24 ± 0.01	0.28 ± 0.02	0.24 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.26 ± 0.01
BaA	0.26 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.25 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.22 ± 0.01
DBaiP	0.46 ± 0.01	0.41 ± 0.01	0.40 ± 0.03	0.29 ± 0.01	0.43 ± 0.02	0.36 ± 0.01
MCH	0.41 ± 0.04	0.35 ± 0.03	0.40 ± 0.02	0.32 ± 0.01	0.42 ± 0.01	0.35 ± 0.01
BkFA	1.10 ± 0.06	0.93 ± 0.07	1.05 ± 0.02	0.90 ± 0.02	1.09 ± 0.03	0.95 ± 0.02
FA	0.45 ± 0.04	0.33 ± 0.04	0.45 ± 0.02	0.35 ± 0.01	0.46 ± 0.01	0.37 ± 0.02
BaP	0.42 ± 0.03	0.34 ± 0.03	0.39 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.41 ± 0.03	0.34 ± 0.01
Pyr	1.75 ± 0.13	1.20 ± 0.10	1.79 ± 0.10	1.27 ± 0.05	1.81 ± 0.03	1.34 ± 0.10
BbFA	0.41 ± 0.03	0.32 ± 0.01	0.39 ± 0.02	0.31 ± 0.01	0.41 ± 0.01	0.33 ± 0.01
IP	0.26 ± 0.03	0.20 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.16 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.18 ± 0.01
DBaiP	0.33 ± 0.03	0.24 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.16 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.17 ± 0.01
BghiP	0.42 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.38 ± 0.03	0.22 ± 0.01	0.39 ± 0.02	0.27 ± 0.01
DBaeP	0.37 ± 0.03	0.27 ± 0.01	0.32 ± 0.02	0.22 ± 0.01	0.33 ± 0.01	0.26 ± 0.01

*: average value ± standard deviation

4. Conclusions

A highly selective CD-CZE method suitable for the analysis of PAHs was developed. The use of a buffer containing 10 mM SBE- β -CD and 20 mM Me- β -CD allowed the simultaneous separation of 19 PAHs of environmental and food concerns listed by international regulatory institutions in less than 15 min with RSD varying from 0.8 to 1.7 % and from 1.2 to 4.9 % for migration times and normalized corrected peak areas, respectively. Efficiencies greater than 10^5 and resolutions greater than 1.5 were obtained, except for the pair BjFA/Pyr. Applications to oil extracts demonstrated the reliability of the method with real samples. Heavy PAH isomers such as the 4 dibenzopyrenes, which are generally difficult to separate using chromatographic methods, were easily resolved with good repeatabilities, proving the capability of CE methods for the analysis of neutral and hydrophobic compounds. As two PAHs were still co-migrating, an experimental design will be used to further optimize the method resolution.

References

- [1] T. McGrath, R. Sharma, M. Hajaligol, *Fuel* 80 (2001) 1787-1797.
- [2] S.G. Wakeham, C. Schaffner, W. Giger, *Geochim. Cosmochim. Acta* 44 (1980) 403-413.
- [3] M. Rojas, B. Marie, J.M. Vignaud, N. Martinet, J.I. Siat, G. Grosdidier, I. Cascorbi, K. Alexandrov, *Cancer Letters* 207 (2004) 157-163.
- [4] Findings of the EFSA Data Collection on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food, 29 June 2007, Available on: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/33r.pdf>.
- [5] W. Moreda, M.C. Pérez-Camino, A. Cert, *J. Chromatogr. A* 936 (2001) 159-171.
- [6] N. De Kruijf, T. Schouten, G.H.D. Van der Stegen, *J. Agric. Food. Chem.* 35 (1987) 545-549.
- [7] M.D. Guillen, P. Sopelana, G. Palencia, *J. Agric. Food. Chem.* 52 (2004) 2123-2132.
- [8] United States Environmental Protection Agency, Appendix A to 40 CFR Part 423, Available on: <http://www.epa.gov/region1/npdes/permits/generic/prioritypollutants.pdf>.
- [9] European Commission, Opinion of the Scientific Committee on Food on the Risks to Human Health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food SCF/CS/CNTM/PAF/29/Final, 4 December 2002.
- [10] Summary and Conclusions of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, in: Sixty-Fourth meeting, Rome, 2005 (JECFA/64/SC).
- [11] Polycyclic aromatic hydrocarbons, scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain, EFSA J. 724 (2008) 1.
- [12] T. Wenzl, R. Simon, E. Anklam, J. Kleiner, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 716-725.
- [13] S. Moret, L.S. Conte, *J. Sep. Sci.* 25 (2002) 96-100.
- [14] B.H. Chen, C.Y. Wang, C.P. Chiu, *J. Agric. Food. Chem.* 44 (1996) 2244-2251.
- [15] C. Chiu, Y. Lin, B. Chen, *Chromatographia* 44 (1997) 497-504.
- [16] S. Danyi, F. Brose, C. Brasseur, Y.-J. Schneider, Y. Larondelle, L. Pussemier, J. Robbens, S. De Saeger, G. Maghuin-Rogister, M.-L. Scippo, *Anal. Chim. Acta* 633 (2009) 293-299.
- [17] A. Barranco, R.M. Alonso-Salces, A. Bakkali, L.A. Berrueta, B. Gallo, F. Vicente, M. Sarobe, *J. Chromatogr. A* 988 (2003) 33-40.
- [18] V.G. Zuin, L. Montero, C. Bauer, P. Popp, *J. Chromatogr. A* 1091 (2005) 2-10.
- [19] M. João Ramalhosa, P. Paíga, S. Morais, C. Delerue-Matos, M.B. Prior Pinto Oliveira, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 3529-3538.
- [20] P. Mottier, V. Parisod, R.J. Turesky, *J. Agric. Food. Chem.* 48 (2000) 1160-1166.
- [21] M.C. Rojo Camargo, M.C.F. Toledo, *Food Control* 14 (2003) 49-53.
- [22] J.K. Houessou, C. Delteil, V. Camel, *J. Agric. Food. Chem.* 54 (2006) 7413-7421.
- [23] N. Barco-Bonilla, R. Romero-González, P. Plaza-Bolaños, J.L. Fernández-Moreno, A. Garrido Frenich, J.L. Martínez Vidal, *Anal. Chim. Acta* 693 62-71.
- [24] M. Herrero, V. García-Cañas, C. Simo, A. Cifuentes, *Electrophoresis* 31 (2010) 205-228.
- [25] L. Song, Z. Xu, J. Kang, J. Cheng, *J. Chromatogr. A* 780 (1997) 297-328.
- [26] M. Geiger, A.L. Hogerton, M.T. Bowser, *Anal. Chem.* 84 (2012) 577-596.
- [27] S.E. Deeb, M.A. Iriban, R. Gust, *Electrophoresis* 32 (2011) 166-183.
- [28] S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, *Anal. Chem.* 56 (1984) 111-113.
- [29] S. Terabe, K. Otsuka, T. Ando, *Anal. Chem.* 57 (1985) 834-841.
- [30] O. Brüggemann, R. Freitag, *J. Chromatogr. A* 717 (1995) 309-324.
- [31] C.L. Copper, T.D. Staller, M.J. Sepaniak, *Polycyclic Aromat. Compd.* 3 (1993) 121 - 135.
- [32] P.G. Muijselaar, H.B. Verhelst, H.A. Claessens, C.A. Cramers, *J. Chromatogr. A* 764 (1997) 323-329.
- [33] Y. Shi, J.S. Fritz, *Anal. Chem.* 67 (1995) 3023-3027.
- [34] G. Kavran, F.B. Erim, *J. Chromatogr. A* 949 (2002) 301-305.
- [35] N. Chen, S. Terabe, T. Nakagawa, *Electrophoresis* 16 (1995) 1457-1462.
- [36] J.H.T. Luong, *Electrophoresis* 19 (1998) 1461-1467.
- [37] Y. He, H.K. Lee, *J. Chromatogr. A* 749 (1996) 227-236.
- [38] C.L. Copper, M.J. Sepaniak, *Anal. Chem.* 66 (1994) 147-154.
- [39] S. Terabe, Y. Miyashita, Y. Ishihama, O. Shibata, *J. Chromatogr. A* 636 (1993) 47-55.
- [40] B. Jiménez, D.G. Patterson, J. Grainger, Z. Liu, M.J. González, M.L. Marina, *J. Chromatogr. A* 792 (1997) 411-418.
- [41] C.J. Smith, J. Grainger, D.G. Patterson, *J. Chromatogr. A* 803 (1998) 241-247.
- [42] K. Jinno, Y. Sawada, J. Liq. Chromatogr. 18 (1995) 3719-3727.
- [43] R. Dadoo, R.N. Zare, C. Yan, D.S. Anex, *Anal. Chem.* 70 (1998) 4787-4792.
- [44] V. Augustin, A. Jardy, P. Gareil, M.-C. Hennion, *J. Chromatogr. A* 1119 (2006) 80-87.
- [45] H. Fu, C. Xie, J. Dong, X. Huang, H. Zou, *Anal. Chem.* 76 (2004) 4866-4874.
- [46] F. Lelièvre, P. Gareil, Y. Bahaddi, H. Galons, *Anal. Chem.* 69 (1997) 393-401.

- [47] J.H.T. Luong, A.L. Nguyen, J. Chromatogr. A 792 (1997) 431-444.
- [48] O.H.J. Szolar, R.S. Brown, J.H.T. Luong, Anal. Chem. 67 (1995) 3004-3010.
- [49] R.S. Brown, J.H.T. Luong, O.H.J. Szolar, A. Halasz, J. Hawari, Anal. Chem. 68 (1996) 287-292.
- [50] A.-L. Nguyen, J.H.T. Luong, Anal. Chem. 69 (1997) 1726-1731.
- [51] A.M. Stockton, T.N. Chiesl, J.R. Scherer, R.A. Mathies, Anal. Chem. 81 (2009) 790-796.
- [52] www.biotage.com, Application note 715: Affinilute® MIP-PAH.
- [53] M.-L. Riekkola, S.K. Wiedmer, I.E. Valko, H. Sirén, J. Chromatogr. A 792 (1997) 13-35.
- [54] P.G. Muijselaar, H.A. Claessens, C.A. Cramers, J. Chromatogr. A 696 (1995) 273-284.

CHAPITRE II : Utilisation de stratégies multivariées pour l'optimisation de méthodes de séparation des HAP par électrophorèse capillaire

1. Utilisation d'un plan d'expériences pour l'optimisation d'une méthode de séparation de huit HAP par électrophorèse capillaire (article)

USE OF RESPONSE SURFACE METHODOLOGY TO OPTIMIZE THE SIMULTANEOUS SEPARATION OF EIGHT POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS BY CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS WITH LASER-INDUCED FLUORESCENCE DETECTION

Journal of Chromatography A, 1302 (2013) 181-190

Ludivine Ferey^{1,2,3,4,5,6}, Nathalie Delaunay^{1,5,6*}, Douglas N. Rutledge³, Alain Huertas⁷, Yann Raoul⁴, Pierre Gareil^{1,5,6}, Jérôme Vial^{2,5,6}

¹Chimie ParisTech, Laboratory of Physicochemistry of Electrolytes, Colloids and Analytical Sciences (PECSA), 75231 Paris cedex 05, France

²ESPCI ParisTech, Laboratory of Physicochemistry of Electrolytes, Colloids and Analytical Sciences (PECSA), 75231 Paris cedex 05, France

³AgroParisTech, UMR INRA 1145 Ingénierie Procédés Aliments, 75005 Paris, France

⁴Sofiprotéol, 75378 Paris cedex 08, France

⁵CNRS, UMR 7195, Paris, France

⁶UPMC Université Paris 06, Paris, France

⁷Lesieur, 92665 Asnières sur Seine, France

Key words: design of experiments, capillary zone electrophoresis, cyclodextrins, polycyclic aromatic hydrocarbons, fluorescence detection, edible oil

Abstract

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) are among the most targeted contaminants by international regulatory institutions. There is thus a need for fast, selective and sensitive analytical methods to quantify these compounds at trace levels in complex samples. This article focuses on the optimization by means of an experimental design of a CE method with laser-induced fluorescence detection for the fast simultaneous separation of 8 heavy PAHs among food and environmental priority pollutants: benzo(a)pyrene, benzo(a)anthracene, chrysene, benzo(b)fluoranthene, dibenzo(a,h)anthracene, indeno(1,2,3-cd)pyrene, benzo(k)fluoranthene, and benzo(ghi)perylene. In this method, capillary zone electrophoresis with a mixture of an anionic sulfobutyl ether- β -cyclodextrin (SBE- β -CD) and a neutral methyl- β -cyclodextrin (Me- β -CD) was used to separate PAHs, on the basis of their differential distribution between the two CDs. First, the factors most affecting PAH electrophoretic behavior were identified: SBE- β -CD and Me- β -CD concentrations and percentage of methanol added to the background electrolyte. Then, a response surface strategy using a central composite design was carried out to model the effects of the selected factors on the normalized migration times. To optimize the separation, desirability functions were applied on modeled responses: normalized migration time differences between peak end and peak start of two consecutive peaks, and overall analysis time. From the model, predicted optimum conditions were experimentally validated and full resolution of all 8 PAHs was achieved in less than 7 min using a borate buffer composed of 5.3 mM SBE- β -CD, 21.5 mM Me- β -CD and 10.3 % MeOH. This CE separation method was successfully applied to real edible oil analysis.

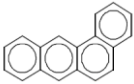
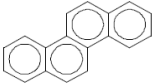
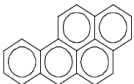
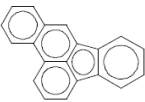
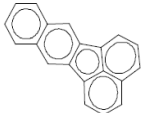
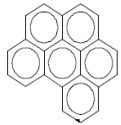
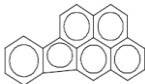
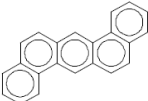
1. Introduction

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) constitute a large class of organic contaminants containing two or more fused aromatic rings. PAHs are released into the environment during incomplete combustion or pyrolysis of organic matter from anthropogenic (industrial processes and other human activities) and natural sources (forest fires and volcanoes) [1,2]. A number of PAHs have been identified as carcinogens, mutagens and genotoxins [3]. Human exposure to PAHs by inhalation of air and by ingestion of food is therefore a matter of concern. In food, PAH contamination largely arises from production practices such as smoking, grilling, roasting or drying although environmental contamination is also an issue. Indeed, vegetables, seeds and grains may be contaminated by the deposition of air particles or by growth in contaminated soil [4]. The most studied PAHs are those included in the United States Environmental Protection Agency list of priority pollutants: the 16 US-EPA PAHs [5]. In 2005, the European Commission created a new list of 15 priority PAHs in response to food-contamination problems based on a previous assessment by the Scientific Committee on Food [6,7]. Later, in 2008, the European Food Safety Authority officially added a 16th PAH, also considered as genotoxic, benzo(c)fluorene (BcFLR), to the European priority PAHs [8]. To distinguish this list from the set of 16 US-EPA PAHs, the term “15+1 EU priority PAHs” is commonly used. 8 PAHs known to be mutagenic or carcinogenic are in common between these two priority lists (Table II-II-1).

Effective and fast analytical methods for the investigation of these “8 priority PAHs” in environmental and food samples are therefore needed to respond to European legislation and to establish clearer contamination profiles. Currently, methods used for PAHs analysis include reversed phase LC coupled to UV [9,10] or fluorescence detection [9-14] or GC coupled to MS detection [15-17]. CE with its low operational costs, speed of analysis, portability, and easier transfer to chip format appears as an interesting alternative to chromatographic methods for rapid PAH analysis. Nevertheless, the analysis of PAHs by CE is not straightforward since they are neutral and highly hydrophobic compounds. To separate this type of compound, electrokinetic chromatographic techniques with various pseudo phases have been developed. Among these methods, micellar electrokinetic chromatography is the most widespread, and since its development in 1984 by Terabe et al. [18], micelles of alkylsulfates, alkylammonium or bile salts have mainly been employed [19-22]. However, the addition of a micellar phase alone does not provide enough selectivity to separate a large number of PAHs with very close chemical structures. These very hydrophobic compounds are almost totally incorporated in micelles resulting in an unbalanced and unselective partitioning between the aqueous and the micellar phase

[23,24]. Organic solvents [23,25-27] are generally added to the background electrolyte (BGE) to enhance selectivity by shifting the partition equilibrium of PAHs towards the bulk aqueous phase. Moreover, to achieve good solubility of PAHs in the aqueous BGE, high percentages of organic solvents (mostly acetonitrile (ACN)) are needed, resulting in micelle disruption. The separation mechanism is therefore based on hydrophobic interactions between PAHs and surfactant monomers, leading to a decrease in selectivity and prohibitive migration times.

Table II-II-1. Names, abbreviations, structures, molecular weights, and logP of studied PAHs.

Compound	Abbreviation	Structure	M _w (g.mol ⁻¹)	logP ^a
Benzo(a)anthracene	BaA		228	5.7
Chrysene	CHR		228	5.6
Benzo(a)pyrene	BaP		252	6.0
Benzo(b)fluoranthene	BbFA		252	6.6
Benzo(k)fluoranthene	BkFA		252	6.8
Benzo(ghi)perylene	BghiP		276	6.7
Indeno(1,2,3-cd)pyrene	IP		276	6.6
Dibenzo(a,h)anthracene	DBaA		278	6.7

^a INERIS toxicological and environmental data sheets

Addition of cyclodextrins (CD) to the micellar system for the separation of highly hydrophobic compounds was first reported by Terabe et al. [28]. Although better separations are often

obtained using this strategy, it still suffers from a lack of selectivity and long analysis times [29]. In order to improve resolutions, we developed a cyclodextrin-modified capillary zone electrophoresis method (CD-CZE) inspired by the work by Brown et al. [30] able to separate 19 PAHs in 15 min [31]. This method involved a mixture of neutral (methyl- β -CD, Me- β -CD) and charged (sulfobutyl ether- β -CD, SBE- β -CD) CDs in a sodium borate buffer containing 600 mM urea and 10 % (v/v) of methanol (MeOH). Separation is based on differential solute partitioning between the two CDs. The present article brings a deeper insight into separation optimization through a multivariate approach to maximize resolution of the “8 priority PAHs” while minimizing overall analysis time. The fast separation of this mixture is of interest since these PAHs belong to both lists currently under regulations for food and environmental samples and may allow rapid screening of samples. For the first time, the optimized method was applied to edible oil extracts to demonstrate its suitability for real sample analysis.

2. Materials and methods

2.1 Standards and electrolytes

Benzo(a)anthracene (> 99.5 %, BaA), benzo(b)fluoranthene (> 99.5 %, BbFA), benzo(a)pyrene (> 99.6 %, BaP), chrysene (> 99.6 %, CHR), and indeno(1,2,3-cd)pyrene (> 99.5 %, IP) used as standard samples at 10 mg/L in ACN were purchased from CIL Cluzeau (Sainte-Foy-La-Grande, France). Benzo(k)fluoranthene (> 98.0 %, BkFA), benzo(ghi)perylene (> 98.0 %, BghiP), dibenzo(a,h)anthracene (> 97.0 %, DBahA) and umbelliferone ($\geq$ 98.0 %) used as internal standard (IS) were supplied by Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France).

Me- β -CD with a degree of substitution (DS) of 12.6 methyl groups per CD (average molecular weight of 1310 g/mol), urea for electrophoresis ($\geq$ 99.99 %) and sodium tetraborate decahydrate ($\geq$ 99.5 %) were from Sigma-Aldrich. SBE- β -CD with an average DS of 6.2 per CD (average molecular weight of 2115 g/mol) was supplied by Cydex Pharmaceuticals (Lawrence, KS, USA). HPLC-grade ACN and MeOH were from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Three stock solutions of 10 mM sodium tetraborate decahydrate with 2.5 M urea, 100 mM SBE- β -CD, and 100 mM Me- β -CD were prepared every week by dissolving the appropriate amounts in ultra-pure water delivered by a Direct-Q3 UV system (Millipore, Molsheim, France) and stored at 4°C. The final BGE was obtained by mixing the three solutions above with MeOH in proportions to give the targeted CD concentrations and MeOH percentages. All BGE were prepared daily and filtered through a

0.20 μm cellulose acetate membrane (VWR). Stock solution of umbelliferone was prepared at 1.6 g/L in ethanol and diluted to 1.6 mg/L in water. Stock mixture solution of the 8 PAHs of interest with IS was prepared by mixing appropriate volumes of PAH standard solutions in ACN and IS stock solution to achieve the following concentrations: DBaA: 1 mg/L, CHR: 2 mg/L, BaA: 1 mg/L, BkFA: 0.3 mg/L, BaP: 2 mg/L, BbFA: 0.5 mg/L, IP: 3.5 mg/L, BghiP: 0.5 mg/L, and IS: 1.6 mg/L. PAH samples were prepared daily by diluting the above stock mixture solution by a factor 10 in BGE. The PAH concentrations were chosen to allow PAH identification thanks to their normalized corrected areas $(A_i / t_{Mi}) / (A_{IS} / t_{MIS})$, whatever the tested BGE.

2.2 Instrumentation

All CE experiments were performed on an Agilent Technologies HP 3D system (Massy, France) hyphenated with a laser-induced fluorescence (LIF) detection. Fluorescence excitation radiation was obtained from the 325 nm, 15 mW output of a HeCd laser (Model 3056-M-A02, Melles Griot, Voisins-Le-Bretonneux, France) and detection was done using a Zetalif Evolution detector (Picometrics, Toulouse, France). All radiation below 350 nm was filtered out before detection. A rise time of 0.05 s and a photomultiplier voltage of 750 V were selected. Instrument control and electrophoretic data acquisition were performed using HP 3D ChemStation. Capillaries used for separations were of bare fused-silica, 50 μm id x 49 cm (detection at 33.5 cm), from Photonlines (Marly-Le-Roi, France).

2.3 Electrophoretic conditions

New capillaries were activated by successive flushing with 1 M NaOH, 0.1 M NaOH, ultra-pure water and finally BGE, each under 935 mbar for 15 min (about 30 capillary volumes). Every day, the capillary was flushed with water, followed by the desired BGE, each under 935 mbar for 10 min (about 20 capillary volumes). Between each experiment, the capillary was flushed with water, ACN, MeOH, water and BGE each under 935 mbar for 3 min for water (about 5 capillary volumes) and 10 min for organic solvents and BGE (about 50 capillary volumes for ACN, 30 capillary volumes for MeOH, and 20 capillary volumes for BGE). At the end of the day, the capillary was successively rinsed with water, ACN, MeOH and water each under 935 mbar for 5 min for water (about 10 capillary volumes) and 15 min for organic solvents (about 80 capillary volumes for ACN, and 50 capillary volumes for MeOH). Hydrodynamic injections were performed applying 20 mbar for 5 s (about 0.3 % of

the capillary volume). Separations were run at 25°C under +14 kV. Between each run, BGE and PAH samples were freshly prepared whereas the capillary was changed mid-way through the experimental design before the 11th analysis.

2.4 Electroosmotic flow time

No fluorescent neutral markers could be found to determine electroosmotic flow (EOF) time, since all the compounds tested were always delayed due to an interaction with the anionic CD. This is why the first negative peak appearing on each electropherogram, which might be due to a water-organic solvent composition mismatch resulting from preferential inclusion of MeOH and ACN, was taken as the EOF time.

2.5 Statistical analysis software

Experimental design and optimization were performed using JMP 10.0 (S.A.S Institute Inc, Cary, NC, USA) and Excel 2007 (Microsoft Corporation, Courtaboeuf, France).

2.6 Real samples preparation

Samples of Isio 4[®] oil (which is a mixture of rapeseed, sunflower, grape seed, and high content oleic acid sunflower oils) were provided by Lesieur (Coudekerque, France). Solid phase extraction was carried out on cartridges packed with 25 mg of molecularly imprinted polymers (MIP) (Affinilute MIP PAH, 3 mL, Biotage, Uppsala, Sweden), using the procedure published in Biotage application note. Cartridges were first conditioned with 1 mL of cyclohexane. Then, 2 mL of oil sample, prepared by diluting 10 g of oil with 10 mL of cyclohexane, were percolated through the cartridge. After a drying step by means of vacuum, the cartridges were washed with 2 x 1 mL of cyclohexane to remove fat content (e.g. lipids, triglycerides, fatty acids) and once again dried. Finally, the elution was carried out with 3 mL of ethyl acetate. The eluate was evaporated to dryness under a nitrogen stream and reconstituted in ACN-MeOH-BGE (1/3/6, v/v) before CE analysis. Blank oil extracts were spiked only with IS at 100 µg/L. Oil extracts were next also spiked with DBaH, CHR, BaA, BaP, and BbFA, at 100 µg/L, BkFA at 50 µg/L, BghiP at 200 µg/L, and IP at 500 µg/L.

3. Experimental design

In this study, the optimization of separation parameters, applying a response surface design methodology, involved the following steps: selection of the most important factors influencing PAH electrophoretic behavior, definition of the responses to be measured, selection of the experimental design, implementation of the entire experimental setup and experimental determination of the responses, estimation of the coefficients of polynomial models describing the relationship between the responses and the factors, use of Derringer's desirability functions to determine the predicted optimum taking into account several responses simultaneously and finally experimental validation of the predicted optimum [32,33].

3.1 Choice of the factors and responses

The factors potentially most affecting selectivity of the method were: anionic (SBE- β -CD) and neutral (Me- β -CD) CDs concentrations and percentage of MeOH added to the BGE. Indeed, the selectivity of the method was expected to be highly dependent on CD concentrations since the separation mechanism is based on differential partitioning of solutes between the two CDs. Moreover, the concentrations of both CDs may also impact the BGE viscosity, while the charged one has an additional influence on BGE ionic strength. PAH solubility in samples and BGEs was also expected to be highly dependent on charged and neutral CD concentrations. Selectivity and hence resolutions could also be altered by the addition of organic modifiers to the BGE. This is why the percentage of MeOH was also identified as a relevant factor. Indeed, organic solvents are usually used to modify the retention mechanism by displacing the equilibrium partition of analytes from the CD cavities towards the aqueous phase. Moreover, the use of MeOH was not only expected to impact equilibrium constants between PAHs and CDs but also to slow down EOF and electrophoretic mobility of the SBE- β -CD by increasing the BGE viscosity and likely reducing the effective charge. Finally, MeOH content in the BGE highly altered PAHs solubilities. Other experimental parameters such as temperature, borate and urea concentrations in the BGE, voltage applied during the separation step and dimensions of the capillary were not considered and therefore maintained constant. The temperature was set at 25°C and the separation voltage was fixed at +14 kV after checking that no Joule effect appeared for all the tested BGEs. Urea and borate concentrations were kept at 600 mM and 10 mM, respectively. This high concentration of urea was previously determined to insure good PAH solubility in samples and BGEs whatever the experimental conditions [31]. The responses were PAH migration

times normalized by EOF time, normalized migration time differences between peak end and peak start of two consecutive peaks ($\Delta t_{i,j}$) and overall analysis time corresponding to the migration time of the last peak.

3.2 Selection of the experimental design

The chemometric approach consisted in a central composite design (CCD) which is among the most widely used response surface designs [34]. This type of design is frequently used during optimization of CE methods [35-39]. The design was constructed by combining a two-level full factorial design (2^3 experiments), a star design (2 x 3 experiments) and a center point (coded 0). In our study, the center point was replicated 6 times to estimate the experimental error. In the full factorial design, the three factors were situated at levels -1 and +1 and simultaneously modified. Three orthogonal blocks were chosen to avoid the coefficients of the model to be biased for example when changing capillary. The levels of the star design were therefore set at -1.6 and +1.6 [33]. For these points, factors were individually modified while the others were maintained at the 0 conditions. Each factor was therefore examined at five levels (-1.6, -1, 0, 1, +1.6). A total of 15 experimental conditions were finally evaluated.

The experimental design results were analyzed by building and interpreting a second-order polynomial quadratic model describing the relation between the experimental responses and the selected factors. Model coefficients for the linear terms, the first order interaction terms and the quadratic terms were calculated by means of a multiple linear regression according to equation (1):

$$y(X_{1 \leq i \leq 3}) = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=2}^3 \sum_{j=1}^{i-1} \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (\text{eq.1})$$

where $y(X_{1 \leq i \leq 3})$ was the experimental response, β_i the linear coefficients, β_{ii} the quadratic coefficients, β_{ij} the first order interaction coefficients, and ε the random error of the method [33].

3.3 Matrix of experiments

The experimental setup of the CCD was composed of 8 vertex points, 6 axis points and 6 center points. Experiments were performed in a random sequence within each block in order to minimize the influence of time-related uncontrolled factors on the responses. in Table II-II-

2, the three blocks, the experimental order, and factor levels in coded values for each run are presented.

Table II-II-2. Experimental design matrix.

Blocks	Experimental order	Factor 1: [SBE- β -CD]	Factor 2: [Me- β -CD]	Factor 3: MeOH %
I	1	0	0	0
	2	0	0	0
	3	-1	-1	1
	4	1	1	-1
	5	1	-1	-1
	6	-1	-1	-1
II	7	-1	1	1
	8	1	1	1
	9	1	-1	1
	10	-1	1	-1
	11	0	0	0
	12	0	0	0
III	13	0	1.6	0
	14	-1.6	0	0
	15	1.6	0	0
	16	0	0	-1.6
	17	0	0	1.6
	18	0	-1.6	0
	19	0	0	0
	20	0	0	0

3.4 Factor levels

Using a CCD, factors were examined in a symmetrical experimental domain assumed to contain the optimum. The range selected for each factor was chosen based on results gathered from previous experiments and represented the broadest interval in which factors could be varied due to experimental constraints.

Considering [SBE- β -CD], a value superior to 5 mM was required to maintain good PAH solubility and to achieve sufficient selectivity. The maximum value was set at 15 mM to allow the detection of all PAHs in less than 45 min for experiments coded (+1.6, 0, 0), (0, 0, +1.6), (+1, -1, +1). At higher anionic CD concentrations in some conditions, some PAHs did not appear on the electropherogram even after 60 min of analysis. In fact, for high SBE- β -CD

concentrations, the electroosmotic mobility became too low to drag PAHs to the detector. [Me- β -CD] was varied over a larger range: the low level was fixed at 5 mM for analyte solubility purposes whereas 40 mM represented the maximum level to keep BGE viscosity and therefore EOF within reasonable limits. Finally, a minimum of 10 % of MeOH was needed to avoid repeatability problems due to a possible evaporation and to keep satisfactory PAH solubility for experiments coded (0, 0, -1.6), (-1, -1, -1) and (-1.6, 0, 0). The maximum MeOH content was fixed at 25 % which allowed a detection of all PAHs in an analysis time of 60 min for experimental conditions (+1.6, 0, 0), (0, 0, +1.6), (+1, -1, +1) without CD precipitation.

The levels chosen for the three factors, in coded and real values, are presented in Table II-II-3.

Table II-II-3. Factors and factor levels investigated during the optimization study.

Factors	Coded values				
	-1.6	-1	0	+1	+1.6
[SBE- β -CD] (mM)	5.2	7	10	13	14.8
[Me- β -CD] (mM)	5.7	12	22.5	33	39.3
MeOH (%)	10.3	13	17.5	22	24.7

3.5 Desirability analysis

The optimization criteria concerned $\Delta t_{i,j}$ and overall analysis time, baseline resolutions between the 8 PAHs being required with a minimum analysis time.

As several responses needed to be optimized simultaneously, a multicriterion decision-making method using Derringer's desirability functions was applied to globally evaluate the separation performance [40,41]. In this approach, each response was transformed on a scale between 0, corresponding to the most undesirable value, and 1, representing the value that most fulfilled the requirements. The value of each transformed response was called "desirability value". Different transformations were used depending on whether the response needed to be maximized or minimized. The global desirability, D , was calculated according to equation (2) and was maximized to determine the predicted optimum.

$$D = (d_1^{w_1} \times d_2^{w_2} \times d_3^{w_3} \times \dots \times d_n^{w_n})^{\frac{1}{W}} \quad (\text{eq.2})$$

Where d_i are the individual desirability values, w_i , the corresponding weights, and $W = w_1 + w_2 + w_3 + \dots + w_n$.

3.6 Robustness evaluation

The main goal of the robustness test was to examine small changes in factors on the separation performances using an experimental design approach [42]. The factors were consequently varied over an interval corresponding to $\pm 5\%$ of the optimum conditions, which is representative of the experimental error likely to occur during BGE preparation. In this study, a two-level fractional factorial design was carried out to simultaneously evaluate the three factors (2^{3-1}).

4. Results and Discussion

4.1 Effects of factors on PAH migration

Once the entire experimental setup was performed and the experimental responses determined, the polynomial model, given in equation (1), was used to identify the factors of influence on PAH migration times normalized by EOF time. Using a classical least-squares multiple linear regression, the model coefficients, β , were estimated to evaluate factor effects. Coefficient significance was evaluated using a t-test comparing the coefficient estimate to its standard-deviation (obtained from the repeated experiments and the lack of fit of the model). A factor or an interaction was considered as significant with a 5 % risk of the first kind if the value of the t-ratio (coefficient normalized by its standard-deviation) was out of the range ± 2.2 . In Figure II-II-1, the regression coefficients (main, quadratic, and first order interaction coefficients) are schematically presented for BaP normalized migration time, whereas, in Table II-II-4, significant factors on normalized migration times of the 8 PAHs are summarized with their corresponding regression coefficients.

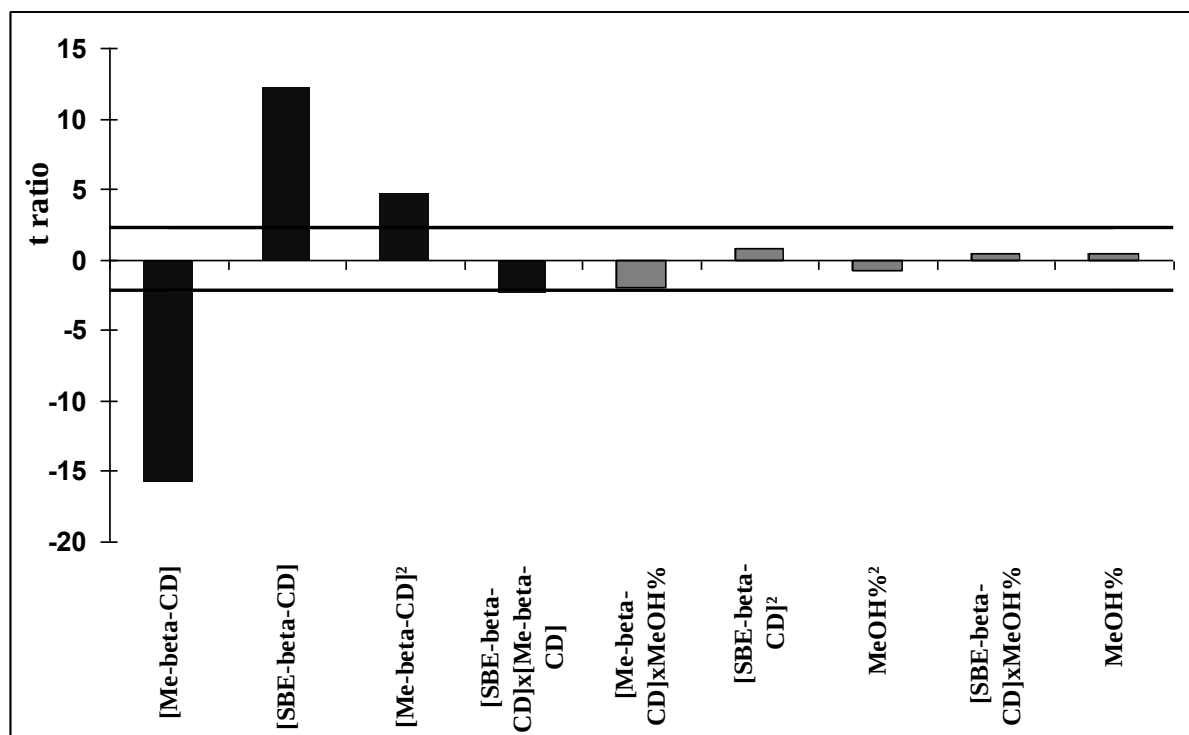


Figure II-II-1. Representation of the effects of factors SBE- β -CD and Me- β -CD concentrations and percentage of MeOH on BaP normalized migration time.

From a mathematical point of view, the correlations between terms made difficult a direct interpretation of the contribution of each factor individually. In the present case, significant coefficients could be related to physico-chemical interpretations in good agreement with expectation. Me- β -CD concentration had a significant negative effect on normalized migration times. Indeed, an increase in [Me- β -CD] favored PAH complexation with this neutral CD and therefore PAHs spent less time in anionic CD cavities, resulting in decreased migration times. On the contrary, [SBE- β -CD] had a significant positive effect on normalized migration times, as a result of PAH complexation by SBE- β -CD. However, for all PAHs, even if the last main factor, the percentage of MeOH, had a significant effect on migration times, it became non-significant after normalization by EOF time. For all PAHs, except BghiP, the quadratic term [Me- β -CD]² appeared to have an influence, validating the choice of a second-order polynomial quadratic modeling for migration time responses. Other quadratic terms ([SBE- β -CD]² and MeOH %²) were not significant. First-order interactions did not show a clear effect on normalized migration times since [SBE- β -CD] x [Me- β -CD] was a critical interaction for only two PAHs (DBahA and BaP), while [Me- β -CD] x MeOH % was only significant for BbFA. The last first-order interaction, [SBE- β -CD] x MeOH %, was never significant.

Table II-II-4. Significant factors with their coefficients for PAH migration times normalized by the EOF time.

PAHs	Normalized migration times	
	Significant factors	Regression coefficients
DBahA	[Me- β -CD]	-0.347
	[Me- β -CD] ²	0.184
	[SBE- β -CD]	0.167
	[SBE- β -CD]x[Me- β -CD]	-0.085
CHR	[Me- β -CD]	-0.318
	[SBE- β -CD]	0.228
	[Me- β -CD] ²	0.138
BaA	[Me- β -CD]	-0.317
	[SBE- β -CD]	0.235
	[Me- β -CD] ²	0.137
BkFA	[Me- β -CD]	-0.409
	[SBE- β -CD]	0.300
	[Me- β -CD] ²	0.165
BaP	[Me- β -CD]	-0.553
	[SBE- β -CD]	0.429
	[Me- β -CD] ²	0.167
	[SBE- β -CD]x[Me- β -CD]	-0.103
BbFA	[Me- β -CD]	-0.540
	[SBE- β -CD]	0.513
	[Me- β -CD] ²	0.136
	[Me- β -CD]x MeOH %	-0.130
IP	[Me- β -CD]	-0.599
	[SBE- β -CD]	0.514
	[Me- β -CD] ²	0.136
BgHiP	[SBE- β -CD]	0.712
	[Me- β -CD]	-0.496

4.2 Optimization of PAH separation

Using the same approach as before, $\Delta t_{i,j}$ and overall analysis time responses were fitted with a second-order polynomial function to provide an overview of how factors and interactions impacted the performance of PAH separation (see Table II-II-5 giving experimental responses obtained for each point of the experimental design matrix). Calculated R^2 for all 7 $\Delta t_{i,j}$ and global analysis time ranged between 0.78 and 0.97, except for the response $\Delta t_{BbFA,IP}$, which was not as well modeled as others responses with a R^2 of 0.54 (see Table II-II-6 for detailed values of R^2 and adjusted R^2). As indicated previously, PAH identification and

consequently PAH migration order were determined using normalized corrected areas of PAHs. Whatever the experimental conditions, the 8 compounds were found to migrate in the same order. The optimization of PAH separation was therefore based on the study of the 7 $\Delta t_{i,j}$ and the migration time of the last eluting compound (BghiP) for analysis time evaluation.

The prominent effects on $\Delta t_{i,j}$ responses were due to SBE- β -CD and Me- β -CD concentrations. MeOH percent had not such a clear effect since it effected few responses (significant factor for $\Delta t_{DBAhA,CHR}$, $\Delta t_{BkFA,BaP}$, and $\Delta t_{BaP,BbFA}$). $[Me-\beta-CD]^2$ was the only quadratic term needed to correctly model $\Delta t_{i,j}$ responses, since it had a significant effect on 4 out of the 7 responses. Interaction terms had lower effects on $\Delta t_{i,j}$. However, the three main factors were found to have significant effects on analysis time (Figure II-II-2).

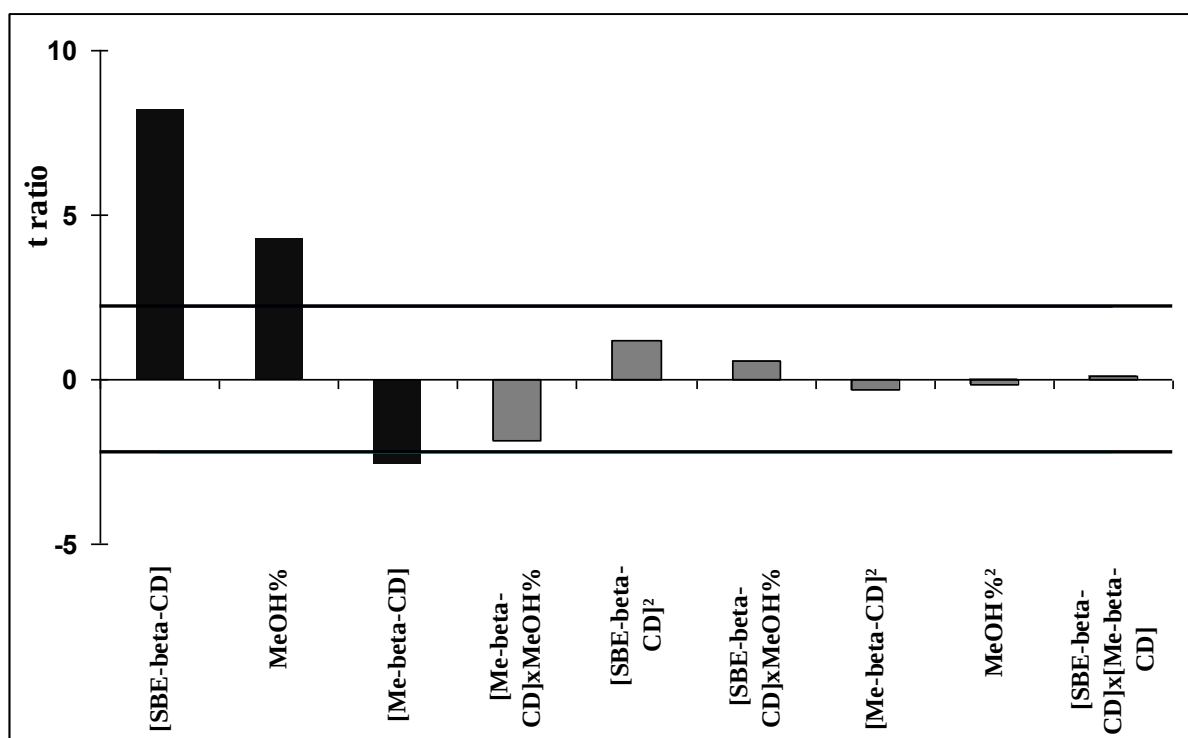


Figure II-II-2. Representation of the effects of factors SBE- β -CD and Me- β -CD concentrations and percentage of MeOH on analysis time (BghiP migration time).

The optimization of PAH separation was performed using Derringer's desirability functions enabling a simultaneous optimization of all responses. In this study, all $\Delta t_{i,j}$ were linearly transformed on the same scale between 0 and 1 for response values going from 0 to the root mean square error value (RMSE). Each response had therefore its own desirability function. As analysis time was optimal when it was minimized, desirability values were set at 0, 0.5, and 1 for analysis time of 25, 20, and 15 min respectively.

Table II-II-5. Experimental design matrix with experimental responses.

Blocks	Experimental order	Factor 1: [SBE- β -CD]	Factor 2: [Me- β -CD]	Factor 3: MeOH %	$\Delta t_{\text{DbahA,CHR}}^*$	$\Delta t_{\text{CHR,BaA}}$	$\Delta t_{\text{BaA,BkFA}}$	$\Delta t_{\text{BkFA,BaP}}$	$\Delta t_{\text{BaP,BbFA}}$	$\Delta t_{\text{BbFA,IP}}$	$\Delta t_{\text{IP,BghiP}}$	Analysis time (min)**
I	1	0	0	0	0.19	0.01	0.13	0.36	0.25	0.06	0.78	20.69
	2	0	0	0	0.20	0.05	0.09	0.41	0.27	-0.05	0.75	19.98
	3	-1	-1	1	0.06	0.02	0.16	0.44	0.16	0.15	0.65	20.84
	4	1	1	-1	0.38	0.04	0.18	0.31	0.42	0.03	1.12	26.04
	5	1	-1	-1	0.27	0.06	0.25	0.49	0.21	0.10	0.47	22.26
	6	-1	-1	-1	0.19	0.02	0.19	0.36	0.18	0.14	0.46	15.66
II	7	-1	1	1	0.09	0.01	0.05	0.20	0.15	0.02	0.68	17.28
	8	1	1	1	0.18	0.03	0.10	0.34	0.26	0.04	1.00	26.3
	9	1	-1	1	0.06	0.12	0.20	0.89	0.30	-0.04	0.90	34.42
	10	-1	1	-1	0.15	0.01	0.07	0.16	0.21	0.00	0.70	14.07
	11	0	0	0	0.18	0.04	0.13	0.42	0.26	0.03	0.85	22.13
	12	0	0	0	0.21	0.02	0.15	0.37	0.26	0.10	0.86	22.22
III	13	0	1.6	0	0.16	0.03	0.06	0.21	0.24	-0.04	0.78	18.43
	14	-1.6	0	0	0.11	0.01	0.08	0.23	0.17	0.06	0.67	14.68
	15	1.6	0	0	0.33	0.07	0.22	0.67	0.46	0.09	1.57	37.23
	16	0	0	-1.6	0.32	0.04	0.16	0.30	0.33	0.04	0.76	17.35
	17	0	0	1.6	0.14	0.00	0.15	0.42	0.23	0.15	1.10	29.51
	18	0	-1.6	0	-0.02	0.05	0.32	0.58	0.14	0.17	0.47	27.79
	19	0	0	0	0.22	0.03	0.15	0.42	0.29	0.10	0.99	23.97
	20	0	0	0	0.21	0.02	0.15	0.40	0.29	0.12	0.98	24.18

* $\Delta t_{i,j}$: normalized migration time difference between peak end and peak start of two consecutive peaks i and j

**migration time of the last peak (BghiP)

Table II-II-6. R^2 and adjusted R^2 values for all models.

Response	R^2	adjusted R^2
$t_{m,DBahA}/t_{eo}^a$	0.96	0.92
$t_{m,CHR}/t_{eo}$	0.96	0.93
$t_{m,BaA}/t_{eo}$	0.95	0.90
$t_{m,BkFA}/t_{eo}$	0.97	0.93
$t_{m,BaP}/t_{eo}$	0.98	0.96
$t_{m,BbFA}/t_{eo}$	0.97	0.94
$t_{m,IP}/t_{eo}$	0.96	0.93
$t_{m,BghiP}/t_{eo}$	0.92	0.85
$\Delta t_{DBahA,CHR}^b$	0.97	0.93
$\Delta t_{CHR,BaA}$	0.78	0.58
$\Delta t_{BaA,BkFA}$	0.90	0.81
$\Delta t_{BkFA,BaP}$	0.95	0.91
$\Delta t_{BaP,BbFA}$	0.92	0.85
$\Delta t_{BbFA,IP}$	0.54	0.13
$\Delta t_{IP,BghiP}$	0.84	0.69
Analysis time (min) ^c	0.91	0.82

^a $t_{m,i}/t_{eo}$: migration time of PAH i normalized by EOF time

^b $\Delta t_{i,j}$: normalized migration time differences between peak end and peak start of two consecutive peaks i and j

^c migration time of the last peak (BghiP)

As most of the responses had desirability values of 1, the global desirability only needed to consider desirabilities related to the 3 critical pairs of PAHs ($\Delta t_{DBahA,CHR}$, $\Delta t_{CHR,BaA}$, and $\Delta t_{BbFA,IP}$) and to the analysis time. The global desirability was numerically maximized. A weight of 1 was given to all individual desirabilities, except for analysis time for which a weight of 20 was attributed. Optimal conditions predicted by the model were in coded values: -1.57 for [SBE- β -CD], -0.09 for [Me- β -CD] and -1.60 for MeOH % (see Figure II-II-3) corresponding to a BGE composed of 5.3 mM SBE- β -CD, 21.5 mM [Me- β -CD] and 10.3 % MeOH.

The response surface plots, estimated by the model, representing the analysis time and the $\Delta t_{i,j}$ for the 3 critical pairs of PAHs versus the significant factors ([SBE- β -CD] and [Me- β -CD]) with MeOH percent fixed at its optimum (-1.60) are shown in Figure II-II-4.

On the analysis time surface plot, the domain located below the grid corresponds to the experimental domain for which analysis time was lower than 15 min, whereas for the other responses, the domain situated above the z-axis plane corresponds to the experimental conditions satisfying the requirements of $\Delta t_{i,j}$ for critical PAH pairs being superior to the RMSE value. Below each response surface plot, a 2D contour plot shows the isoresponse lines as a function of the levels of the two variables. A maximum point was obtained for $\Delta t_{BbFA,IP}$ (for low contents of SBE- β -CD and Me- β -CD), whereas saddle response surfaces

are observed more for $\Delta t_{DBaA,CHR}$ and $\Delta t_{CHR,BaA}$. Except for $\Delta t_{BbFA,IP}$, $\Delta t_{i,j}$ for critical PAH pairs increased with [SBE- β -CD] to the detriment of analysis time.

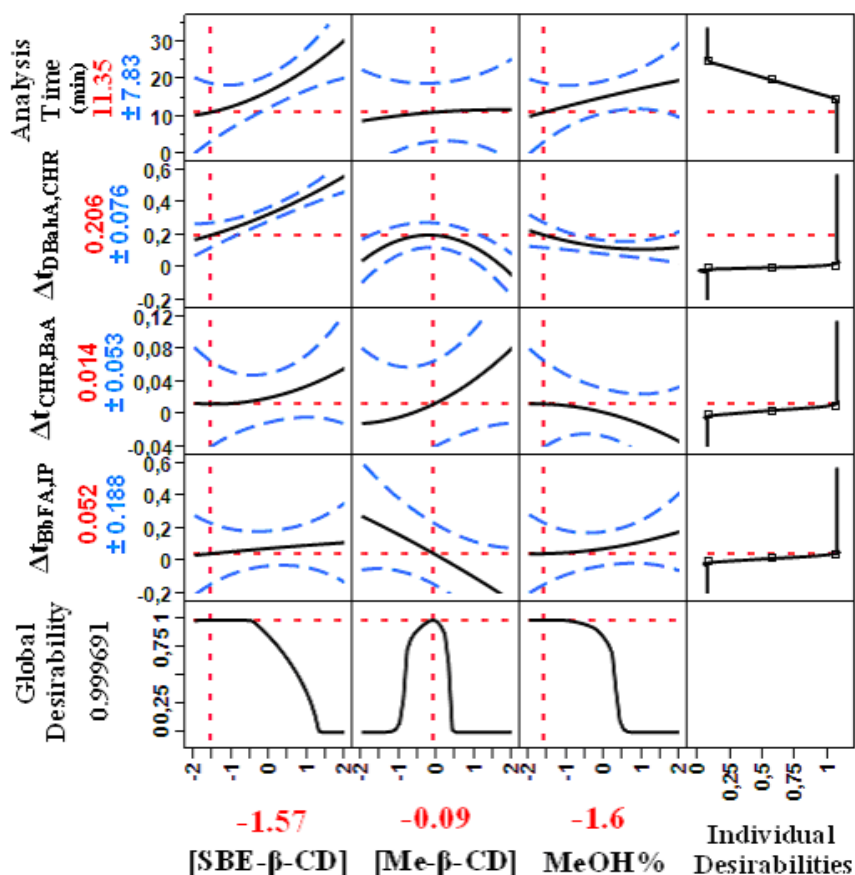


Figure II-II-3. Optimization carried out by means of the prediction profiler of JMP software. The four responses of interest correspond to the first four rows with their individual desirability function represented in the last column. The last row gives the global desirability as a function of the three studied factors, SBE- β -CD and Me- β -CD concentrations and percentage of MeOH represented at optimum coded values in the first three columns. Values appearing under the global desirability and each response are indicated as the predicted values at optimized conditions $\pm$ the corresponding 95 % confidence interval.

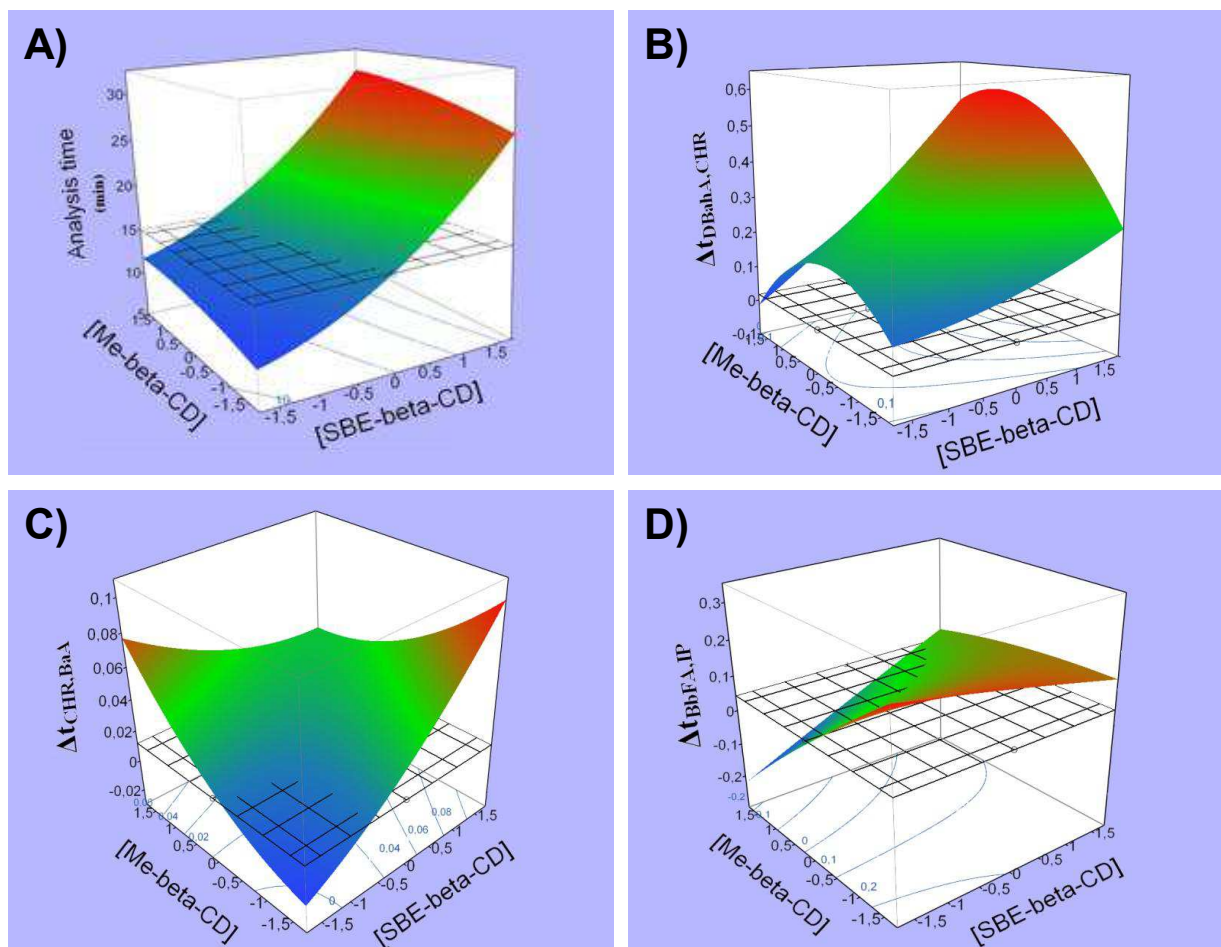


Figure II-II-4. Response surface plots of analysis time (A) and of normalized migration time differences between peak end and peak start for (B) $\Delta t_{DBaA,CHR}$, (C) $\Delta t_{CHR,BaA}$, (D) $\Delta t_{BbFA,IP}$ as a function of SBE- β -CD and Me- β -CD concentrations with percentage of MeOH set at -1.6. The grid values at 15 min for analysis time and at the root mean square error values for normalized migration time differences correspond to the values chosen for desirability analysis. The 2D contour plots below response surface plots represent the isoresponse lines.

The contour diagrams of the 4 studied responses as a function of the 3 factors were overlaid and optimum domains verifying the previously stated requirements (i.e. maximum analysis time of 15 min and $\Delta t_{i,j}$ above the RMSE value) were represented in white zones (Figure II-II-5). The optimal conditions predicted by the model (-1.57 for [SBE- β -CD], -0.09 for [Me- β -CD] and -1.60 for MeOH %), indeed, are within the white zones.

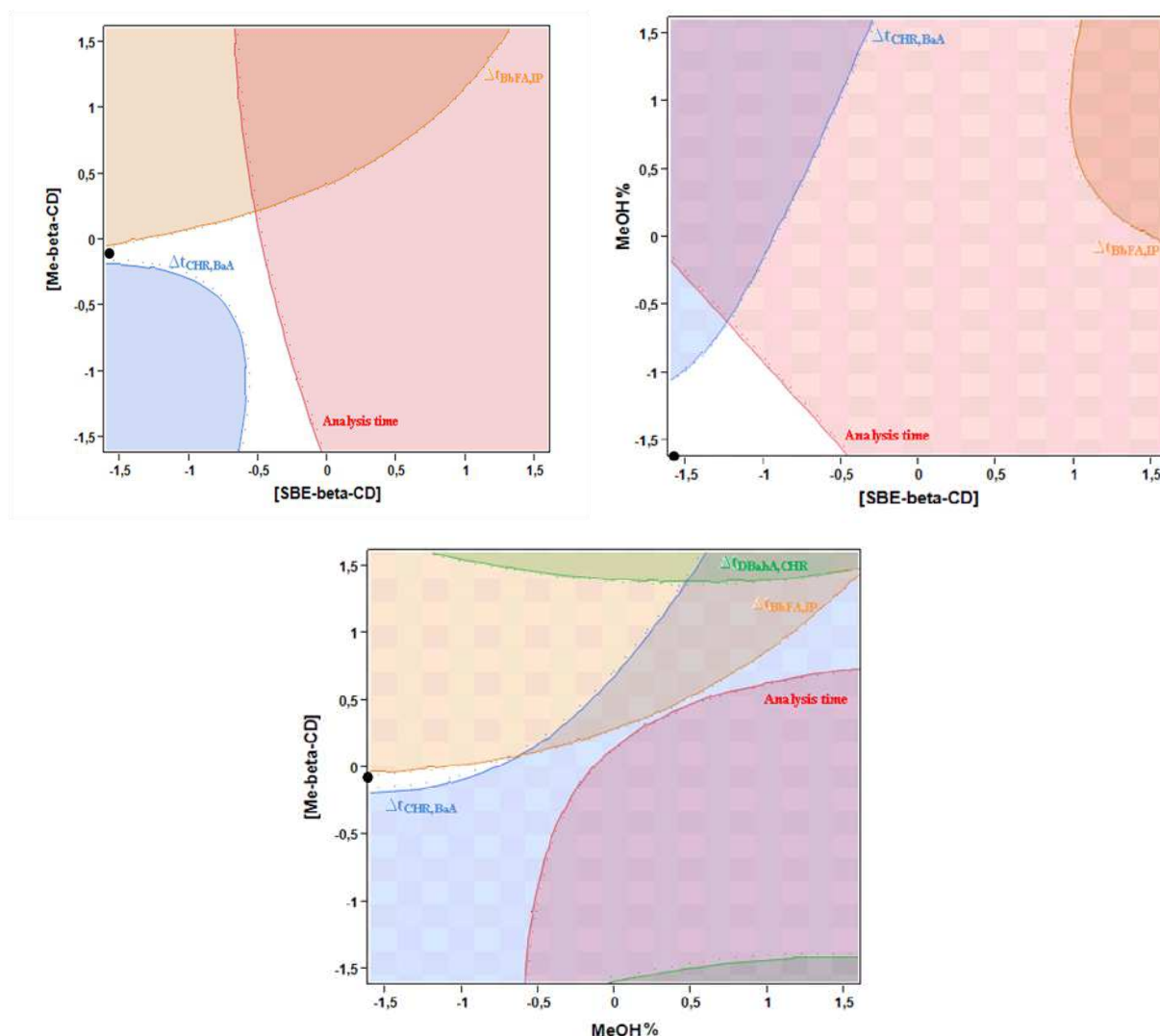


Figure II-II-5. Contour diagrams of the four responses of interest (analysis time, $\Delta t_{\text{DBaA,CHR}}$, $\Delta t_{\text{CHR,BaA}}$, and $\Delta t_{\text{BbFA,IP}}$) as a function of the three studied factors. The white zone corresponds to the optimum domain (analysis time inferior to 15 min and differences of time between PAH critical pairs superior to the quadratic mean of the RMSE of each pair) with (●) optimum conditions.

4.3 Experimental validation and evaluation of resolution robustness

Once the relationship between the experimental parameters and the responses were modeled and the optimum conditions were predicted, an experimental validation was performed to verify these conditions meet the requirements and thereby validate the model. An electrophoretic separation of the 8 PAHs of interest in the presence of umbelliferone (IS) was carried out using a 10 mM sodium borate buffer containing 600 mM urea, 5.3 mM SBE- β -CD, 21.5 mM Me- β -CD and 10.3 % MeOH. Under these conditions, all peaks were baseline resolved in 14 min, as shown by the resulting electropherogram presented in Figure II-II-6.

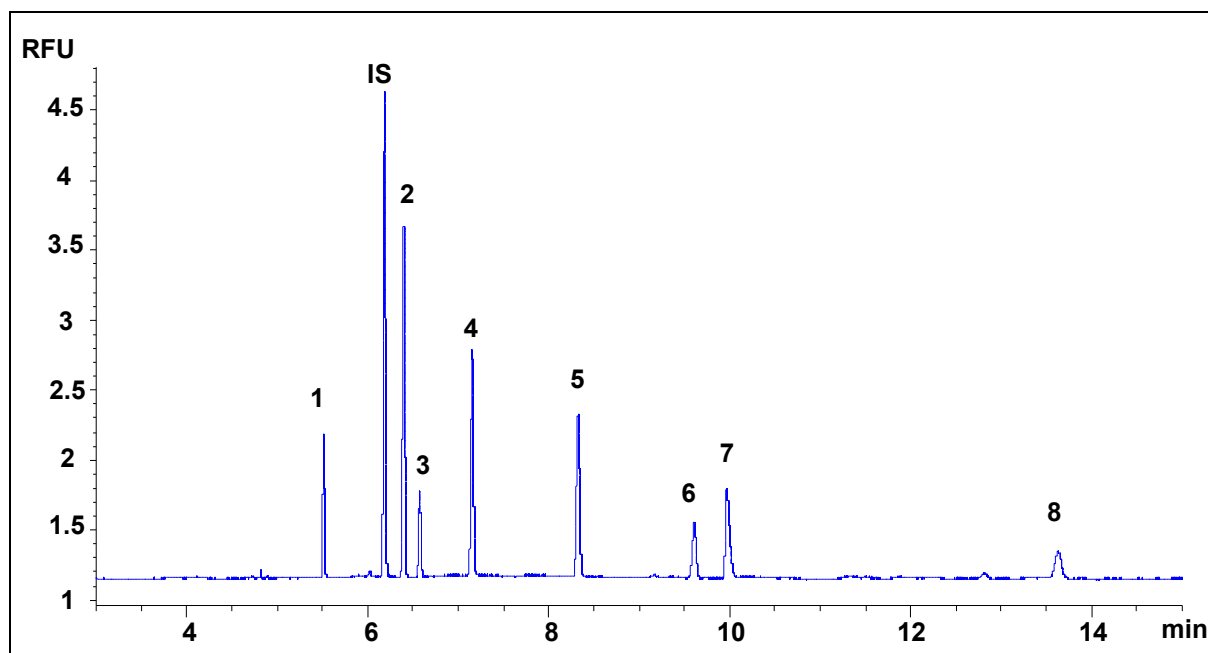


Figure II-II-6. Electropherogram of a standard mixture of the 8 PAHs of interest using optimized conditions. Applied voltage: +14 kV. Bare fused-silica capillary, 50 μm I.D. x 49 cm (LIF detection at 33.5 cm). BGE: 10 mM sodium borate buffer (pH 9.2), 600 mM urea, 5.3 mM SBE- β -CD, and 21.5 mM Me- β -CD in 89.7:10.3 (v/v) water-MeOH mixture. Temperature, 25°C. LIF detection, excitation: 325 nm; emission: > 350 nm. Sample: PAHs in 1:9 (v/v) ACN-BGE mixture. Identification: 1, DBaH (100 $\mu\text{g/L}$); 2, CHR (400 $\mu\text{g/L}$); 3, BaA (100 $\mu\text{g/L}$); 4, BkFA (66 $\mu\text{g/L}$); 5, BaP (200 $\mu\text{g/L}$); 6, BbFA (50 $\mu\text{g/L}$); 7, IP (700 $\mu\text{g/L}$); 8, BghiP (50 $\mu\text{g/L}$); IS: umbelliferone (160 $\mu\text{g/L}$).

To evaluate the performance of the model, experimental and predicted responses were compared for the optimal design point. The $\Delta t_{i,j}$ values for the critical PAH pairs obtained experimentally were 0.176, 0.018, and 0.055, which were close to the values predicted by the model: 0.206, 0.014, and 0.052 for $\Delta t_{\text{DBaH,CHR}}$, $\Delta t_{\text{CHR,BaA}}$ and $\Delta t_{\text{BbFA,IP}}$, respectively (with RMSEs for predicted values of 0.018, 0.012, and 0.044, respectively). As previously stated requirements were achieved (all PAH pairs were baseline resolved in less than 15 min), the optimization strategy used here was therefore validated.

Up to now, the separation voltage was kept constant at +14 kV in order to avoid Joule effect whatever the tested BGE. As the effect of the separation voltage on the responses did not depend on the effects of other factors, this factor was therefore optimized separately. Under the optimized conditions, the highest value of separation voltage without generating Joule effect was found to be +22 kV, which resulted in halving the analysis time (from 14 min at +14 kV to 7 min at +22 kV). The electropherogram obtained for a standard mixture of the 8 PAHs in the presence of IS, at concentrations chosen to give similar peak heights for all components, is presented in Figure II-II-7A with the corresponding electrophoretic figures of merit given in Table II-II-7. At the optimized separation voltage, the 8 PAHs remained

baseline resolved with efficiencies greater than 1.0×10^5 and resolutions ≥ 3.0 in less than 7 min. Typical RSD variations were determined from 6 repetitions, giving values between 0.2 and 1.2 % for normalized migration times and between 2.3 and 6.2 % for normalized corrected peak areas.

Table II-II-7. Figures of merit for the CD-CZE analysis of the 8 PAHs of interest (conditions, see Figure II-II-7A).

PAH	t_{Mi} (min)	N^* (10^5)	R_s	Repeatability RSD for normalized migration times ** (n = 6) (%)	Repeatability RSD for normalized corrected areas *** (n = 6) (%)
DBahA	3.0	1.86		0.2	3.6
CHR	3.5	1.75	17.0	0.4	3.7
BaA	3.6	1.73	3.0	0.4	2.3
BkFA	3.9	1.66	10.0	0.5	3.4
BaP	4.5	1.69	14.1	0.6	3.6
BbFA	5.0	1.68	12.9	0.8	4.9
IP	5.2	1.29	4.2	0.8	6.2
BghiP	6.9	1.10	22.9	1.2	3.9

* Efficiency values were calculated using the equation: $N = 5.54 \times (t_m/w_{1/2})^2$ with $w_{1/2}$, the peak width at half height

** PAH migration times were normalized with the EOF migration time

*** PAH corrected peak areas were normalized with corrected peak areas of the IS

Robustness evaluation was performed using a screening design to study the influence of minor controlled changes in factors on the separation. As the experimental error due to the electrolyte preparation was evaluated at about 5 %, the 3 selected factors were therefore simultaneously varied within a range of ± 5 % of their optimized levels by means of a 2^{3-1} design. Domains representing ± 5 % of the optimum conditions were determined in original values between 5.0 and 5.6 mM for [SBE- β -CD] (between -1.67 and -1.47 in coded values), 20.4 and 22.6 mM for [Me- β -CD] (between -0.20 and 0.01 in coded values), and 9.8 and 10.8 % for MeOH % (between -1.71 and -1.49 in coded values). Resolutions between neighboring peaks were studied. Within these domains, the robustness of the separation was confirmed, since all PAHs remained baseline resolved with resolutions ≥ 2.5 (Table II-II-8).

The migration order of PAHs depends on their distribution between the two CDs, with early migrating PAHs having more affinity for the neutral CD, and later migrating compounds favoring complexation with the anionic CD. Here, no relationship between PAH hydrophobicity and size was observed, resulting in a highly selective method enabling baseline resolutions of isomeric compounds such as BaA/CHR and BbFA/BkFA.

Table II-II-8. Resolutions between PAH critical pairs for robustness evaluation.

Factor 1: [SBE- β -CD] (mM)	Factor 2: [Me- β -CD] (mM)	Factor 3: MeOH %	R _s (DBahA/CHR)	R _s (CHR/BaA)	R _s (BbFA/IP)
5.0	20.4	10.8	17.7	2.6	4.1
5.6	20.4	9.8	22.0	2.9	4.0
5.0	22.6	9.8	17.2	2.5	3.3
5.6	22.6	10.8	16.4	2.8	3.7

4.4 Application to a real sample

The optimized CD-CZE method was applied to a real sample: Isio 4[®] oil, an edible oil composed of rapeseed, sunflower, grape seed, and high content oleic acid sunflower oils. The oil was first extracted with a commercial molecularly imprinted polymer dedicated to PAH analysis. The obtained extract was next evaporated to dryness and reconstituted in ACN-MeOH-BGE (1/3/6, v/v) before CE analysis. An addition of 30 % MeOH to the extract was necessary to avoid the formation of a microemulsion mainly due to residual triglycerides. Blank oil extract was first spiked only with IS at 100 μ g/L. Oil extract was next spiked with the 8 PAHs at 100 μ g/L (except for BkFA, 50 μ g/L, IP, 500 μ g/L and BghiP, 200 μ g/L), listed by US-EPA and EFSA as priority pollutants in environmental and food samples. The spiked levels were selected to obtain similar peak heights for all PAHs. Figure II-II-7B presents the resulting typical electropherograms. When oil extract was spiked with IS alone (Figure II-II-7B (1)), the electropherogram was quite clean with a flat baseline. Moreover, when oil extract was spiked with IS plus 8 PAHs, the electropherogram (Figure II-II-7B (2)) showed that the separation was kept with resolutions superior to 3.0. As Isio 4[®] is made from a mixture of rapeseed, sunflower, grapeseed, and high content oleic acid sunflower oils, the developed CE method seems to be reliable for different kinds of edible oils.

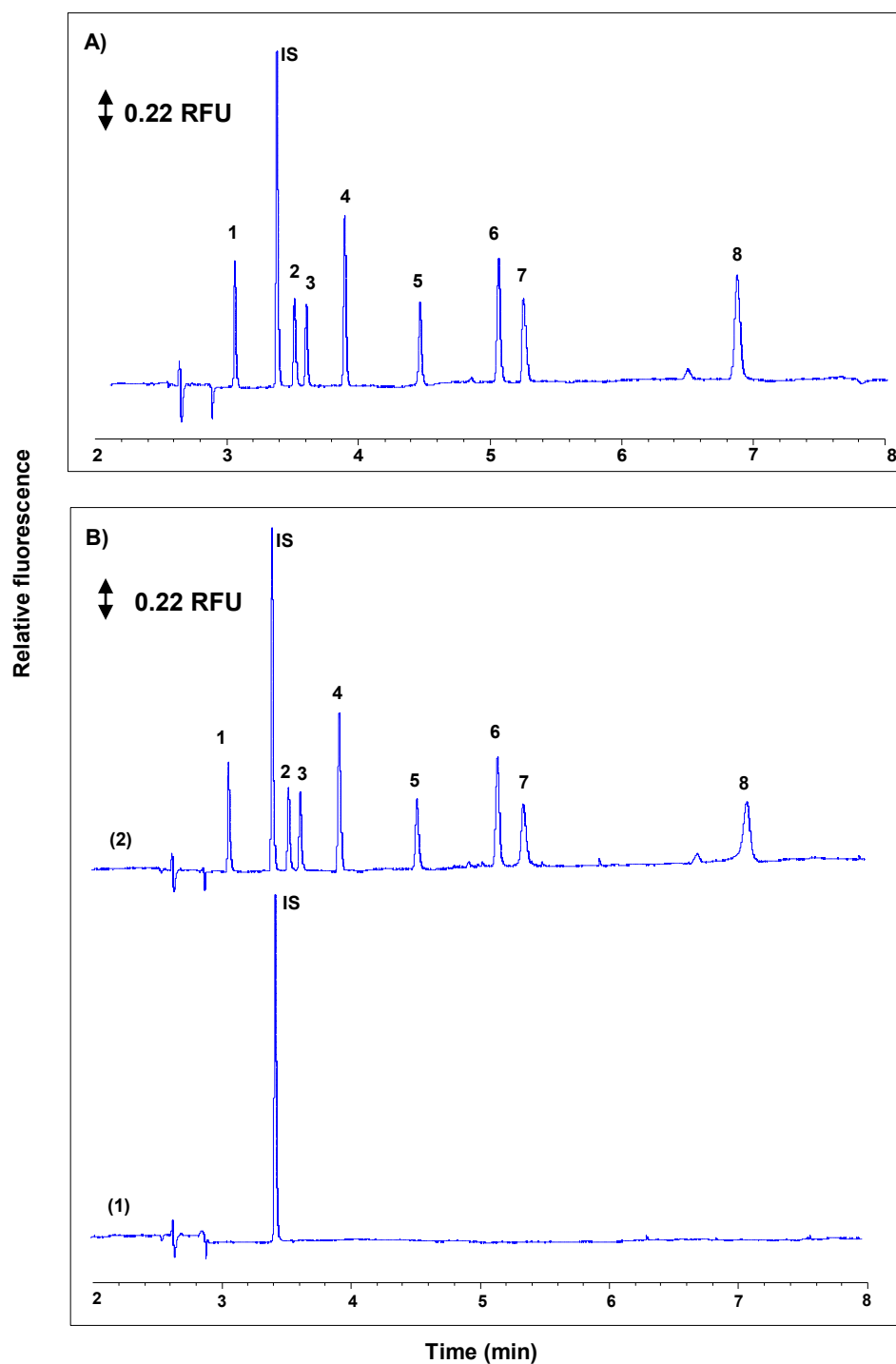


Figure II-II-7. CE analysis of (A) standard mixture and (B) Iso 4[®] oil extract (1) spiked with IS at 100 µg/L or (2) spiked with IS at 100 µg/L plus 8 PAHs. Applied voltage: +22 kV. Sample: PAHs in 1:3:6 (v/v) ACN-MeOH-BGE mixture. Identification: 1, DBahA (100 µg/L); 2, CHR (100 µg/L); 3, BaA (100 µg/L); 4, BkFA (50 µg/L); 5, BaP (100 µg/L); 6, BbFA (100 µg/L); 7, IP (500 µg/L); 8, BghiP (200 µg/L); IS: umbelliferone (100 µg/L). Other conditions: see Figure II-II-6.

5. Conclusions

The central composite design presented here appeared suitable to optimize a simple, selective, and fast CD-CZE method for the analysis of 8 PAHs listed as priority pollutants by the United States Environmental Protection Agency and the European Food Safety Authority, leading to a universal screening method for environmental and food samples.

A second-order polynomial modeling of relevant responses as a function of the main factors (anionic and neutral CD concentrations and MeOH percent) with the use of a desirability analysis, allowed the determination of optimal conditions. Under the optimized conditions, baseline resolutions of all PAHs were obtained in less than 7 min using a BGE composed of 5.3 mM SBE- β -CD, 21.5 mM Me- β -CD and 10.3 % MeOH. The separation of isomeric compounds (such as BaA/CHR and IP/BbFA), with resolutions superior to 3.0, demonstrated the high selectivity of this CZE method. The resolution robustness of the method was also verified using a screening design. Finally, the CE method developed here was successfully applied to a spiked edible oil extract, proving the applicability of the optimized method to real samples. In the near future, this analytical method will be quantitatively validated for the analysis of PAHs in a variety of oil samples.

References

- [1] T. McGrath, R. Sharma, M. Hajaligol, *Fuel* 80 (2001) 1787.
- [2] S.G. Wakeham, C. Schaffner, W. Giger, *Geochim. Cosmochim. Acta* 44 (1980) 403.
- [3] M. Rojas, B. Marie, J.M. Vignaud, N. Martinet, J.L. Siat, G. Grosdidier, I. Cascorbi, K. Alexandrov, *Cancer Letters* 207 (2004) 157.
- [4] Findings of the EFSA data collection on polycyclic aromatic hydrocarbons in food (29 June 2007) available on: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/33r.pdf>.
- [5] United States Environmental Protection Agency, Appendix A to 40 CFR Part 423, available on: <http://www.epa.gov/region1/npdes/permits/generic/prioritypollutants.pdf>.
- [6] European Commission, Opinion of the Scientific Committee on Food on the Risks to Human Health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in food (4 December 2002) SCF/CS/CNTM/PAF/29/Final.
- [7] Summary and Conclusions of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Sixty-Fourth meeting, Rome (2005) JECFA/64/SC.
- [8] Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain, *EFSA Journal* 724 (2008) 1.
- [9] S. Danyi, F. Brose, C. Brasseur, Y.-J. Schneider, Y. Larondelle, L. Pussemier, J. Robbens, S. De Saeger, G. Maghuin-Rogister, M.-L. Scippo, *Anal. Chim. Acta* 633 (2009) 293.
- [10] B.H. Chen, C.Y. Wang, C.P. Chiu, *J. Agric. Food. Chem.* 44 (1996) 2244.
- [11] A. Barranco, R.M. Alonso-Salces, A. Bakkali, L.A. Berrueta, B. Gallo, F. Vicente, M. Sarobe, *J. Chromatogr. A* 988 (2003) 33.
- [12] V.G. Zuin, L. Montero, C. Bauer, P. Popp, *J. Chromatogr. A* 1091 (2005) 2.
- [13] M. João Ramalhosa, P. Paíga, S. Morais, C. Delerue-Matos, M.B. Prior Pinto Oliveira, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 3529.
- [14] S. Moret, L.S. Conte, *J. Sep. Sci.* 25 (2002) 96.
- [15] N. Barco-Bonilla, R. Romero-González, P. Plaza-Bolaños, J.L. Fernández-Moreno, A. Garrido Frenich, J.L. Martinez Vidal, *Anal. Chim. Acta* 693 (2011) 62.
- [16] P. Mottier, V. Parisod, R.J. Turesky, *J. Agric. Food. Chem.* 48 (2000) 1160.
- [17] J.K. Houessou, C. Delteil, V. Camel, *J. Agric. Food. Chem.* 54 (2006) 7413.
- [18] S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, *Anal. Chem.* 56 (1984) 111.
- [19] P.G. Muijselaar, H.B. Verhelst, H.A. Claessens, C.A. Cramers, *J. Chromatogr. A* 764 (1997) 323.
- [20] O. Brüggemann, R. Freitag, *J. Chromatogr. A* 717 (1995) 309.
- [21] R.O. Cole, M.J. Sepaniak, W.L. Hinze, J. Gorse, K. Oldiges, *J. Chromatogr. A* 557 (1991) 113.
- [22] C.L. Copper, T.D. Staller, M.J. Sepaniak, *Polycyclic Aromat. Compd.* 3 (1993) 121.
- [23] G. Kavran, F.B. Erim, *J. Chromatogr. A* 949 (2002) 301.
- [24] C.L. Copper, M.J. Sepaniak, *Anal. Chem.* 66 (1994) 147.
- [25] J.H.T. Luong, *Electrophoresis* 19 (1998) 1461.
- [26] T. Kaneta, T. Yamashita, T. Imasaka, *Anal. Chim. Acta* 299 (1995) 371.
- [27] X. Fu, J. Lu, Y. Chen, *Talanta* 46 (1998) 751.
- [28] S. Terabe, Y. Miyashita, Y. Ishihama, O. Shibata, *J. Chromatogr. A* 636 (1993) 47.
- [29] B. Jiménez, D.G. Patterson, J. Grainger, Z. Liu, M.J. González, M.L. Marina, *J. Chromatogr. A* 792 (1997) 411.
- [30] R.S. Brown, J.H.T. Luong, O.H.J. Szolar, A. Halasz, J. Hawari, *Anal. Chem.* 68 (1996) 287.
- [31] L. Ferey, N. Delaunay, D. Rutledge, C.B.Y. Cordella, H. This, A. Huertas, Y. Raoul, P. Gareil, *Talanta*, submitted.
- [32] Y. Vander Heyden, C. Perrin, D.L. Massart, Optimization strategies for HPLC and CZE, in *Handbook of Analytical Separations, Vol.1, Separation methods in Drug Synthesis and Purification*, Elsevier, Amsterdam, 2000, pp. 163.
- [33] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. De Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, in *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*, Elsevier, Amsterdam, 1997.
- [34] D.C. Montgomery, *Design and Analysis of Experiments*, John Wiley, New York, 4th ed., 1997.
- [35] J. Schappler, D. Guillard, J. Prat, J.-L. Veuthey, S. Rudaz, *Electrophoresis* 28 (2007) 3078.
- [36] L. González, U. Akesolo, R.M. Jiménez, R.M. Alonso, *Electrophoresis* 23 (2002) 223.
- [37] C. Sarazin, N. Delaunay, C. Costanza, V. Eudes, P. Gareil, J. Vial, *J. Sep. Sci.* 35 (2012) 1351.
- [38] M.C.V. Mamani, J.A. Farfan, F.G.R. Reyes, S. Rath, *Talanta* 70 (2006) 236.
- [39] F. Ronda, J.M. Rodríguez-Nogales, D. Sancho, B. Ollite, M. Gomez, *Food Chemistry* 108 (2008) 287.
- [40] G. Derringer, R. Suich, *J. Qual. Technol.* 12 (1980) 214.
- [41] B. Bourguignon, D.L. Massart, *J. Chromatogr. A* 586 (1991) 11.
- [42] Y. Vander Heyden, A. Nijhuis, J. Smeyers-Verbeke, B.G.M. Vandeginste, D.L. Massart, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24 (2001) 723.

2. Utilisation d'une stratégie basée sur un plan d'expériences pour l'optimisation d'une méthode de séparation de dix-neuf HAP par électrophorèse capillaire (article)

AN EXPERIMENTAL DESIGN BASED STRATEGY TO OPTIMIZE A CAPILLARY ELECTROPHORESIS METHOD FOR THE SEPARATION OF 19 POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS

Analytica Chimica Acta, submitted in September 2013

Ludivine Ferey^{1,2,3,4}, Nathalie Delaunay^{3,4,5,6*}, Douglas N. Rutledge², Alain Huertas⁷, Yann Raoul¹, Pierre Gareil^{3,5,6}, Jérôme Vial^{4,5,6}, Isabelle Rivals⁸

¹Sofiprotéol, 75008 Paris, France

²AgroParisTech, UMR INRA 1145 Ingénierie Procédés Aliments, 75005 Paris, France

³Chimie ParisTech, Laboratory of Physicochemistry of Electrolytes, Colloids and Analytical Sciences (PECSA), 75005 Paris, France

⁴ESPCI ParisTech, Laboratory of Physicochemistry of Electrolytes, Colloids and Analytical Sciences (PECSA), 75005 Paris, France

⁵CNRS, UMR 7195, Paris, France

⁶UPMC Université Paris 06, Paris, France

⁷Lesieur, 92600 Asnières sur Seine, France

⁸ESPCI ParisTech, Equipe de Statistique Appliquée, 75005 Paris, France

Key words: capillary zone electrophoresis, cyclodextrins, design of experiments, polycyclic aromatic hydrocarbons, edible oil.

Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are widespread contaminants in the environment and food products. Because of their high toxicity, two international regulatory institutions, the United States Environmental Protection Agency and the European Food Safety Authority, recommend monitoring specific PAHs in environmental and food samples. A fast, selective and sensitive method is therefore required for their quantitation in such complex samples. This article deals with the optimization, based on an experimental design strategy, of a cyclodextrin (CD)-modified capillary zone electrophoresis separation method with LIF detection, for the simultaneous separation of 19 PAHs listed as priority pollutants. First, using a central composite design, the normalized peak-start and peak-end times were modelled as functions of the three factors most affecting PAH electrophoretic behavior: the concentrations of the anionic sulfobutylether- β -CD (SBE- β -CD) and the neutral methyl- β -CD (Me- β -CD), and the percentage of MeOH in the background electrolyte. Then, to circumvent computational difficulties resulting from the changes in migration order likely to occur while varying experimental conditions, an original approach based on the systematic evaluation of the time intervals between all the possible pairs of peaks was used. Finally, the optimization of the separation was performed using a desirability function based on the smallest time interval between two consecutive peaks and on the overall analysis time. Under optimum conditions, full resolution of all 19 PAHs was obtained in less than 18 min using a borate buffer composed of 9.4 mM SBE- β -CD, 14.1 mM Me- β -CD, and 11.2 % (v/v) MeOH. Using this optimized capillary electrophoresis method, a vegetable oil was successfully analyzed, proving its suitability for real complex samples analysis.

1. Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a group of important environmental and food contaminants. Many of them have been identified as mutagens, teratogens and/or carcinogens and therefore constitute a health concern [1]. PAHs are often found in complex mixtures of very similar compounds at low concentrations, requiring fast, selective and sensitive analytical methods. GC-MS [2-6] or HPLC using fluorescence detection [7-13] are the two analytical techniques most reported in the literature for the determination of PAHs in food and environmental samples. Today, CE with its high separation efficiencies, low reagent and sample consumption and speed, is increasingly recognized as an interesting alternative to previous chromatographic methods [14,15]. Micellar electrokinetic chromatography (MEKC) methods with micelles formed from alkylsulfates, alkylammonium or bile salts, have been developed for the separation of these uncharged compounds [16-18]. However, because of their high hydrophobicity, PAHs tend to partition completely into the micelles and to migrate together at the same velocity as the micelles [19]. In an attempt to balance the differential partitioning of PAHs between the two pseudo-phases and therefore to enhance the resolution, modifiers are generally added to the background electrolyte (BGE), such as organic solvents or cyclodextrins (CDs). As the use of organic solvents is often unsuccessful, probably because of solvent disruption of the micelles [17,20,21], the addition of CDs appears to be the most successful strategy to improve method selectivity in MEKC. However, CD-modified MEKC still suffers from a lack of selectivity: PAHs with similar structures cannot be separated and long analysis times are generally observed [22-24].

Today, CD-modified capillary zone electrophoresis (CD-CZE) is one of the most successful strategies for PAH separation [25,26]. Recently, we developed a CD-CZE separation method using a buffer composed of a mixture of a neutral (methyl- β -CD, Me- β -CD) and an anionic CD (sulfobutyl ether- β -CD, SBE- β -CD) which resulted in a remarkable selectivity for the analysis of 19 PAHs [27]. Using this method, the separation was based on differential solute partitioning between the two CDs. Efficiencies for all components greater than 10^5 theoretical plates were achieved. However, under the best conditions, i.e. a borate buffer composed of 10 mM SBE- β -CD, 20 mM Me- β -CD, and 10 % (v/v) MeOH, as determined through a one-variable-at-a-time "optimization" procedure, the benzo(j)fluoranthene (BjFA) / pyrene (Pyr) pair remained unresolved.

Experimental designs have long been important in the development of separation methods including CE [28-33]. They allow a large number of factors to be studied simultaneously in a predefined number of experiments to determine which of them has a significant effect on responses. As opposed to a one-variable-at-a-time approach, the interactions between

factors can be determined and the conditions optimized with a reduced number of experiments. This is why a rapid screening method of the 8 PAHs belonging to the lists established by the United States Environmental Protection Agency (US-EPA) [34] and the European Food Safety Authority (EFSA) [35] was later optimized by our team using a classical experimental design approach [36]. Indeed, as the migration order of these 8 PAHs was the same whatever the experimental condition, their fast separation was classically optimized using a desirability analysis based on the differences of peak-end and peak-start times between the 7 pairs of consecutive peaks and the global analysis time only.

However, in this study dealing with the simultaneous separation of 19 PAHs, listed as priority pollutants in environmental and food samples by the US-EPA and the EFSA, plus an internal standard (IS), changes in selectivity were observed over the whole experimental domain, so that the desirability analysis could not be based on 19 migration time differences. A new optimization strategy based on the systematic evaluation of the time intervals between all possible pairs of peaks was therefore necessary to enhance the selectivity of the CD-CZE method. The method optimized by this approach was next successfully applied to the analysis of a real spiked oil extract, obtained from a fast, simple, and adapted solid phase extraction using molecularly imprinted polymers (MIP).

2. Materials and methods

2.1 Reagents, standard samples and electrolytes

Sodium tetraborate decahydrate ($\geq 99.5\%$), Me- β -CD with a degree of substitution (DS) of 12.6 (average molecular weight of 1310 g/mol), and urea for electrophoresis ($\geq 99.99\%$) were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). SBE- β -CD with an average DS of 6.2 (average molecular weight of 2115 g/mol) was obtained from Cydex Pharmaceuticals (Lawrence, KS, USA). HPLC-grade methanol (MeOH) and acetonitrile (ACN) were from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Ultra-pure water was delivered by a Direct-Q3 UV system (Millipore, Molsheim, France).

Benzo(a)anthracene ($> 99.5\%$, BaA), benzo(b)fluoranthene ($> 99.5\%$, BbFA), BbFA ($> 98.5\%$), benzo(a)pyrene ($> 99.6\%$, BaP), chrysene ($> 99.6\%$, CHR), dibenzo(a,e)pyrene ($> 99.0\%$, DBaeP), dibenzo(a,h)pyrene ($> 99.0\%$, DBahP), dibenzo(a,i)pyrene ($> 99.9\%$, DBaiP), dibenzo(a,l)pyrene ($> 99.4\%$, DBalP), indeno(1,2,3-cd)pyrene ($> 99.5\%$, IP), 5-methylchrysene ($> 99.5\%$, MCH) at 10 mg/L in ACN, cyclopenta(c-d)pyrene ($> 99.5\%$, CPcdP) at 100 mg/L in ACN, and benzo(c)fluorene ($> 98.2\%$, BcFLR) at 10 mg/L in

cyclohexane were supplied by CIL Cluzeau (Sainte-Foy-La-Grande, France). Acenaphthene (> 99.0 %, ACP), acenaphthylene (> 99.0 %, ACY), anthracene (> 98.0 %, ANT), benzo(k)fluoranthene (> 98.0 %, BkFA), benzo(ghi)perylene (> 98.0 %, BghiP), dibenzo(a,h)anthracene (> 97.0 %, DBahA), fluoranthene (> 98.0 %, FA), fluorene (> 98.0 %, FLR), naphthalene (> 99.0 %, NPH), phenanthrene (> 98.0 %, PHE), Pyr (> 98.0 %), and umbelliferone ($\geq$ 98.0 %) used as IS were purchased from Sigma-Aldrich. Stock solutions at 100 mg/L of these PAHs were prepared by dissolving in ACN.

Electrolytes were daily prepared by mixing appropriate volumes of sodium tetraborate decahydrate, urea, Me- β -CD, and SBE- β -CD stock solutions with MeOH as described previously [36], and filtered through a 0.20 μ m cellulose acetate membrane (VWR). Stock solution of umbelliferone was prepared at 1.6 g/L in ethanol and diluted to 16.0 mg/L in water.

PAHs studied were those belonging to both US-EPA and EFSA lists each gathering 16 PAHs. As 8 PAHs are in common between these two priority lists, 24 PAHs in all are currently under regulation. When using LIF detection with excitation wavelength at 325 nm, only 20 out of the 24 compounds could be detected. Indeed, NPH, ACY, CPcdP, and FLR did not give measurable fluorescence signal even at 10 mg/L. BcFLR was only available in cyclohexane and thus could not be added to the working standard mixture of the other PAHs without inducing the formation of a microemulsion. For these reasons, these five compounds were not studied here. Two stock mixture solutions were prepared in ACN by mixing appropriate volumes of PAH standard solutions and IS stock solution to achieve the following concentrations. Mixture 1: ACP: 20 mg/L, ANT: 3.5 mg/L, BkFA: 0.3 mg/L, BghiP: 0.5 mg/L, CHR: 2 mg/L, DBahP: 1 mg/L, DBaiP: 2 mg/L, FA: 1 mg/L, IP: 3.5 mg/L, Pyr: 1 mg/L, and IS: 1.6 mg/L.

Mixture 2: BaA: 1 mg/L, BbFA: 0.5 mg/L, BjFA: 1.5 mg/L, BaP: 2 mg/L, DBahA: 1 mg/L, DBaeP: 2 mg/L, DBaIP: 0.16 mg/L, MCH: 0.5 mg/L, PHE: 10 mg/L, and IS: 1.6 mg/L. Two working PAH solutions were prepared daily by diluting previous stock mixture solutions by a factor of 10 in each BGE tested. The PAH concentrations were chosen so that PAH identification, based on their normalized corrected areas (A_i/t_{Mi}) / (A_{IS}/t_{MIS}), was possible whatever the BGE tested.

2.2 Apparatus

Method optimization was carried out with an Agilent Technologies HP 3D system (Massy, France) coupled to a laser-induced fluorescence (LIF) detection. A 325 nm HeCd laser

(Model 3056-M-A02, Melles Griot, Voisins-Le-Bretonneux, France) was used as excitation radiation and fluorescence emission was recorded with a Zetalif Evolution detector (Picometrics, Toulouse, France) [27]. ChemStation was used for instrument control and electrophoretic data acquisition. The bare silica capillaries 50 μm id x 49 cm (33.5 cm to the detection window) were from Polymicro Technologies and purchased from Photonlines (Marly-Le-Roi, France).

2.3 Electrophoretic conditions

New CE capillaries were activated prior to use with successive flushes of 1 M NaOH, 0.1 M NaOH, ultra-pure water, and BGE each under 935 mbar for 15 min (about 30 capillary volumes). Every day, the capillary was conditioned before the first analysis with water, followed by the working BGE, each under 935 mbar for 10 min (about 20 capillary volumes). Prior to each sequence, an experiment at the center point conditions of the experimental design was performed to control the electroosmotic flow (EOF). Between runs, the capillary was flushed with water, ACN, MeOH, water and BGE each under 935 mbar for 3 min for water (about 5 capillary volumes) and 10 min for organic solvents and BGE (about 50 capillary volumes for ACN, 30 capillary volumes for MeOH, and 20 capillary volumes for BGE). At the end of the day, the capillary was washed successively with water, ACN, MeOH, and water each under 935 mbar for 5 min for water (about 10 capillary volumes) and 15 min for organic solvents (about 80 capillary volumes for ACN, and 50 capillary volumes for MeOH). As electrolysis could alter the running buffer and consequently could change the EOF, the electrolyte was changed between each analysis. Samples were injected hydrodynamically at a pressure of 20 mbar for 5 s (about 0.3 % of the capillary volume). The capillary temperature was kept constant at 25°C by air-cooling and a voltage of +14 kV was applied. The capillary was changed mid-way through the experimental design before the 11th analysis.

2.4 Experimental design

Experimental design and optimization were performed using Matlab (Version: 8.0.0.783 (R2012b), The Mathworks) and Excel 2007 (Microsoft Corporation, Courtaboeuf, France).

2.5 Real samples preparation

Isio 4[®] oils, which are a mixture of rapeseed, sunflower, grape seed, and high content oleic acid sunflower oils, were supplied by Lesieur (Coudekerque, France). Purification of oil samples was performed by solid phase extraction using Affinilute[®] MIP PAH cartridges, packed with 25 mg of MIP (Biotage, Uppsala, Sweden). The commercial extraction procedure was followed. An amount of 10 g of Isio 4[®] oil was diluted in 10 mL of cyclohexane. The Affinilute[®] MIP PAH cartridge was conditioned with 1 mL of cyclohexane and 2 mL of oil sample was loaded onto the cartridge. After a drying step by means of vacuum, the cartridge was washed with 2 x 1 mL of cyclohexane to remove fat content (e.g. lipids, triglycerides, fatty acids) and once again dried. Finally, 3 mL of ethyl acetate were used for the elution step. The eluate was evaporated to dryness under a nitrogen stream and reconstituted in ACN-MeOH-BGE (1/3/6, v/v) before CE analysis. Oil extracts were first spiked with IS at 100 µg/L and next with the 19 PAHs of interest at 100 µg/L except for DBaHP: 195 µg/L; ANT: 300 µg/L; ACP: 2 mg/L; PHE: 3 mg/L; CHR: 170 µg/L; MCH: 50 µg/L; BjFA: 150 µg/L; IP: 300 µg/L; DBaIP: 50 µg/L.

3. Results and Discussion

3.1 Choice of the factors, variation domains and responses

The selection of the factors to be fixed and of those to be varied is a crucial step for the success of a design of experiments. The three factors potentially most affecting the separation of PAHs were identified: the concentrations of the anionic (SBE-β-CD) and the neutral (Me-β-CD) CD, and the percentage of organic modifier (MeOH) added to the BGE. Indeed, using such a dual CD system, the separation mechanism of PAHs is based on the difference of complex formation constants between the PAHs and the two CDs. The selectivity of the method was therefore expected to depend highly on the concentrations of both CDs. Moreover, they also alter the BGE viscosity, while the anionic CD additionally impacts the BGE ionic strength. As PAHs are highly hydrophobic compounds, CD concentrations also influence their solubility not only in BGEs but also in samples, since PAH stock mixture solutions were diluted in BGE before analysis. The selectivity of this CD-CZE separation method could also be improved by varying the amount of organic solvent added to the aqueous electrolyte. Indeed, in CD-CZE, organic solvents may affect interactions between CDs and analytes by modifying the polarity of the BGE. Moreover, by increasing the viscosity of the BGE, it may also slow down both EOF and electrophoretic mobility of the

SBE- β -CD. Finally, organic solvents content in the BGE was expected to impact PAH solubility. As CDs show higher solubilities in MeOH than in ACN, MeOH was preferred and its percentage was also identified as an influential separation parameter.

From preliminary experiments, the lowest and highest values of each variable were chosen to define the broadest interval in which they could be varied considering experimental limitations. Sufficient PAH solubility in the sample and the BGE, and reasonable analysis times (< 45 min) were targeted whatever the conditions of the experimental design tested. The concentrations of the SBE- β -CD and the Me- β -CD, and the percentage of MeOH were therefore varied between 5-15 mM, 5-40 mM, and 10-25 % (v/v), respectively. More details about the choice of factor ranges can be found in our previous paper [36].

Other experimental parameters, which were not investigated using the experimental design, were maintained constant. Borate and urea concentrations were kept at 10 mM and 600 mM, respectively. Electrophoretic separations were run at 25°C under +14 kV (no Joule effect for all the BGEs tested).

In order to determine which factors had the greatest influence on PAH electrophoretic behavior, the PAH migration times normalized by EOF time were modelled. In order to achieve baseline separation between the 19 PAHs in a minimum analysis time, the normalized peak-start and peak-end times of the 19 PAHs and the overall analysis time (non normalized peak-end time of the last peak) were modelled. As DBaEP was always the last migrating compound for all BGEs, its migration time was therefore taken as the overall analysis time. As detailed previously, the EOF time was determined from the first negative peak appearing on each electropherogram [27,36], due to composition mismatch between sample and BGE.

3.2 Central composite design: optimization design

The optimization of the separation conditions using a statistical approach involves different steps: the choice of the experimental design, the realization of the corresponding experiments, the estimation of the coefficients of the mathematical model for each response, the use of a desirability approach to predict the optimum, and finally the experimental validation of the predicted optimum [33]. For the purpose of this study, a central composite design was chosen as a second-degree design enabling the modelling of possible nonlinear effects of the factors. As described previously, this experimental design allows to evaluate 15 experimental conditions [36]. It is composed of a two-level full factorial design 2^k (k = number of factors) with extreme vertex points (coded ± 1), a star design with $2k$ axis points (coded $\pm$

a), and a center point (coded 0). In our study, the center point was replicated 6 times to estimate the experimental error. Three orthogonal blocks were chosen to avoid the coefficients of the model to be biased for example when changing capillary. The distance between the center and the star design points was therefore set at ± 1.6 . The levels chosen for the three factors in coded and real values are presented in Table II-II-9, and the experimental conditions and order in Table II-II-10. Experiments were performed in a random sequence within each block in order to minimize the influence of time-related uncontrolled factors on the responses. Moreover, all runs were independent since, for each of them, electrolytes and standards were freshly prepared just before use.

Table II-II-9. Factors and factor levels for the optimization study.

Factors	Coded values				
	-1.6	-1	0	+1	+1.6
[SBE- β -CD] (mM)	5.2	7	10	13	14.8
[Me- β -CD] (mM)	5.7	12	22.5	33	39.3
MeOH (% v/v)	10.3	13	17.5	22	24.7

Table II-II-10. Central composite design.

Blocks	Experimental order	Factor 1: [SBE- β -CD]	Factor 2: [Me- β -CD]	Factor 3: MeOH % (v/v)
I	1	0	0	0
	2	0	0	0
	3	-1	-1	1
	4	1	1	-1
	5	1	-1	-1
	6	-1	-1	-1
II	7	-1	1	1
	8	1	1	1
	9	1	-1	1
	10	-1	1	-1
	11	0	0	0
	12	0	0	0
III	13	0	1.6	0
	14	-1.6	0	0
	15	1.6	0	0
	16	0	0	-1.6
	17	0	0	1.6
	18	0	-1.6	0
	19	0	0	0
	20	0	0	0

The relationship between the factors $\{X_i\}$ and a response y is modelled by a full second-degree polynomial:

$$y(\beta) = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=2}^3 \sum_{j=1}^{i-1} \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (\text{eq.3})$$

where $y(\beta)$ is the experimental response, X_1, X_2, X_3 , the factors to be optimized ([SBE- β -CD], [Me- β -CD], and MeOH %), $\beta_0, \beta_i, \beta_{ii}, \beta_{ij}$, the constant, linear, quadratic, and first-order interaction coefficients respectively, and ε the experimental error. First, the model coefficients β were estimated using ordinary least squares. A factor or an interaction was considered significant with a type I error risk $\alpha = 5\%$ if the t ratio (coefficient normalized by its standard deviation) was outside the ± 2.2 range (Student variable with $(20 - 10) = 10$ degrees of freedom). In Figure II-II-8, the t ratios for linear, quadratic, and first order interaction terms are schematically presented for BaP normalized migration time (Figure II-II-8A) and analysis time, i.e. DBaEP peak-end time (Figure II-II-8B) whereas, in Table II-II-11, significant factors for the normalized migration times of the 19 PAHs are summarized with the corresponding coefficient estimates.

From a mathematical point of view, the correlations between terms made difficult a direct interpretation of the contribution of each factor individually. In the present case, significant coefficients could be related to physico chemical interpretations in good agreement with theory. As observed previously for the most studied 8 PAHs [36], the main effects on PAH electrophoretic behavior were caused by [SBE- β -CD] and [Me- β -CD]. [Me- β -CD]² was the only quadratic term that was found significant for 16 out of the 19 PAH normalized migration times, validating the choice of a second-order polynomial for these responses. [Me- β -CD] had a significant negative effect whereas [SBE- β -CD] had a significant positive effect on normalized migration times. For every compound, normalized migration times were longer with increasing SBE- β -CD concentration, as a result of stronger interactions between the PAHs and the anionic CD migrating counter to the EOF. However, when [Me- β -CD] increased, PAH normalized migration times decreased. In this case, PAHs spent less time in anionic CD cavities since their complexation with the neutral CD was favored. On the other hand, MeOH % had not such a clear effect since it was a significant factor for only 3 out of the 19 PAH normalized migration times (ACP, DBaEP, DBaEP).

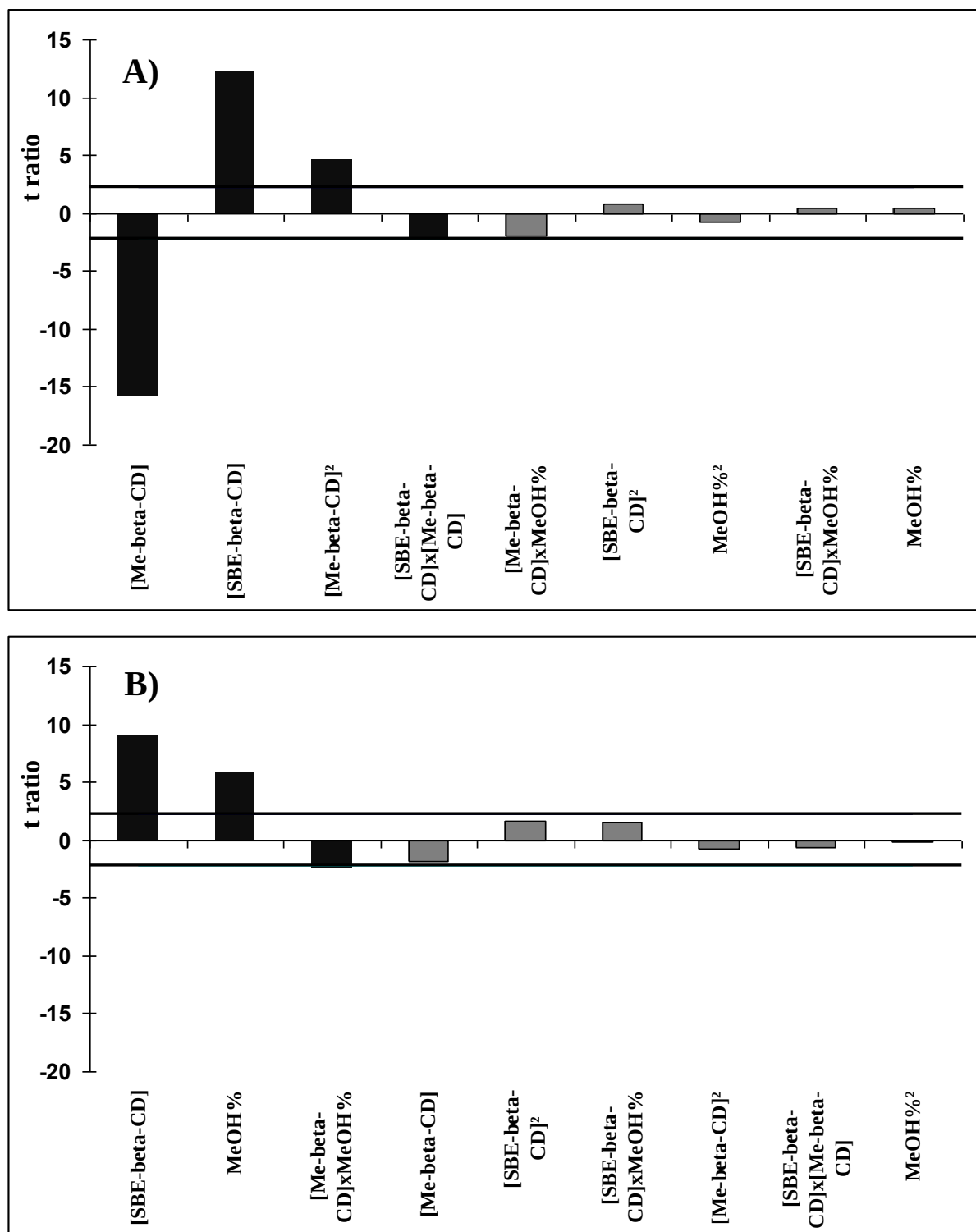


Figure II-II-8. Representation of the effects of SBE-β-CD and Me-β-CD concentrations and percentage of MeOH on A) BaP normalized migration time and B) analysis time (DBaEP peak-end time).

Table II-II-11. Significant factors with their coefficients for PAH migration times normalized by the EOF time.

PAHs	Normalized migration times	
	Significant factors	Regression coefficients
DBahP	[Me- β -CD]	-0.304
	[Me- β -CD] ²	0.201
	[SBE- β -CD]	0.105
ANT	[Me- β -CD]	-0.185
	[SBE- β -CD]	0.143
	[Me- β -CD] ²	0.090
DBahA	[Me- β -CD]	-0.347
	[Me- β -CD] ²	0.184
	[SBE- β -CD]	0.167
	[SBE- β -CD] x [Me- β -CD]	-0.085
ACP	[SBE- β -CD]	0.153
	[Me- β -CD]	-0.152
	[Me- β -CD] ²	0.057
	%MeOH	-0.031
PHE	[Me- β -CD]	-0.248
	[SBE- β -CD]	0.214
	[Me- β -CD] ²	0.109
CHR	[Me- β -CD]	-0.318
	[SBE- β -CD]	0.228
	[Me- β -CD] ²	0.138
BaA	[Me- β -CD]	-0.317
	[SBE- β -CD]	0.235
	[Me- β -CD] ²	0.137
MCH	[Me- β -CD]	-0.441
	[SBE- β -CD]	0.296
	[Me- β -CD] ²	0.174
	[SBE- β -CD] x [Me- β -CD]	-0.093
BkFA	[Me- β -CD]	-0.409
	[SBE- β -CD]	0.300
	[Me- β -CD] ²	0.165
DBaiP	[Me- β -CD]	-0.631
	[SBE- β -CD]	0.312
	[Me- β -CD] ²	0.262
	[SBE- β -CD] x [Me- β -CD]	-0.120
FA	[Me- β -CD]	-0.387
	[SBE- β -CD]	0.371
	[Me- β -CD] ²	0.133

PAHs	Normalized migration times	
	Significant factors	Regression coefficients
BaP	[Me- β -CD]	-0.553
	[SBE- β -CD]	0.429
	[Me- β -CD] ²	0.167
	[SBE- β -CD] x [Me- β -CD]	-0.103
Pyr	[SBE- β -CD]	0.436
	[Me- β -CD]	-0.397
	[Me- β -CD] ²	0.105
BjFA	[Me- β -CD]	-0.578
	[SBE- β -CD]	0.487
	[Me- β -CD] ²	0.144
	[Me- β -CD] x %MeOH	-0.117
BbFA	[Me- β -CD]	-0.540
	[SBE- β -CD]	0.513
	[Me- β -CD] ²	0.136
	[Me- β -CD] x %MeOH	-0.130
IP	[Me- β -CD]	-0.599
	[SBE- β -CD]	0.514
	[Me- β -CD] ²	0.136
DBaIP	[Me- β -CD]	-0.670
	[SBE- β -CD]	0.652
	[Me- β -CD] x %MeOH	-0.221
	%MeOH	0.137
BgHiP	[SBE- β -CD]	0.712
	[Me- β -CD]	-0.496
DBaeP	[SBE- β -CD]	0.891
	[Me- β -CD]	-0.429
	[Me- β -CD] x %MeOH	-0.325
	%MeOH	0.279

With regard to the interactions, [SBE- β -CD] x [Me- β -CD] and [Me- β -CD] x MeOH % had a significant effect on only 4 PAHs, whereas [SBE- β -CD] x MeOH % was never significant.

Considering analysis time, [Me- β -CD] has a significant negative effect whereas [SBE- β -CD] and MeOH % appeared to have a significantly positive effect. In fact, an increase in MeOH percentage led to higher DBaeP peak-end time due to a lower EOF mobility. Finally, the interaction [Me- β -CD] x MeOH % was the last significant term for this response.

3.3 Optimization of PAH separation

In our previous study targeting a method for the fast screening of only 8 PAHs (compounds belonging to both US-EPA and EFSA lists) [36], since their migration order did not change whatever the experimental conditions, their separation could easily be optimized using a desirability function based on the differences of peak-end and peak-start times between the 7 pairs of consecutive peaks only [36]. Here, when dealing with the separation of 19 PAHs plus the IS, the migration order does not remain constant over the whole experimental domain, and the desirability function cannot be based on 19 migration time differences corresponding to 20 compounds always in the same order anymore.

Thus, we turned to a strategy based on the systematic evaluation of the time intervals between all possible pairs of peaks. The 3D experimental domain was divided in elementary cubes ($17 \times 17 \times 17 = 4913$ cubes) and, for each of them, the intervals between all possible pairs of peaks were estimated using the models of normalized peak-start and peak-end times:

$$\Delta t_{ij}(k) = \max(t_i^{\text{start}}(k) - t_j^{\text{end}}(k), t_j^{\text{start}}(k) - t_i^{\text{end}}(k)) \quad (\text{eq.4})$$

where i and j index the peaks ($i, j = 1$ to 20 , $i < j$, i.e. 190 different pairs) and k indexes the elementary cubes ($k = 1$ to 4913). The analysis time $T(k)$ was also predicted for each cube as the peak-end time of DBaEP, which was always the last migrating compound. The desirability variable $D(k)$ [37] was defined in each cube as a function of the smallest time interval and of the analysis time:

$$D(k) = d(\min_{ij}(\Delta t_{ij}(k)), 0, 0.16) \times d(T(k), 25, 15) \quad (\text{eq.5})$$

where $d(t, x_0, x_1)$ is Derringer type function [38], i.e. a continuous piecewise linear function with values in $[0 ; 1]$:

$$d(t, x_0, x_1) = \frac{t - x_0}{x_1 - x_0} \quad \text{if } t \in [\min(x_0, x_1); \max(x_0, x_1)] \quad (\text{eq.6})$$

and whose value is equal to 0 or to 1 outside this interval in a continuous fashion. The value of 0.16 chosen for the intervals between peaks corresponds to the mean residual standard error of the peak-start and peak-end times, and a desired analysis time between 15 and 25 min appeared as a reasonable goal.

The values of $D(k)$ in the experimental domain are shown in Figure II-II-9. The predicted optimal separation conditions were those corresponding to $\text{argmax}_k(D(k))$, i.e. -0.2 for [SBE- β -CD] (9.4 mM), -1 for [Me- β -CD] (12.0 mM), and -1.4 for MeOH % (11.2 %, v/v).

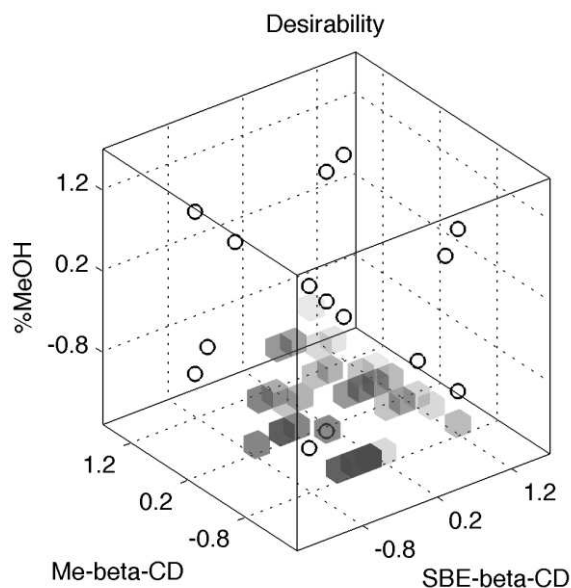


Figure II-II-9. Representation of the desirability function in the experimental domain, white cubes corresponding to a value of zero, and darker ones to larger values (the circles indicate the points of the central composite design). The darkest cube (SBE- β -CD = -0.2 , Me- β -CD = -1 , MeOH = -1.4) corresponds to the largest value of the desirability, and hence to the predicted optimum for the separability conditions.

3.4 Experimental validation

The predicted optimized conditions were then experimentally checked to validate the proposed approach. Using a 10 mM sodium borate buffer containing 600 mM urea, 9.4 mM SBE- β -CD, 12.0 mM Me- β -CD, and 11.2 % (v/v) MeOH, an electrophoretic separation of the 19 PAHs in the presence of the IS (umbelliferone) was performed (Figure II-II-10A). The obtained electropherogram shows that all peaks were baseline resolved, except for BaP and Pyr, which still remained not fully baseline resolved ($R_s = 1.2$). However, the exploration of the neighboring cubes of the predicted optimum (± 0.2 for each factor, i.e. a variation of the order of the residual error) enabled to reach a baseline resolution for this critical pair by increasing [Me- β -CD] from 12.0 mM to 14.1 mM (from -1 to -0.8 in coded values). Under these new conditions, the 19 PAHs were baseline resolved ($R_s > 1.8$) with a reversal in migration order between DBahA and ACP as shown on Figure II-II-10B. The electrophoretic separation fulfilling the requirements (all PAH pairs were baseline resolved in about 20 min), the proposed optimization strategy was therefore validated.

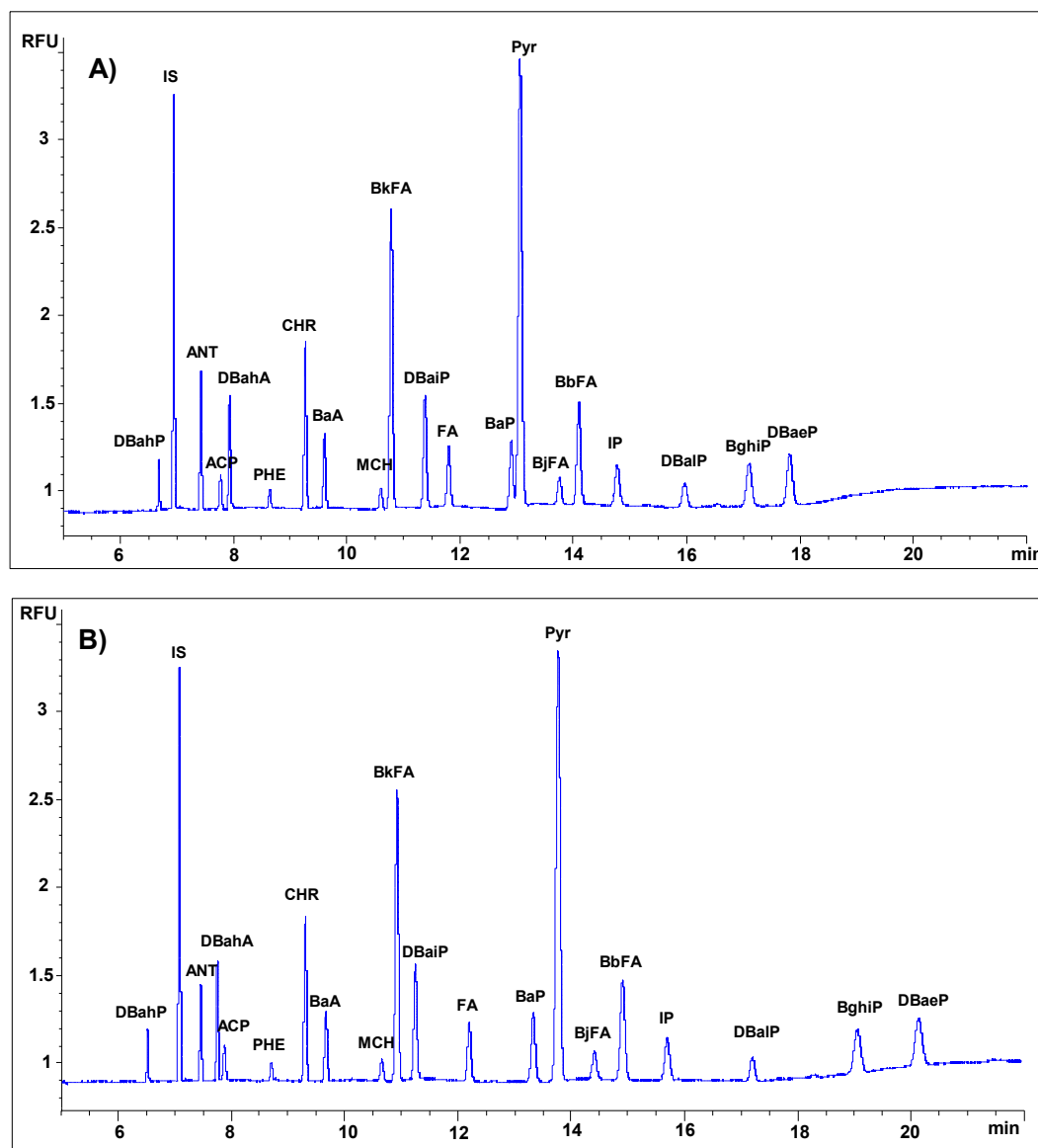


Figure II-II-10. Electropherograms of a standard mixture of the 19 PAHs of interest in the presence of IS. Bare fused-silica capillary, 50 μm I.D. x 49 cm (LIF detection at 33.5 cm). BGE: 10 mM sodium borate buffer (pH 9.2) and 600 mM urea with (A) 9.4 mM SBE- β -CD and 12.0 mM Me- β -CD in 88.8 : 11.2 (v/v) water-MeOH mixture and (B) 9.4 mM SBE- β -CD and 14.1 mM Me- β -CD in 88.8 : 11.2 (v/v) water-MeOH mixture. Applied voltage, +14 kV; Temperature, 25°C; hydrodynamic injection, 20 mbar, 5 s. LIF detection, $\lambda_{\text{exc}} = 325 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} > 350 \text{ nm}$. Sample: PAHs in 1:9 (v/v) ACN-BGE mixture. PAH concentrations: 100 $\mu\text{g/L}$ except for DBahP (60 $\mu\text{g/L}$); ANT (350 $\mu\text{g/L}$); ACP (2 mg/L); PHE (1 mg/L); CHR (200 $\mu\text{g/L}$); MCH (30 $\mu\text{g/L}$); BjFA (150 $\mu\text{g/L}$); IP (350 $\mu\text{g/L}$); DBalP (32 $\mu\text{g/L}$); IS: umbelliferone (160 $\mu\text{g/L}$).

Up to now, all conditions of the experimental design were tested under a constant voltage of +14 kV preventing Joule effect whatever the BGE tested. Under the optimized conditions, Joule effect test was therefore carried out (measurement of current intensity as a function of applied voltage) and an increase in separation voltage up to +16 kV was allowed, which induced a decrease in analysis time from 20 min to less than 18 min. The obtained electropherogram for a standard mixture of the 19 PAHs in the presence of IS is presented in

Figure II-II-11A. At the optimized separation voltage, the 19 PAHs remained baseline separated ($R_s > 2.0$) in less than 18 min with efficiencies greater than 1.0×10^5 .

3.5 Application to a real sample

As real sample matrix can be the cause of serious problems mainly due to the presence of interfering compounds, an Isio 4[®] oil composed of rapeseed, sunflower, grape seed, and high content oleic acid sunflower oils was analyzed to evaluate the suitability of the previous optimized CE separation method to natural samples. The oil was first extracted with a commercially available MIP dedicated to PAH analysis. The obtained extract was next evaporated to dryness and reconstituted in ACN-MeOH-BGE (1/3/6, v/v) before CE analysis. An addition of 30 % MeOH to the extract was necessary to avoid the formation of a microemulsion mainly due to residual triglycerides. The oil extract was first spiked only with IS at 100 µg/L and next with the 19 PAHs, listed by US-EPA and EFSA as priority pollutants in environmental and food samples at 100 µg/L (except for DBaHP, 195 µg/L; ANT, 300 µg/L; ACP, 2 mg/L; PHE, 3 mg/L; CHR, 170 µg/L; MCH, 50 µg/L; BbFA, 150 µg/L; IP, 300 µg/L; DBaIP, 50 µg/L). When oil extract was spiked with IS alone (Figure II-II-11B (1)), the electropherogram was quite clean with a flat baseline. Moreover, when oil extract was spiked with IS plus 19 PAHs, the separation was preserved (Figure II-II-11B (2)) with resolutions superior to 1.8. As Isio 4[®] oil is a mixture of several oils, the developed CE method was proved to be reliable for the analysis of different kinds of edible oils.

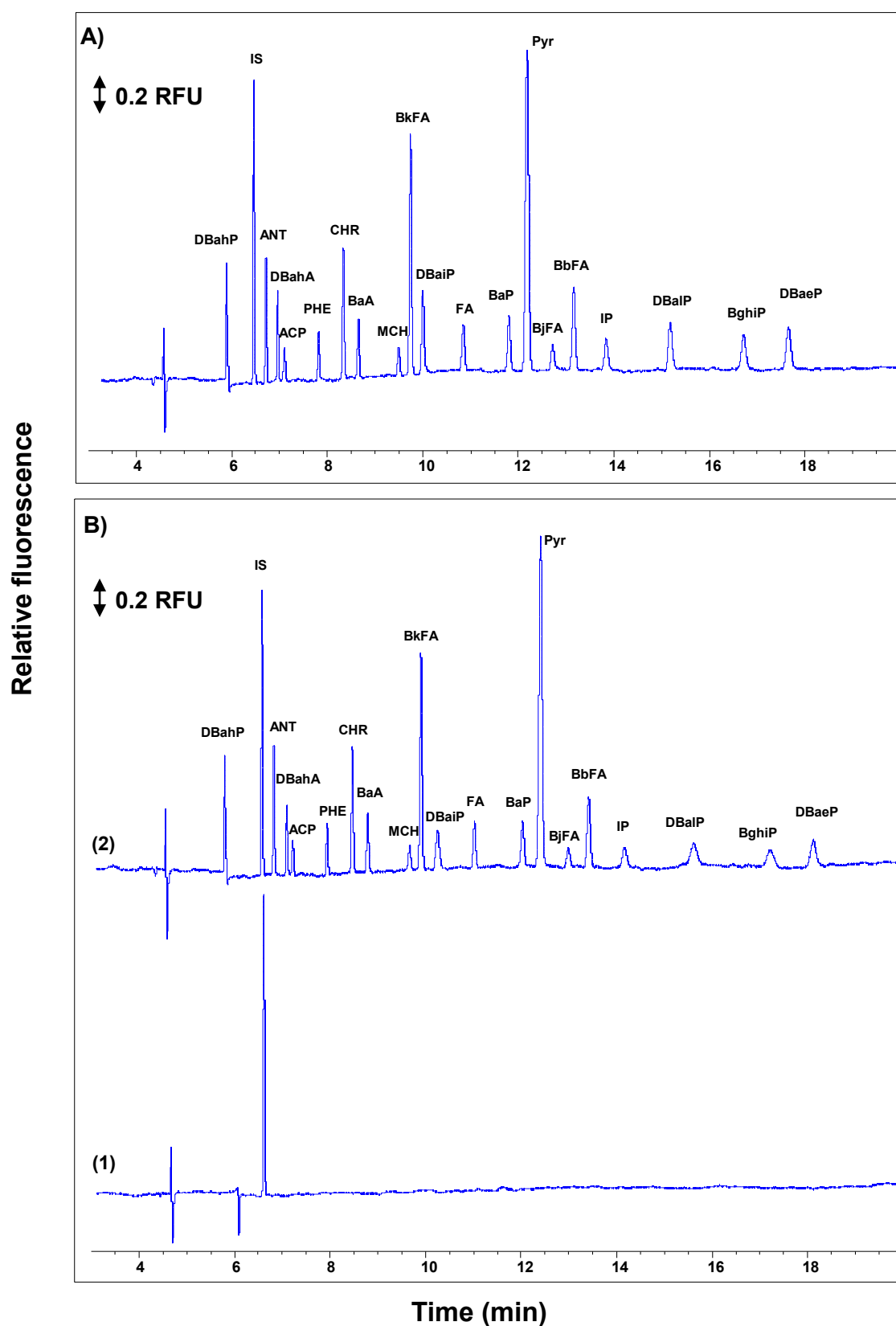


Figure II-II-11. CE analysis of (A) standard mixture and (B) Isio 4[®] oil extract (1) spiked with IS at 100 µg/L or (2) spiked with IS at 100 µg/L plus 19 PAHs. Applied voltage, +16 kV. Sample: PAHs in 1:3:6 (v/v) ACN-MeOH-BGE mixture. PAH concentrations: 100 µg/L except for DBaHP (195 µg/L); ANT (300 µg/L); ACP (2 mg/L); PHE (3 mg/L); CHR (170 µg/L); MCH (50 µg/L); BjFA (150 µg/L); IP (300 µg/L); DBaIP (50 µg/L); IS: umbelliferone (100 µg/L). Other conditions: see Figure II-II-10.

4. Conclusions

For the first time, an optimization strategy based on an experimental design approach enabled to develop a simple, selective, and fast CE method for the simultaneous separation of 19 PAHs of environmental and food concern. First, using a second-degree polynomial model, relevant responses such as normalized migration times, normalized peak-start and peak-end times, and overall analysis time were modelled as a function of the factors influencing PAH electrophoretic behavior (the concentrations of the anionic and the neutral CD, and MeOH percent). Then, using the model predictions, a systematic evaluation of time intervals between all possible pairs of peaks was carried out in the whole experimental domain and a desirability analysis defined on the smallest time interval between two adjacent peaks and the analysis time allowed to baseline resolve the 19 PAHs of interest in less than 18 min. Finally, the optimized CE method was successfully applied to a spiked edible oil extract, proving the applicability of the present method to real samples. In the near future, this analytical method will be quantitatively validated for the analysis of PAHs in a variety of oil samples.

References

- [1] M. Rojas, B. Marie, J.M. Vignaud, N. Martinet, J.L. Siat, G. Grosdidier, I. Cascorbi, K. Alexandrov, *Cancer Lett* 207 (2004) 157.
- [2] M.D. Guillen, P. Sopelana, G. Palencia, *J. Agric. Food. Chem.* 52 (2004) 2123.
- [3] G. Purcaro, P. Morrison, S. Moret, L.S. Conte, P.J. Marriott, *J. Chromatogr. A* 1161 (2007) 284.
- [4] J. Ma, R. Xiao, J. Li, J. Yu, Y. Zhang, L. Chen, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 5462.
- [5] I. Iavicoli, M. Chiarotti, A. Bergamaschi, R. Marsili, G. Carelli, *J. Chromatogr. A* 1150 (2007) 226.
- [6] N. Barco-Bonilla, R. Romero-González, P. Plaza-Bolaños, J.L. Fernández-Moreno, A. Garrido Frenich, J.L. Martínez Vidal, *Anal. Chim. Acta* 693 (2011) 62.
- [7] F. van Stijn, M.A.T. Kerkhoff, B.G.M. Vandeginste, *J. Chromatogr. A* 750 (1996) 263.
- [8] V.G. Zuin, L. Montero, C. Bauer, P. Popp, *J. Chromatogr. A* 1091 (2005) 2.
- [9] I. Windal, L. Boxus, V. Hanot, *J. Chromatogr. A* 1212 (2008) 16.
- [10] A. Ishizaki, K. Saito, N. Hanioka, S. Narimatsu, H. Kataoka, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 5555.
- [11] S. Danyi, F. Brose, C. Brasseur, Y.-J. Schneider, Y. Larondelle, L. Pussemier, J. Robbens, S. De Saeger, G. Maghuin-Rogister, M.-L. Scippo, *Anal. Chim. Acta* 633 (2009) 293.
- [12] M. Shamsipur, J. Hassan, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 4877.
- [13] A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 1203 (2008) 168.
- [14] M. Geiger, A.L. Hogerton, M.T. Bowser, *Anal. Chem.* 84 (2012) 577.
- [15] N.W. Frost, M. Jing, M.T. Bowser, *Anal. Chem.* 82 (2010) 4682.
- [16] P.G. Muijselaar, H.B. Verhelst, H.A. Claessens, C.A. Cramers, *J. Chromatogr. A* 764 (1997) 323.
- [17] O. Brüggemann, R. Freitag, *J. Chromatogr. A* 717 (1995) 309.
- [18] R.O. Cole, M.J. Sepaniak, W.L. Hinze, J. Gorse, K. Oldiges, *J. Chromatogr. A* 557 (1991) 113.
- [19] C.L. Copper, M.J. Sepaniak, *Anal. Chem.* 66 (1994) 147.
- [20] X. Fu, J. Lu, Y. Chen, *Talanta* 46 (1998) 751.
- [21] Y. Walbroehl, J.W. Jorgenson, *Anal. Chem.* 58 (1986) 479.
- [22] B. Jiménez, D.G. Patterson, J. Grainger, Z. Liu, M.J. González, M.L. Marina, *J. Chromatogr. A* 792 (1997) 411.
- [23] S. Terabe, Y. Miyashita, Y. Ishihama, O. Shibata, *J. Chromatogr. A* 636 (1993) 47.
- [24] C.J. Smith, J. Grainger, D.G. Patterson, *J. Chromatogr. A* 803 (1998) 241.
- [25] J.H.T. Luong, A.L. Nguyen, *J. Chromatogr. A* 792 (1997) 431.
- [26] R.S. Brown, J.H.T. Luong, O.H.J. Szolar, A. Halasz, J. Hawari, *Anal. Chem.* 68 (1996) 287.
- [27] L. Ferey, N. Delaunay, D.N. Rutledge, C.B.Y. Cordella, H. This, A. Huertas, Y. Raoul, P. Gareil, *Talanta*, submitted.
- [28] E.C. Gil, P. Dehouck, A. Van Schepdael, E. Roets, J. Hoogmartens, *Electrophoresis* 22 (2001) 497.
- [29] E. Kaale, A. Van Schepdael, E. Roets, J. Hoogmartens, *J. Chromatogr. A* 924 (2001) 451.
- [30] C. Sarazin, N. Delaunay, C. Costanza, V. Eudes, P. Gareil, J. Vial, *J. Sep. Sci.* 35 (2012) 1351.
- [31] L. González, U. Akesolo, R.M. Jiménez, R.M. Alonso, *Electrophoresis* 23 (2002) 223.
- [32] G. Hanrahan, R. Montes, F. Gomez, *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 169.
- [33] G. Hanrahan, F.A. Gomez, *Chemometric Methods in Capillary Electrophoresis*, John Wiley & Sons, Inc. (2009).
- [34] United States Environmental Protection Agency (US-EPA), Appendix A to 40 CFR Part 423 (2010).
- [35] Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food. *The EFSA Journal* 724 (2008) 1-114.
- [36] L. Ferey, N. Delaunay, D.N. Rutledge, A. Huertas, Y. Raoul, P. Gareil, J. Vial, *J. Chromatogr. A*, 1302 (2013) 181.
- [37] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. De Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, in *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*, Elsevier, Amsterdam (1997).
- [38] G. Derringer, R. Suich, *J. Qual. Technol.* 12 (1980) 214.

CONCLUSION

Ces études ont permis le développement de méthodes d'analyse d'HAP listés comme polluants prioritaires dans les échantillons environnementaux et agroalimentaires par l'agence de protection de l'environnement des Etats-Unis (US-EPA) et l'agence européenne de sécurité sanitaire des aliments (EFSA) par électrophorèse capillaire couplée à une détection de fluorescence induite par laser. L'utilisation d'un système dual incluant une cyclodextrine (CD) anionique (sulfobutyl éther- β -CD, SBE- β -CD) et une CD neutre (méthyl- β -CD, Me- β -CD) a permis de séparer les HAP en fonction de leurs différences de constantes de complexation entre les deux CDs et ainsi d'atteindre de grandes sélectivités. Afin d'améliorer la répétabilité de l'analyse, la composition de l'électrolyte et de l'échantillon, la séquence de rinçage du capillaire et le matériau du flacon de l'échantillon ont été étudiés et un étalon interne (l'ombelliférone) a été ajouté aux mélanges standard d'HAP. En effet, une amélioration de la solubilité des HAP dans l'électrolyte et dans l'échantillon a été nécessaire pour réduire leur adsorption sur les parois du capillaire et du flacon. Les meilleurs résultats en termes de coefficients de variation (CV) sur les aires corrigées normalisées des HAP ont été obtenus en ajoutant 10 % (v/v) de MeOH et 600 mM d'urée dans l'électrolyte, 30 % (v/v) de MeOH dans l'échantillon et en remplaçant les flacons en polypropylène par des flacons en verre. De plus, entre chaque analyse, une séquence de rinçage performante a consisté à faire passer successivement de grands volumes d'eau, de MeOH, d'eau et d'électrolyte. Ces différentes mesures ont permis d'atteindre des CV compris entre 0,8 et 1,7 % pour les temps de migration et entre 1,2 et 4,9 % pour les aires corrigées normalisées pour six analyses consécutives.

Puis, la séparation d'un mélange de dix-neuf HAP a été étudiée en faisant varier le rapport des concentrations en CDs dans l'électrolyte. En présence d'un électrolyte constitué d'un tampon borate à 10 mM (pH 9,2), de SBE- β -CD à 10 mM, de Me- β -CD à 20 mM, d'urée à 600 mM et de 10 % (v/v) de MeOH, dix-huit HAP ont été séparés avec des résolutions supérieures à 1,5 en moins de 15 min. Dans ces conditions, un HAP supplémentaire, le benzo(c)fluorène (BcFLR), a été analysé séparément en raison de problèmes de miscibilité de solvants. En se basant sur son temps de migration normalisé, il a été déduit qu'il serait très probablement séparé des dix-neuf autres HAP. En revanche, la paire benzo(j)fluoranthène/pyrène n'était, quant à elle, pas séparée dans ces conditions. Par conséquent, afin d'optimiser davantage les résolutions, une étude approfondie des conditions de séparation a ensuite été menée à l'aide d'outils multivariés.

Ainsi, en suivant des stratégies d'optimisation basées sur les plans d'expériences, les résolutions de deux mélanges d'HAP ont pu être maximisées : (i) les huit HAP communs aux

listes US-EPA et EFSA et (ii) dix-neuf HAP également listés par ces deux organismes et pouvant être détectés à la longueur d'onde de 325 nm, imposée par le laser He-Cd. Tout d'abord, les facteurs les plus influents sur le comportement électrophorétique des HAP et donc sur la séparation ont été identifiés : les concentrations en CD neutre et anionique, et le pourcentage en MeOH dans l'électrolyte. Un plan composite centré a ensuite permis de modéliser les effets de chacun des facteurs sur les temps de migration normalisés. Trois termes sont apparus significatifs : les termes linéaires des concentrations en CD neutre et anionique et le terme quadratique de la concentration en CD neutre. Le pourcentage en MeOH avait, quant à lui, un effet significatif sur les temps de migration bruts et, par conséquent, sur le temps global de l'analyse.

La séparation du mélange des huit HAP a été optimisée à l'aide d'une approche classique, grâce à une analyse de la désirabilité visant à maximiser les différences entre les temps de fin et les temps de début normalisés de deux pics consécutifs, tout en minimisant le temps global de l'analyse. Les conditions optimales prédites par le modèle ont été validées expérimentalement et une séparation des huit HAP a été obtenue en moins de 7 min en présence d'un électrolyte constitué d'un tampon borate à 10 mM, de SBE- β -CD à 5,3 mM, de Me- β -CD à 21,5 mM, d'urée à 600 mM et de 10,3 % (v/v) de MeOH. A l'aide d'un plan de criblage, la robustesse de la séparation a été vérifiée.

En revanche, étant donné les changements d'ordre de migration des composés observés lors de l'étude des dix-neuf HAP, une nouvelle stratégie d'optimisation basée sur une évaluation systématique des distances entre chaque couple de pics possible a été développée. Tout d'abord, le domaine expérimental a été divisé en 17x17x17 cubes puis, pour chaque condition, les écarts de temps entre tous les couples de pics possibles ont été calculés à partir des modélisations quadratiques des temps de début et de fin normalisés des pics. Après élimination des conditions ne satisfaisant pas la contrainte de non-chevauchement des pics, des fonctions de désirabilité définies sur l'intervalle de temps minimum entre deux pics adjacents et le temps global de l'analyse ont été appliquées. Lors de la validation expérimentale des conditions optimales prédites par le modèle, la paire benzo(a)pyrène/pyrène n'était pas correctement séparée ($R_s = 1,2$). Les erreurs de prédiction du modèle pouvant expliquer ces résultats, les cubes voisins de l'optimum ont été, par la suite, explorés. Enfin, les dix-neuf HAP ont été séparés avec des résolutions supérieures à 1,8 en moins de 18 min en présence d'un électrolyte constitué d'un tampon borate à 10 mM (pH 9,2), de SBE- β -CD à 9,4 mM, de Me- β -CD à 14,1 mM, d'urée à 600 mM et de 11,2 % (v/v) de MeOH.

Ces méthodes ont été finalement appliquées avec succès à l'analyse d'extraits d'huile dopés comme l'attestent les très bonnes séparations obtenues (maintien des sélectivités). En

revanche, en milieu réel, un effet de matrice a été identifié pour les HAP les plus lourds induisant une sous-estimation de la concentration en HAP et une diminution des limites de quantification. Cet effet de matrice devra être pris en compte lors d'une future validation de méthode. Il sera alors probablement nécessaire d'avoir recours soit à un étalonnage directement dans l'huile, soit à la méthode des ajouts dosés.

***PARTIE III – VERS UN TRANSFERT DES MÉTHODES
DÉVELOPPÉES EN ÉLECTROPHORÈSE
CAPILLAIRE AU FORMAT MICROSYSTÈME***

CHAPITRE I : Les microsystemes séparatifs

1. Introduction

De nos jours, les microsystemes séparatifs constituent l'un des développements majeurs de la chimie analytique. Dans les laboratoires de recherche, ils s'imposent progressivement comme une alternative de choix face aux principaux défis des sciences analytiques. En effet, étant donnée la cadence de plus en plus soutenue en analyses toujours plus complexes, il s'avère indispensable de développer des outils analytiques rapides et performants. Ainsi, depuis l'introduction de la notion des microsystemes pour l'analyse totale (micro total analysis system : μ TAS) par Manz et son équipe, au début des années 1990 [1, 2], les microsystemes séparatifs se développent et visent à intégrer sur une plaque de quelques cm^2 , les différentes étapes de l'analyse, incluant le traitement de l'échantillon, la séparation des analytes et leur détection. Ils sont apparus comme un moyen avantageux de réduire les temps d'analyse tout en diminuant les quantités de réactifs et d'échantillons consommées. En plus de l'aspect miniaturisé, ils présentent une forte capacité de traitement en parallèle et une remarquable aptitude à l'automatisation [3-6]. Ces systemes miniaturisés portent les noms de microsysteme séparatif, de laboratoire sur puce (lab-on-a-chip) ou encore de microsysteme analytique intégré pour l'analyse totale (μ TAS).

Typiquement, les microsystemes ont un format similaire à celui d'une carte de crédit et sont constitués d'un réseau de canaux de quelques centimètres à quelques dizaines de centimètres de longueur, de largeur comprise entre 20 et 100 μm et de hauteur comprise entre 5 et 50 μm . Une représentation schématique d'un microsysteme de géométrie « simple croix » est présentée Figure III-I-1. Le petit canal est appelé « canal d'échantillonnage », tandis que le long canal est nommé « canal de séparation » car il s'y déroule l'étape de séparation. Ainsi, les réservoirs présents aux extrémités du canal d'échantillonnage sont communément appelés réservoir échantillon (S, « sample ») et réservoir échantillon poubelle (SW, « sample waste »). Les réservoirs situés aux extrémités du canal de séparation sont, quant à eux, nommés réservoir électrolyte (B, « buffer ») et réservoir électrolyte poubelle (BW, « buffer waste »).

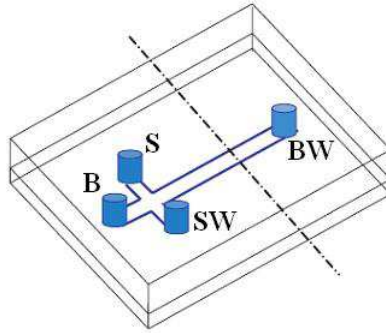


Figure III-I-1. Représentation schématique d'un microsystème comportant deux canaux en croix et quatre réservoirs S, SW, B et BW (adapté de [7]).

Différents type de matériaux et de technologies de micro-fabrication peuvent être mis en œuvre [5, 8-10]. Les tous premiers microsystèmes étaient fabriqués en silicium puisque les techniques de gravure associées (photolithographie) étaient déjà maîtrisées dans le domaine de la microélectronique. Ainsi, le premier microsystème séparatif, développé par Terry et coll. était un chromatographe en phase gazeuse miniature intégré à une plaque de silicium [11]. Cependant, le silicium présente plusieurs inconvénients comme son coût, son absorbance dans le visible et dans l'UV, le rendant incompatible avec les systèmes de détection optiques, et ses propriétés de semi-conducteur qui limitent les valeurs des champs électriques applicables impactant alors les temps d'analyse.

Le verre a donc rapidement remplacé le silicium. C'est un matériau avantageux puisqu'il est transparent en UV et permet de générer des écoulements électroosmotiques élevés de part la présence de groupements silanol ionisables à sa surface. De plus, la chimie du verre étant connue, des modifications chimiques de ses parois afin de limiter l'adsorption des composés par exemple, sont donc plus facilement envisageables. Néanmoins, la photolithographie du verre est une technique de gravure complexe, longue, coûteuse, qui nécessite des équipements onéreux de type salles blanches.

Par conséquent, on assiste aujourd'hui à l'essor de microsystèmes à base de polymères tels que le poly(méthylméthacrylate) (PMMA) ou le poly(diméthylsiloxane) (PDMS) dont les méthodes de micro-fabrication sont plus rapides, plus simples et moins coûteuses [10, 12, 13]. En effet, à partir d'un simple moule en silicium, il est possible de fabriquer plusieurs microsystèmes en quelques heures et à moindre coût puisque les polymères sont des matériaux bons marchés dont les technologies de micro-fabrication n'exigent pas l'utilisation d'un environnement spécifique comme des salles blanches par exemple [14]. Aujourd'hui, une production de masse de ce type de microsystèmes permet de réduire considérablement leur coût voire de les rendre jetable (Microfluidic ChipShop®, Jena, Allemagne).

2. Les microsystèmes séparatifs électrophorétiques

Bien que les premiers microsystèmes analytiques aient été basés sur des techniques chromatographiques [11, 15], il s'est rapidement avéré que les techniques électrophorétiques étaient plus facilement transposables à l'échelle miniaturisée [1]. En effet, les écoulements électroosmotiques, utilisés comme mode de déplacement des fluides dans les microsystèmes électrophorétiques, s'avèrent plus adaptés aux faibles débits et volumes considérés. Contrairement aux écoulements hydrodynamiques qui nécessitent l'utilisation de vannes et de pompes difficilement miniaturisables, l'écoulement électroosmotique (ou électroosmose) requiert simplement un jeu d'électrodes qu'il suffit de plonger dans les réservoirs aux extrémités des canaux et un générateur de haute tension. En fonction de l'état de surface des canaux, de la composition de l'électrolyte et des champs électriques appliqués, des écoulements électroosmotiques complexes peuvent être contrôlés. Un autre avantage reconnu de l'électroosmose est son profil d'écoulement plat qui limite la dispersion de la zone échantillon et permet ainsi d'atteindre de grandes valeurs d'efficacités. A l'inverse, dans le cas d'un écoulement généré par différences de pression (écoulement de Poiseuille), un profil parabolique des vitesses est établi, engendrant une source de dispersion supplémentaire appelée dispersion hydrodynamique.

Un des tout premiers travaux sur les microsystèmes séparatifs, rapporté par Effenhauser et son équipe en 1993, concerne la séparation électrophorétique et la détection par fluorescence d'un mélange d'acides aminés dérivés [16]. Bien que le mode de séparation par électrophorèse capillaire de zone (CZE) soit le plus répandu [2, 17, 18], d'autres techniques électrocinétiques ont été mises en œuvre telles que l'électrophorèse en gel [19, 20], la chromatographie électrocinétique micellaire (MEKC) [21-24] ou encore l'électrochromatographie [25-27]. En adaptant la géométrie du microsystème, des séparations bidimensionnelles ont également été réalisées. Des digestats de protéines ont pu être séparés en mode MEKC dans une première dimension puis en mode CZE dans une seconde dimension [28]. Récemment, les protéines d'un lait pour bébé ont été analysées en couplant les deux méthodes orthogonales de focalisation isoélectrique et de CZE [29]. De plus, certaines techniques de pré-concentration en ligne comme l'isotachophorèse ont déjà été employées [30].

Sur microsystème comme pour tout autre système analytique, le succès d'une analyse ne dépend pas uniquement des étapes de séparation et de détection mais aussi et surtout de l'étape d'injection. Cependant, compte tenu des faibles volumes d'échantillon à injecter, typiquement de l'ordre de quelques centaines de picolitres, l'injection est l'une des étapes les plus délicates à contrôler et à optimiser au format microsystème. Contrairement à

l'électrophorèse capillaire (CE) traditionnelle pour laquelle les modes d'injections hydrodynamiques et électrocinétiques peuvent être employés, dans le cas d'un microsystème, l'injection se base sur l'écoulement électroosmotique. La zone d'échantillon injectée dépend alors de la géométrie d'intersection entre le canal d'échantillonnage et le canal de séparation et de la distribution des potentiels appliqués à chaque réservoir [31]. Les géométries d'intersection les plus courantes sont de type simple croix et double-T, respectivement introduites par Harrison et coll. [32, 33] et Effenhauser et coll. [16, 34]. En fonction des potentiels appliqués, plusieurs modes d'injection existent pour une géométrie d'intersection donnée. Concernant la géométrie simple croix, les modes flottant [32, 33], pincé [18, 35, 36], pincé à contre-flux [37], par porte [36, 38, 39], double-L [40, 41] et dynamique [42, 43] ont été mis en œuvre.

Le premier mode d'injection appliqué à une géométrie en croix a été le mode flottant [16, 32, 33] qui comporte deux étapes : une étape d'échantillonnage et une étape de séparation. Lors de l'étape d'échantillonnage, une différence de potentiel est appliquée entre les réservoirs S et SW provoquant une migration électrocinétique de l'échantillon le long du canal d'échantillonnage (Figure III-I-2A1). Le volume d'injection est alors défini par la zone remplie d'échantillon à l'intersection. Pendant l'étape de séparation, la différence de potentiel est appliquée aux bornes du canal de séparation, ce qui a pour conséquence d'injecter le volume d'échantillon présent à l'intersection des canaux dans le canal de séparation (Figure III-I-2A2). Les principales limites de ce mode d'injection proviennent de la diffusion possible des solutés dans le canal de séparation au cours de l'étape d'échantillonnage [32] et des fuites éventuelles de l'échantillon dans le canal de séparation au cours de l'étape de séparation, perturbant alors la ligne de base [40, 41, 44]. En effet, l'écoulement de l'électrolyte du réservoir B vers le réservoir BW peut entraîner l'échantillon présent au voisinage de l'intersection dans le canal de séparation, ce qui aurait pour conséquence d'augmenter le signal de fluorescence et donc de perturber la ligne de base de l'analyse.

Afin d'éviter la diffusion de l'échantillon dans le canal de séparation lors de l'étape d'échantillonnage, le flux d'échantillon peut être pincé par deux contre-flux d'électrolyte provenant des deux branches du canal de séparation et allant vers le réservoir SW, générés par l'application simultanée de potentiels aux extrémités du canal de séparation (Figure III-I-2B1) [35, 45]. L'intensité de pincement alors appliquée (R_1) est calculée comme le rapport entre le champ électrique présent dans le canal entre le réservoir B et l'intersection (E_B) et celui présent dans le canal entre le réservoir S et l'intersection (E_S). Ce paramètre est sans dimension. Le pincement est dit symétrique lorsque les champs électriques appliqués dans les deux branches du canal de séparation sont identiques ($E_B = E_{BW}$). Ce mode d'injection, logiquement appelé mode pincé, rend la quantité d'échantillon injectée indépendante de la

durée de l'étape d'échantillonnage (t_{ech}) [18, 35]. Néanmoins, comme pour le mode flottant, des fuites d'échantillon peuvent avoir lieu dans le canal de séparation durant l'étape de séparation (Figure III-I-2B2).

Pour minimiser ces phénomènes de fuites d'échantillon, un potentiel inférieur au potentiel de l'intersection des canaux est généralement appliqué aux extrémités du canal d'échantillonnage lors de l'étape de séparation [32, 46, 47]. Un flux d'électrolyte provenant du réservoir électrolyte (B) s'introduit alors dans les deux branches du canal d'échantillonnage, éloignant ainsi l'échantillon de l'intersection. L'échantillon ne risque alors plus d'être entraîné dans le canal de séparation. Ce phénomène, nommé retrait de l'échantillon, est caractérisé par l'intensité de retrait (R_2) qui correspond au rapport entre le champ électrique présent dans le canal d'échantillonnage (E_S) et celui présent dans le canal de séparation (E_{BW}). Ce paramètre est donc également sans dimension. Un retrait symétrique est obtenu lorsque les champs électriques appliqués dans les deux branches du canal d'échantillonnage sont identiques ($E_S = E_{SW}$). La Figure III-I-2C présente les étapes d'un mode d'injection pincé (Figure III-I-2C1) avec un retrait de l'échantillon durant l'étape de séparation (Figure III-I-2C2). Bien que le mode d'injection pincé permette de contrôler la taille de la zone échantillon via notamment les intensités de pincement et de retrait, le volume d'échantillon injecté reste limité par la taille des canaux. Pour certaines applications où la sensibilité est un facteur limitant, il est donc parfois nécessaire d'augmenter la quantité d'échantillon injectée en procédant, par exemple, à une injection dynamique.

Ainsi, l'injection dynamique introduite en 2003 par Sinton et coll., permet d'augmenter les quantités d'échantillon injectées grâce à l'ajout d'une étape de migration contrôlée de l'échantillon dans le canal de séparation [42, 48]. Cette étape supplémentaire dite d'expansion (Figure III-I-2D2) a lieu entre les étapes d'échantillonnage (Figure III-I-2D1) et de séparation (Figure III-I-2D3) du mode pincé en appliquant des différences de potentiel entre les réservoirs S et B, S et BW et S et SW. Ainsi, un écoulement d'échantillon est généré dans l'ensemble des branches des canaux d'échantillonnage et de séparation (Figure III-I-2D2). La durée de l'étape d'expansion est désignée comme étant le temps dynamique (t_{dyn}). Par conséquent, en modulant la valeur du temps dynamique, cette méthode permet d'injecter des quantités d'échantillon plus grandes que l'injection pincée tout en conservant l'indépendance de la quantité d'échantillon injectée vis-à-vis de la durée d'échantillonnage. Selon la valeur du temps dynamique qui est en général de quelques secondes, les longueurs des créneaux d'échantillon peuvent varier entre 1 et 20 fois la largeur du canal de séparation avec un niveau de concentration proche de la concentration initiale de l'échantillon [42]. En effet, avec ce type d'injection, les zones d'échantillon injectées sont plus concentrées et mieux définies par rapport à celles générées avec une

injection flottante. De plus, bien que le mode d'injection flottant permette également de moduler le volume d'échantillon injecté dans de grandes proportions, le mode d'injection dynamique a l'avantage de pouvoir injecter une même quantité d'échantillon en un temps beaucoup plus court [49]. Cela s'explique par le fait que pour une injection flottante, l'expansion de l'échantillon provient uniquement de la diffusion moléculaire qui est un mode de transport lent. Ainsi, pour des applications nécessitant l'injection de grands volumes d'échantillon, le mode d'injection dynamique réduit significativement le temps d'analyse et apparaît donc plus avantageux que le mode d'injection flottant. Néanmoins, l'injection dynamique est complexe à mettre en œuvre puisqu'elle comprend trois étapes durant lesquelles les potentiels des quatre réservoirs doivent être contrôlés simultanément. Elle exige donc l'utilisation d'un générateur de tension adapté avec un temps de réponse rapide. Enfin, en mode d'injection dynamique, des effets de discrimination entre les composés peuvent exister. En effet, dans ce cas, la quantité d'échantillon injectée correspond à la somme de deux contributions :

(i) la quantité d'échantillon contenue dans le volume présent à l'intersection des canaux à la fin de l'étape d'échantillonnage.

(ii) la quantité d'échantillon introduite dans le canal de séparation durant l'étape d'expansion.

Si le temps d'échantillonnage est suffisamment long pour que le composé de plus faible mobilité puisse atteindre l'intersection, alors, le volume présent à l'intersection à la fin de l'étape d'échantillonnage est représentatif de l'échantillon. Au contraire, la deuxième quantité dépend de la nature de l'analyte puisqu'elle est directement corrélée à sa mobilité [49]. Il est donc important de prendre en compte cet effet de discrimination lors d'analyses quantitatives. Malgré les nombreux avantages sus-cités de ce mode d'injection, peu de publications y font référence jusqu'à présent [42, 43, 49, 50].

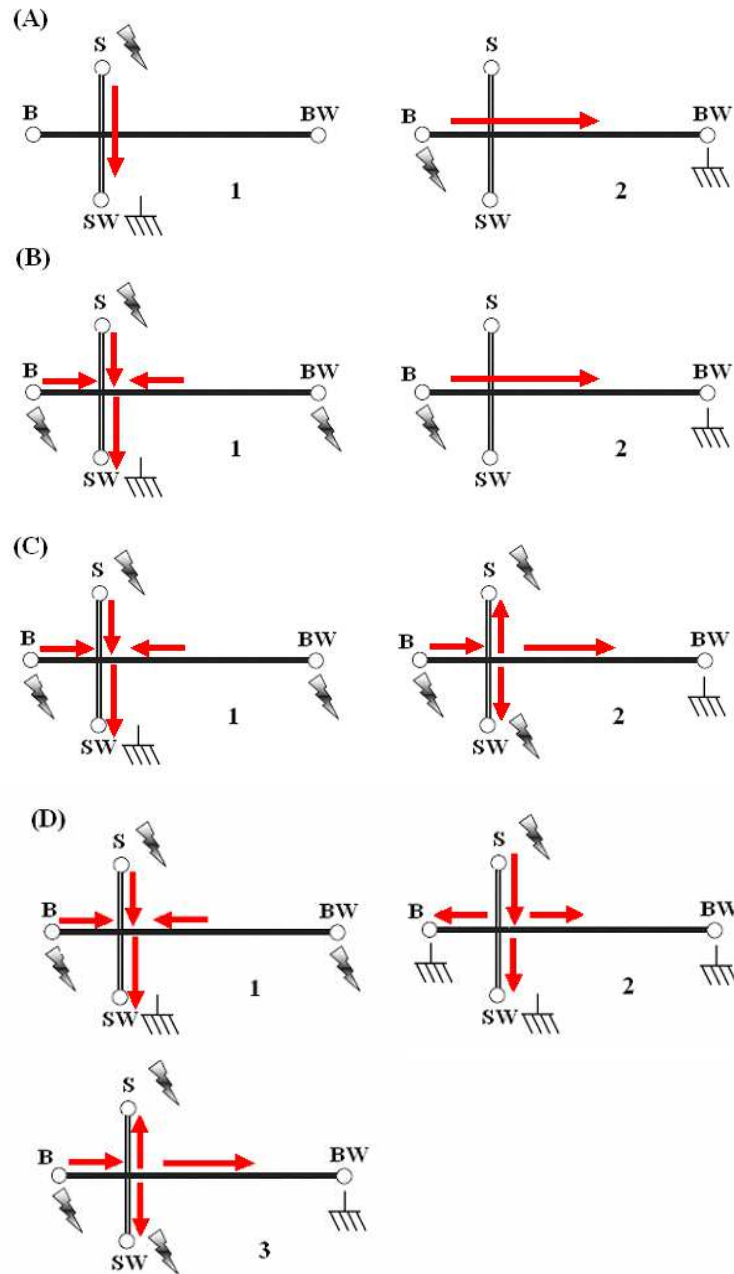


Figure III-I-2. Représentations schématiques des modes d'injection électrocinétique. (A) Mode flottant (1, échantillonnage ; 2, séparation). (B) Mode pincé (1, échantillonnage ; 2, séparation). (C) Mode pincé avec un retrait de l'échantillon (1, échantillonnage ; 2, séparation avec retrait). (D) Mode dynamique avec un retrait de l'échantillon (1, échantillonnage ; 2, expansion ; 3, séparation avec retrait).

Depuis longtemps, le développement de systèmes de détection suffisamment sensibles est l'un des défis majeurs dans le domaine des microsystèmes [51-53]. En effet, au format microsystème, il est indispensable d'atteindre de grandes sensibilités de détection compte tenu des volumes extrêmement réduits d'échantillon injectés et du faible trajet optique alors égal à la largeur du canal de séparation i.e. entre 20 et 100 μm . Par conséquent, du fait de sa grande sensibilité, la fluorescence induite par laser (LIF) est très majoritairement utilisée

[54, 55]. En détection LIF, l'utilisation d'un laser puissant et précisément focalisé permet de détecter les analytes avec de très bonnes limites de détection dans des volumes d'échantillon extrêmement petits. Cependant, ce mode de détection se limite à l'analyse de composés naturellement fluorescents ou bien rendus fluorescents par des réactions de dérivation pour le moins fastidieuses. Par ailleurs, les appareils associés à la détection LIF tels que le laser, son alimentation voire un microscope inversé, sont volumineux et onéreux, les rendant incompatibles avec le concept des μ TAS. Ainsi, la détection électrochimique s'impose comme la principale alternative à la détection LIF étant donné sa grande sensibilité non impactée par la miniaturisation, sa miniaturisation intrinsèque et celle de son instrumentation, sa compatibilité avec les techniques de micro-fabrication, son autonomie ou encore son faible coût [56-58]. Plusieurs modes de détection électrochimique existent : conductimétrique, ampérométrique et potentiométrique, les deux premiers modes étant les plus rencontrés au format des microsystemes. Enfin, le couplage du microsysteme avec un spectromètre de masse est parfois aussi rencontré dans la littérature [59, 60]. Tout autre mode de détection reste, à l'heure actuelle, encore marginal.

Concernant les domaines d'application, les microsystemes électrophorétiques ont surtout été dédiés à la bioanalyse [4, 61]. Puis, ils ont également fait leur preuve dans le domaine des analyses environnementales [62, 63]. Enfin, on assiste aujourd'hui à la naissance d'un nouveau champ d'application que sont les analyses agroalimentaires notamment dans les domaines du contrôle qualité et de la sécurité sanitaire des aliments (Partie I-III).

CHAPITRE II : Analyse des HAP sur microsystèmes

1. Optimisation de la séparation des HAP en capillaire en vue d'un transfert au format microsystème

1.1 Détermination de l'optimum par modélisation

Comme présenté dans la PARTIE II, des méthodes de séparation de deux mélanges constitués de 8 et de 19 HAP en présence de l'étalon interne, l'ombelliférone, ont été optimisées en CE à l'aide de plans d'expériences. L'étape suivante de ce projet a donc consisté à transposer ces méthodes d'analyse au format microsystème. Cependant, sur microsystèmes, l'objectif final que nous nous étions fixés était de développer une méthode de séparation des 8 HAP prioritaires du projet, à savoir les 8 HAP communs aux listes US-EPA et EFSA. En effet, à la vue de la diminution de la longueur de séparation lors du passage du format capillaire ($L_{\text{eff}} = 33,5 \text{ cm}$) au format microsystème ($L_{\text{eff}} \text{ maximale} = 8,1 \text{ cm}$), il nous a paru plus réaliste de viser dans un premier temps la séparation de 8 HAP sur microsystème. Plus précisément, l'objectif sur microsystème était d'optimiser la séparation des 8 HAP entre eux (plus l'étalon interne (EI), l'ombelliférone) mais également des 11 autres HAP précédemment étudiés afin de s'assurer que lors d'une présence éventuelle de ces 11 HAP en tant qu'interférents dans la matrice huile, la quantification des 8 HAP prioritaires n'en serait pas affectée. Dans cette optique, la séparation visée au format microsystème, a dans un premier temps été optimisée au format capillaire. Pour cela, le jeu de données du plan d'expériences, présenté en PARTIE II, a été retraité en suivant une approche similaire à celle adoptée pour l'optimisation de la séparation des 19 HAP. Sur capillaire, l'objectif était désormais de maximiser la résolution des 8 HAP prioritaires entre eux (plus l'EI) et des 11 autres HAP, quel que soit le temps d'analyse. Dans ce cas, il n'était alors pas nécessaire de séparer les 11 HAP entre eux. Lors du traitement des données du plan, plusieurs contraintes ont donc été supprimées. Ainsi, les temps de début et de fin normalisés des 20 pics ont, tout d'abord, été modélisés à l'aide du polynôme de second degré suivant :

$$y(\beta) = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=2}^3 \sum_{j=1}^{i-1} \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (\text{eq.1})$$

avec $y(\beta)$, la réponse expérimentale, X_1 , X_2 , X_3 , les facteurs à optimiser ([SBE- β -CD], [Me- β -CD] et %MeOH), β_0 , une constante, β_i , les termes linéaires, β_{ii} , les termes d'interactions quadratiques, β_{ij} , les termes d'interactions du premier ordre et ε , l'erreur expérimentale.

Ensuite, à l'identique de l'étude précédente portant sur les 19 HAP (plus l'EI), l'espace expérimental 3D a été divisé arbitrairement en 4913 sous-espaces. Pour chaque sous-espace, les intervalles de temps, i.e. les écarts de temps normalisés entre le temps de fin et le temps de début de deux pics consécutifs, entre toutes les paires de pics possibles (190 couples de pics différents) ont été estimés en utilisant les modèles des temps de début et de fin normalisés des 20 pics :

$$\Delta t_{ij}(k) = \max(t_i^{start}(k) - t_j^{end}(k), t_j^{start}(k) - t_i^{end}(k)) \quad (\text{eq.2})$$

avec i, j les indices des pics (i, j = 1 à 20, i < j) et k l'indice du sous espace (k = 1 à 4913).

Enfin, les conditions qui satisfaisaient la contrainte $\Delta t_{ij}(k) > 0$, avec i et/ou j appartenant aux 8 HAP prioritaires, ont été retenues (174 conditions en tout). En revanche, lorsque i et j appartenaient aux 11 HAP non prioritaires, les contraintes ont été d'emblée considérées comme satisfaites. Sur les 174 conditions satisfaisant la contrainte précédente, les conditions optimales prédites par le modèle, c'est-à-dire les conditions pour lesquelles l'intervalle de temps normalisé minimum prédit était le plus grand ($\arg \max_k (\min_{ij} (\Delta t_{ij}(k)))$), ont été déterminées. Le point optimum était de 1,6 pour [SBE- β -CD] (14,8 mM), -0,2 pour [Me- β -CD] (20,4 mM) et -1,4 pour % MeOH (11,2 %). Dans ces conditions, l'intervalle de temps normalisé minimum prédit par le modèle, entre la paire DBahA/ANT, était estimé à 0,029.

1.2 Validation expérimentale de l'optimum

Les conditions optimales prédites par le modèle ont ensuite été validées expérimentalement. La séparation électrophorétique des 8 HAP prioritaires en présence des 11 HAP « interférents » et de l'ombelliférone (EI) a été réalisée avec un tampon borate 10 mM comprenant 600 mM d'urée, 14,8 mM de SBE- β -CD, 20,4 mM de Me- β -CD et 11,2 % (v/v) de MeOH (Figure III-II-1).

L'électrophérogramme enregistré montre que tous les couples de pics faisant intervenir au moins un des 8 HAP prioritaires étaient résolus avec retour à la ligne de base ($R_s > 4,2$). De plus, comme attendu, les couples de pics non séparés faisaient bien partis des 11 HAP non prioritaires pour l'étude, à savoir les paires DBaiP/MCH et Pyr/BjFA. Dans ces conditions, l'intervalle de temps normalisé minimum, obtenu pour la paire DBahA/ANT, était de 0,027, valeur en accord avec celle prédite par le modèle (0,029).

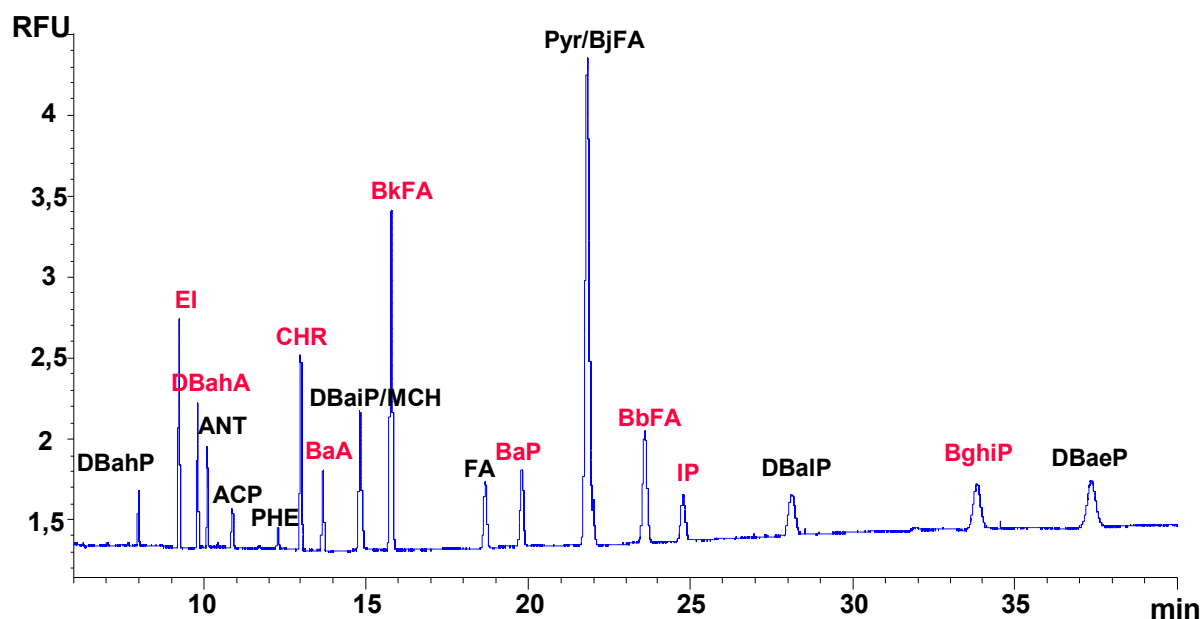


Figure III-II-1. Electrophérogramme d'un mélange standard des 8 HAP prioritaires (en rouge) en présence des 11 autres HAP (en noir) et de l'étalon interne (EI), l'ombelliférone. Capillaire en silice vierge, 49 cm x 50 μ m d.i. (détection LIF à 33,5 cm). Electrolyte : tampon borate de sodium 10 mM contenant 600 mM d'urée, 14,8 mM de SBE- β -CD et 20,4 mM de Me- β -CD dans un mélange eau/MeOH en proportions 88,8:11,2 (v/v). Tension appliquée, +14 kV. Température, 25°C. Injection hydrodynamique, 25 mbars, 5 s. Détection LIF, λ_{exc} = 325 nm, λ_{em} > 350 nm. Echantillon : HAP mis en solution dans un mélange ACN/électrolyte en proportions 1:9 (v/v). Concentrations des HAP : 100 μ g/L exceptés DBahP (60 μ g/L) ; ANT (350 μ g/L) ; ACP (2 μ g/L) ; PHE (1 mg/L) ; CHR (200 μ g/L) ; MCH (30 μ g/L) ; BjFA (150 μ g/L) ; IP (350 μ g/L) ; DBaiP (32 μ g/L) ; EI (160 μ g/L).

Dans ces conditions, la résolution minimale attendue sur microsysteme pour les couples de pics faisant intervenir au moins un des 8 HAP, c'est-à-dire la résolution attendue pour la paire critique, DBahA/ANT, a été estimée. En faisant l'hypothèse qu'il n'existera pas de sources de dispersion supplémentaires sur microsysteme, le rapport des résolutions entre le format capillaire et le format microsysteme devrait être égal, en théorie, à la racine carrée du rapport des longueurs de séparation entre les deux formats :

$$\frac{R_s(\text{capillaire})}{R_s(\text{microsysteme})} = \sqrt{\frac{L_{eff}(\text{capillaire})}{L_{eff}(\text{microsysteme})}} = \sqrt{\frac{33,5}{8,1}} = 2,0 \quad (\text{eq.3})$$

Il est à noter que sur microsystemes, la longueur de 8,1 cm représente la distance entre l'intersection des canaux et le réservoir « électrolyte poubelle » (BW). Elle correspond, par conséquent, à la longueur de séparation maximale théorique. Cependant, de part la présence d'adhésif fluorescent autour du réservoir BW, il est généralement nécessaire de détecter avant ce réservoir et donc de réduire la longueur de séparation effective (Annexe B). Des résolutions au moins deux fois plus faibles que celles obtenues sur capillaire étaient donc attendues sur microsysteme, en absence de sources de dispersion supplémentaires. Ainsi, l'objectif initial qui visait des résolutions minimales de 1,25 (résolution minimale entre

deux pics de même hauteur nécessaire pour une étude quantitative) était tout à fait envisageable. Cependant, lors du passage au microsysteme, la présence de sources de dispersion supplémentaires telles que l'absence de contrôle de la température, le microsysteme n'étant pas thermostaté, la rugosité des canaux... risquait de provoquer des élargissements de pics et donc de dégrader les résolutions.

2. Prise en main du dispositif expérimental dédié à l'analyse sur microsystemes et problèmes rencontrés

Une analyse sur microsysteme requiert un dispositif expérimental complexe constitué de plusieurs modules comme un générateur de tension, un générateur de pression pour les conditionnements et rinçages, une caméra, etc. (Annexe B). Chaque appareil est piloté par un logiciel qui lui est dédié tel que le logiciel HIRIS pour le contrôle de la caméra et l'acquisition et le traitement des séquences d'images. L'expertise sur cette thématique n'étant alors plus présente au laboratoire, la première étape a consisté à prendre en main l'appareillage et à se former aux différents logiciels.

Le dispositif en place permet une détection par fluorescence à l'aide d'un microscope inversé Olympus, équipé d'une lampe à mercure et d'un filtre laissant passer les longueurs d'onde d'excitation entre 330 et 385 nm et les longueurs d'onde d'émission supérieures à 420 nm. De plus amples détails techniques sur les différents équipements et logiciels utilisés lors des analyses sur microsystemes sont présentés en Annexe B.

L'ensemble des travaux a été réalisé sur des microsystemes à base de verre borosilicaté afin de profiter de ses nombreux avantages déjà cités précédemment, comme sa compatibilité avec le système de détection par fluorescence actuellement installé au laboratoire, sa capacité à générer un écoulement électroosmotique élevé, sa stabilité chimique le rendant compatible avec les milieux hydroorganiques et enfin, sa similarité avec la silice des capillaires facilitant la transposition des méthodes du format capillaire au format miniaturisé. Les microsystemes en polymère n'étaient, quant à eux, pas envisageables puisqu'ils auraient très certainement conduit à un phénomène d'adsorption des HAP sur leurs parois. De plus, l'écoulement électroosmotique généré par ce type de matériau n'aurait probablement pas été suffisamment élevé pour pouvoir détecter les HAP. Concernant la géométrie d'intersection, des microsystemes double-T, alors disponibles au laboratoire, ont été utilisés. Sur ce type de microsystemes, les deux branches du canal d'échantillonnage sont décalées de 100 μm le long du canal de séparation. Les autres dimensions caractéristiques des microsystemes mis en œuvre sont présentées en Annexe B. Lors des

premières semaines de prise en main de cette technologie, plusieurs difficultés expérimentales ont dû être surmontées.

2.1 Présence de bulles et de particules dans les micro-canaux

La première difficulté rencontrée était liée à la présence de bulles ou de particules à l'intérieur des canaux. Ces deux phénomènes pouvaient être identifiés expérimentalement en contrôlant le courant généré dans le canal de séparation. En effet, l'introduction de bulles d'air ou de particules au sein des canaux provoquait des chutes ou des fluctuations importantes de courant rendant alors toute analyse impossible. En plus de perturber le courant, la présence de particules dans les canaux du microsystème pouvait également entraîner leur obstruction empêchant alors l'écoulement des fluides. En microsystèmes, tout comme en format capillaire, le phénomène d'électrolyse existant aux électrodes pendant les étapes de séparation et d'injection électrocinétiques est la cause principale de la formation des bulles. La gêne occasionnée peut être réduite en faisant varier la position des électrodes dans les réservoirs ou en modifiant la géométrie des réservoirs, mais peut difficilement être éliminée. Quant aux particules constituées de poussières et de fibres de tissus, elles étaient majoritairement introduites dans les canaux lors des étapes de rinçages hydrodynamiques. Les bouchons alors formés étaient généralement localisés en sorties de réservoirs (Figure III-II-2) ou à l'intersection des canaux.



Figure III-II-2. Photographie du réservoir échantillon rempli de particules à l'origine du bouchage créé en sortie de réservoir (encerclé).

Dans l'optique de limiter ces problèmes d'obstruction, les solutions d'électrolyte et d'échantillon étaient fraîchement préparées chaque jour. Avant leur utilisation, ces solutions étaient systématiquement filtrées avec un filtre de 0,22 μm et stockées dans des récipients fermés. D'autres précautions supplémentaires se sont avérées nécessaires comme le port systématique des gants, l'utilisation de papiers non-tissés adaptés aux salles blanches sur lesquels le microsysteme était déposé, un rinçage méticuleux des 4 réservoirs avant chaque étape de rinçage hydrodynamique et un renouvellement des solutions entre chaque analyse. Pour éviter l'introduction de bulles d'air dans le microsysteme, chaque solution était dégazée pendant 15 min environ, dans un bac à ultrasons, avant d'être utilisée. Une fois ces différentes précautions prises, la présence de bulles et les phénomènes d'obstruction se sont fait beaucoup plus rares.

Si des particules venaient à se bloquer dans les canaux du microsysteme, des rinçages d'environ 10 min à la soude 1 M et 0,1 M permettaient généralement de désorber les particules bloquées et ainsi de les éliminer. Lorsque des bulles étaient introduites au sein du dispositif, un simple rinçage hydrodynamique des canaux était généralement suffisant.

Enfin, le microsysteme devait être obligatoirement rincé à l'eau avant d'être stocké dans un flacon rempli d'eau, pour éviter tout phénomène de cristallisation de l'électrolyte lors du séchage des canaux.

2.2 Instabilités de l'écoulement électroosmotique

Une autre difficulté rencontrée lors des premières manipulations sur microsystèmes provenait de l'instabilité de l'écoulement électroosmotique. En effet, une diminution de l'écoulement électroosmotique au cours du temps avait pour conséquence de réduire les quantités injectées, d'augmenter les temps de migration et enfin de générer des phénomènes de fuites de l'échantillon dans le canal de séparation caractéristiques d'un mauvais retrait de l'échantillon durant l'étape de séparation.

Au début des travaux expérimentaux, les parois des canaux du microsysteme n'étaient activées qu'une seule fois à la soude et cela avant la première utilisation du système. La méthode d'activation consistait à faire passer sous une pression de 1 bar de la soude 1 M pendant 5 min, de la soude 0,1 M pendant 5 min et de l'eau pendant 5 min, puis le microsysteme était conditionné avec l'électrolyte pendant 10 min avant la première analyse. En début de chaque journée et après l'apparition de fuites de l'échantillon dans le canal de séparation, le microsysteme était conditionné et rincé uniquement avec l'électrolyte pendant 10 min sous 1 bar. L'influence d'un rinçage à la soude 1 M et 0,1 M sur les aires corrigées,

les temps de migration et les phénomènes de fuites est démontrée Figure III-II-3. Après passage de la soude, les aires corrigées ont augmenté de 50 %, les temps de migration ont diminué de 20 % et le retrait de l'échantillon est redevenu performant.

La fréquence d'activation des canaux à la soude a donc été jugée insuffisante. Pour cela, la première solution testée a été un conditionnement journalier du microsysteme à la soude en appliquant la méthode d'activation précédemment décrite.

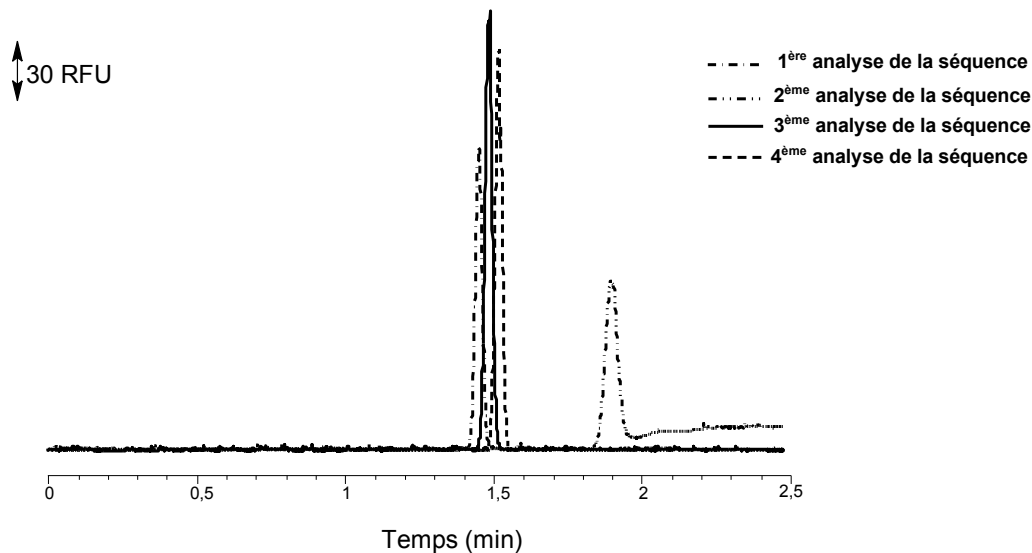


Figure III-II-3. Electrophérogrammes représentant 4 injections dynamiques d'ombelliférone successives avec un rinçage du microsysteme à la soude entre les analyses 2 et 3. Echantillonnage : $\Phi_S^* = 823 \text{ V}$, $\Phi_{SW} = 0 \text{ V}$, $\Phi_B = 614 \text{ V}$, $\Phi_{BW} = 1631 \text{ V}$, $R_1 = 0,2$, $t_{ech} = 1 \text{ min}$. Expansion : $t_{dyn} = 2,5 \text{ s}$, $\Phi_S = 800 \text{ V}$. Séparation : $\Phi_S = \Phi_{SW} = 2100 \text{ V}$, $\Phi_B = 3000 \text{ V}$, $\Phi_{BW} = 0 \text{ V}$, $R_2 = 0,98$, $E_{BW}^{**} = 276 \text{ V.cm}^{-1}$. Détection : shutter*** = 30 ms, gain = 0, $L_{eff} = 70 \text{ mm}$. Electrolyte : tampon borate de sodium 5 mM (pH 9,2). Echantillon : ombelliférone 10 mg/L dans l'électrolyte. Φ_x : potentiel appliqué au réservoir x. E_x^{**} : champ électrique entre l'intersection des canaux et le réservoir x. ***shutter : temps d'exposition du capteur de la caméra CCD.

2.3 Ecoulements hydrodynamiques

Un rinçage régulier du microsysteme à la soude n'a pas résolu définitivement les problèmes de fuites d'échantillon dans le canal de séparation. En effet, au cours d'une séquence d'analyses, le retrait de l'échantillon ne s'effectuait plus correctement. Une explication possible de ce phénomène était la présence d'écoulements hydrodynamiques parasites au sein du microsysteme susceptibles de perturber l'écoulement électroosmotique lors du retrait de l'échantillon (Annexe C). En effet, au cours de l'étape de séparation, qui est l'étape la plus longue en comparaison des étapes d'échantillonnage et d'expansion, le volume de liquide dans le réservoir S augmentait plus rapidement que le volume de liquide dans le réservoir BW, entraînant alors des différences de hauteurs entre les deux réservoirs. Ces différences de niveaux entre les réservoirs pouvaient induire des écoulements hydrodynamiques du

réservoir S vers le réservoir BW engendrant par conséquent, une fuite de l'échantillon vers le canal de séparation. En plus d'affecter les étapes d'injection et de séparation, de tels écoulements risquaient d'élargir les créneaux d'échantillon et donc de dégrader les efficacités. Ainsi, il a été jugé nécessaire de renouveler les solutions d'échantillon et d'électrolyte entre chaque analyse afin de remettre à niveau les liquides dans les réservoirs. La Figure III-II-4 met en évidence la nécessité de réajuster les niveaux des solutions dans les réservoirs afin d'éviter toutes fuites de l'échantillon lors de l'analyse.

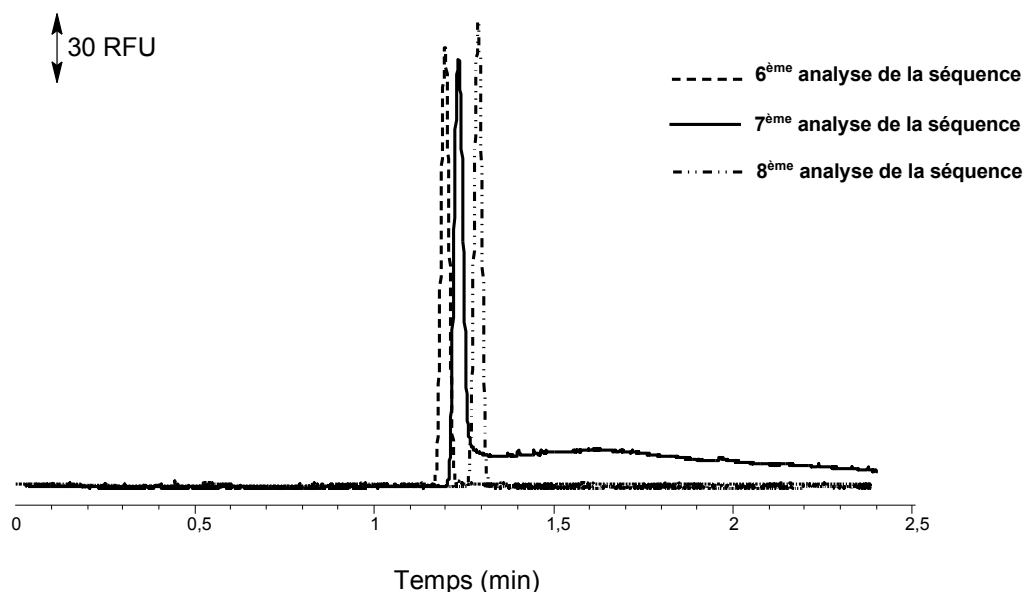


Figure III-II-4. Electrophérogrammes représentant les 6^{ème}, 7^{ème} et 8^{ème} injections dynamiques d'ombelliférone d'une séquence avec réajustement des hauteurs de liquides dans les réservoirs entre les analyses 7 et 8. Autres conditions : cf. Figure III-II-3.

Comme démontré en Annexe C, il existe d'autres façons de prévenir l'apparition de ce type d'écoulement interférent comme l'utilisation de réservoirs plus larges, l'augmentation de la longueur du canal d'échantillonnage ainsi que la diminution de sa section. Des réservoirs plus larges limiteraient les variations de hauteurs des liquides tandis qu'un canal d'échantillonnage plus long et plus étroit augmenterait la résistance hydraulique du canal et donc diminuerait la vitesse hydrodynamique induite par la différence de pression aux extrémités de ce canal (Annexe C). Néanmoins, ces solutions n'ont pas pu être testées au cours de cette étude.

3. Optimisation de l'injection

Cette partie est consacrée à l'étude du mode d'injection dynamique sur les microsystemes en verre de géométrie double-T et plus précisément à l'optimisation de l'intensité de retrait (R_2) appliquée lors de l'étape de séparation et de la durée de l'étape d'expansion (t_{dyn}).

Comme décrit précédemment, le système de détection intégré au dispositif d'analyse sur microsystemes est constitué d'un microscope inversé, d'une lampe à vapeur de mercure et d'une caméra CCD. Compte tenu de la faible sensibilité de ce système de détection en comparaison avec le système de détection LIF utilisé pour les analyses en CE, l'objectif de cette étude a été d'optimiser les quantités d'échantillon injectées afin d'améliorer les limites de détection. L'une des caractéristiques du mode dynamique étant de pouvoir injecter de grands volumes d'échantillon en un temps court, ce type d'injection a donc été choisi. Dans ce cas, les quantités injectées peuvent être optimisées à travers l'étude de deux principaux paramètres que sont : R_2 et t_{dyn} . En plus de ces deux facteurs, l'intensité de pincement (R_1) lors de l'étape d'échantillonnage ainsi que les champs électriques appliqués dans les deux branches du canal de séparation durant l'étape d'expansion (E_B et E_{BW}), devraient également impacter les quantités d'échantillon injectées. En effet, comme déjà précisé, la quantité d'échantillon injectée provient de plusieurs contributions : (i) la quantité d'échantillon contenue dans le volume présent à l'intersection des canaux à la fin de l'étape d'échantillonnage, directement dépendante de R_1 , (ii) la quantité d'échantillon introduite dans le canal de séparation lors de l'étape d'expansion dynamique, fonction de t_{dyn} , E_B et E_{BW} , et (iii) la quantité d'échantillon réellement injectée qui varie avec R_2 . Cependant, dans le cas d'une injection dynamique, l'impact attendu de la première contribution sur les quantités d'échantillon injectées étant plus faible, le paramètre R_1 n'a pas été étudié ici et a été maintenu à 0,2, en s'inspirant des travaux de la littérature [49]. Concernant la durée de l'étape d'échantillonnage (t_{ech}), elle a été fixée à 1 min après s'être assuré que ce temps était suffisant pour remplir l'ensemble du canal d'échantillonnage avec l'échantillon. Enfin, durant l'étape d'expansion, les champs électriques E_B et E_{BW} ont été respectivement maintenus à 331 et 38 V.cm⁻¹ ; valeurs calculées pour un potentiel appliqué au réservoir S de 800 V. Les méthodes de calcul de R_1 , R_2 ainsi que des champs électriques appliqués lors de l'échantillonnage pincé et de la séparation sont présentées en Annexe D.

Cette étude a été menée avec l'ombelliférone, composé précédemment utilisé comme étalon interne lors des analyses en CE. En effet, l'ombelliférone a l'avantage d'être moins hydrophobe que les HAP et donc d'être moins susceptible de s'adsorber aux parois des canaux. Elle présente également de meilleures propriétés de fluorescence que les HAP, la rendant plus facilement détectable. Le choix de l'ombelliférone a donc permis de faciliter la

prise en main et l'optimisation de l'étape d'injection sur microsystemes. Toujours dans une optique de simplifier les conditions opératoires, un tampon borate 5 mM (pH de 9,2) a été utilisé. En effet, une composition d'électrolyte plus simple a été privilégiée en comparaison avec l'électrolyte précédemment optimisé pour le transfert de la méthode de séparation des HAP au format microsysteme, constitué de CD, d'urée et de MeOH. De plus, un tampon borate de faible force ionique a été employé afin de pouvoir travailler à des champs électriques élevés et ainsi réduire les temps d'analyse.

3.1 Etude du retrait

Comme mentionné précédemment, pour éviter les fuites d'échantillon dans le canal de séparation lors de la séparation, il convient d'appliquer aux extrémités du canal d'échantillonnage, c'est-à-dire aux réservoirs S et SW, un potentiel inférieur à celui de l'intersection. Une partie de l'électrolyte provenant du réservoir B s'introduit alors dans le canal d'échantillonnage, éloignant ainsi l'échantillon de l'intersection, qui ne risque alors plus d'être entraîné dans le canal de séparation. Lors du retrait de l'échantillon, l'intensité de retrait (R_2) est égale au rapport entre le champ électrique présent dans le canal d'échantillonnage (E_s) et celui présent dans le canal de séparation (E_{BW}) (Annexe D, eq.17). Puisque ce paramètre impacte directement le volume d'échantillon injecté, il a été nécessaire de l'optimiser. Pour l'ensemble des expériences, les champs électriques appliqués dans les deux branches du canal échantillonnage étaient identiques ($E_s = E_{sw}$) afin d'obtenir un retrait symétrique. La Figure III-II-5 présente des injections dynamiques d'ombelliférone ($t_{dyn} = 1$ s) avec des valeurs d'intensité de retrait (R_2) comprises entre 0,28 et 1,19.

A la vue de l'allure des électrophérogrammes, une intensité de retrait minimum de 0,98 apparaît nécessaire pour prévenir les fuites de l'échantillon dans le canal de séparation. Cependant, il peut être également observé que plus l'intensité de retrait est grande et plus la quantité d'échantillon injectée est faible. En effet, plus le retrait est important et plus la quantité d'échantillon réintroduite dans le canal d'échantillonnage est grande, rendant ainsi la quantité injectée plus faible. Ainsi, afin de maximiser les quantités injectées, les analyses électrophorétiques ont été réalisées par la suite avec une intensité de retrait de 0,98. Dans ces conditions, sur la base d'un rapport signal/bruit de 10, la limite de quantification (LOQ) de l'ombelliférone était d'environ 150 $\mu\text{g/L}$. Cette valeur de LOQ étant 7 fois plus élevée que celle obtenue en CE (20 $\mu\text{g/L}$), il est apparu nécessaire d'optimiser les quantités injectées à travers l'étude de la durée de l'étape d'expansion (t_{dyn}).

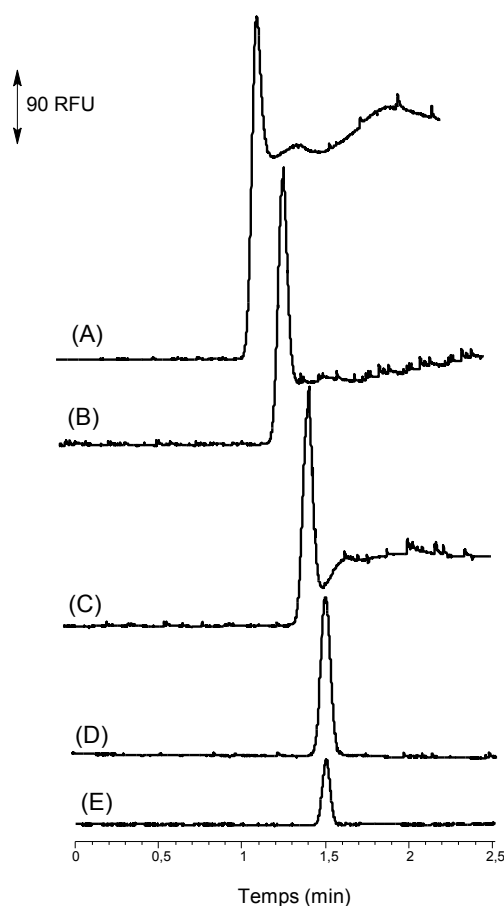


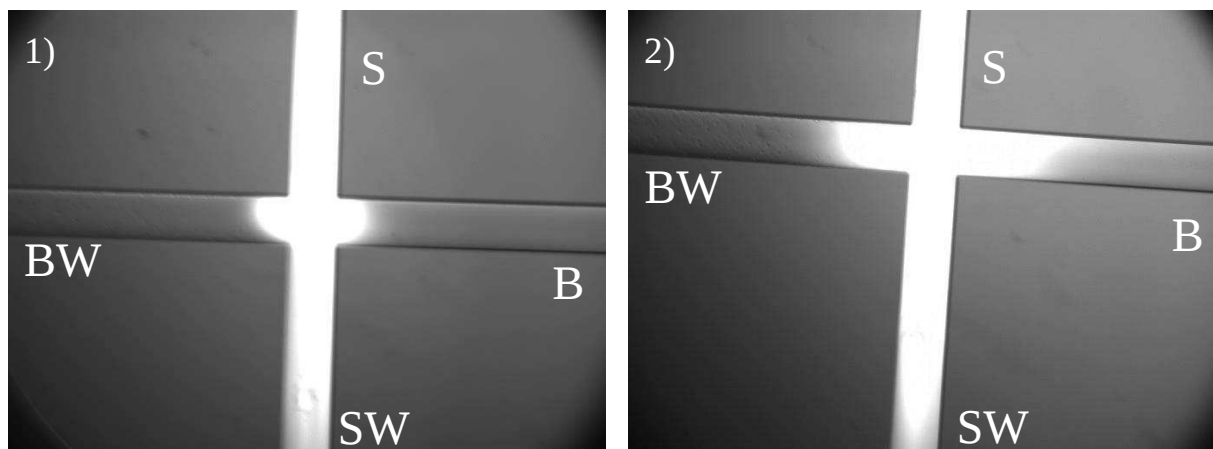
Figure III-II-5. Injections dynamiques d'ombelliférone dans le microsysteme de géométrie double-T. Echantillonnage : $\Phi_S = 823$ V, $\Phi_{SW} = 0$ V, $\Phi_B = 614$ V, $\Phi_{BW} = 1631$ V, $R_1 = 0,2$, $t_{ech} = 1$ min. Expansion : $t_{dyn} = 1$ s, $\Phi_S = 800$ V. Séparation : $\Phi_B = 3000$ V, $\Phi_{BW} = 0$ V (A) $\Phi_S = \Phi_{SW} = 2500$ V, $R_2 = 0,28$; (B) $\Phi_S = \Phi_{SW} = 2400$ V, $R_2 = 0,44$; (C) $\Phi_S = \Phi_{SW} = 2300$ V, $R_2 = 0,61$; (D) $\Phi_S = \Phi_{SW} = 2100$ V, $R_2 = 0,98$; (E) $\Phi_S = \Phi_{SW} = 2000$ V, $R_2 = 1,19$. Détection : shutter = 30 ms, gain = 0, $L_{eff} = 70$ mm. Electrolyte : tampon borate de sodium 5 mM (pH 9,2). Echantillon : ombelliférone 10 mg/L dans l'électrolyte.

3.2 Etude du temps dynamique

Cette partie vise à optimiser la durée de l'étape d'expansion du mode d'injection dynamique. La Figure III-II-6 montre des photographies prises au laboratoire de microsystemes simple croix et double-T, lors des étapes de pincement ($R_1 = 0,2$) et d'expansion ($t_{dyn} = 1$ s, $\Phi_S = 800$ V). Il apparaît plus clairement sur la photographie du microsysteme simple croix qu'à l'issue de l'étape d'expansion l'échantillon rempli de façon dissymétrique l'intersection des canaux. Ce remplissage dissymétrique s'explique par la distribution des champs électriques. En effet, pendant cette étape, étant donné que les potentiels en B, BW et SW sont tous reliés à la masse et que la partie du canal de séparation présente entre BW et I (intersection des canaux) est plus grande que celle entre B et I, le champ électrique entre

BW et I ($E_{BW} = 38 \text{ V.cm}^{-1}$) est donc plus faible que le champ électrique entre B et I ($E_B = 331 \text{ V.cm}^{-1}$).

(A)



(B)

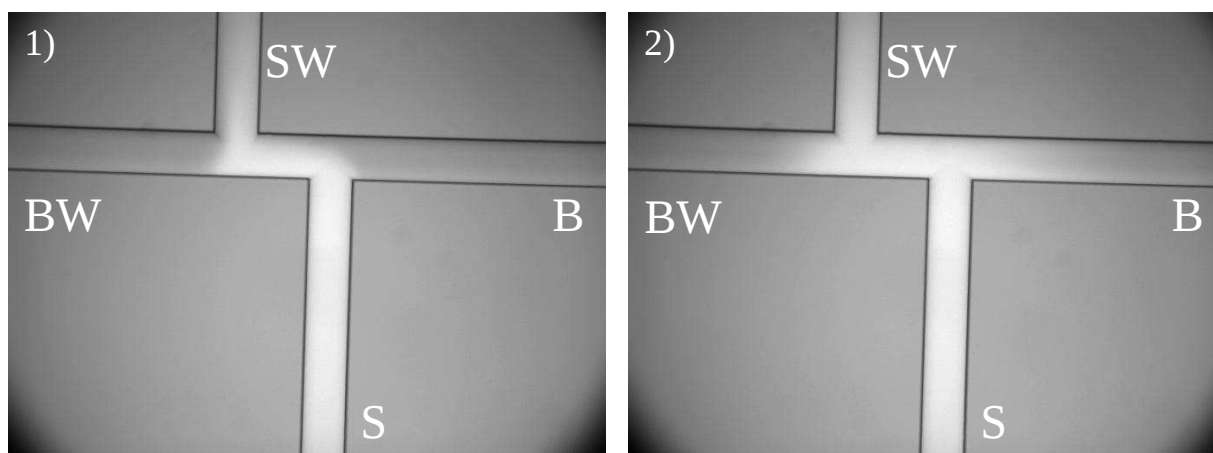


Figure III-II-6. Photographies de l'intersection d'un microsystème (A) simple croix et (B) double-T lors d'une injection dynamique. (1) étape d'échantillonnage : $\Phi_S = 823 \text{ V}$, $\Phi_{SW} = 0 \text{ V}$, $\Phi_B = 614 \text{ V}$, $\Phi_{BW} = 1631 \text{ V}$, $R_1 = 0,2$. (2) étape d'expansion : $t_{dyn} = 1 \text{ s}$, $\Phi_S = 800 \text{ V}$.

En mode d'injection dynamique, plus la durée de l'étape d'expansion est longue, c'est-à-dire plus le t_{dyn} est grand, et plus la longueur du créneau d'échantillon injecté est importante. Le t_{dyn} permet donc de moduler la quantité d'échantillon introduite dans le canal de séparation. Ainsi, après avoir optimisé l'intensité de retrait de l'échantillon, l'influence du t_{dyn} sur la quantité d'échantillon injectée et sur la variance associée au processus d'injection a été étudiée. Des injections dynamiques d'une solution d'ombelliférone ont été réalisées en faisant varier aléatoirement la valeur du t_{dyn} entre 0,5 et 3,5 s ($n = 3$). La Figure III-II-7 présente l'évolution des aires corrigées et des hauteurs du pic d'ombelliférone en fonction du t_{dyn} . Une augmentation linéaire des aires corrigées et donc des quantités d'ombelliférone

injectées avec le t_{dyn} a été obtenue avec un coefficient de corrélation R^2 de 0,998. Cela indique que l'étape intermédiaire d'expansion permet d'augmenter la taille de la zone échantillon avec une contribution non significative du phénomène de diffusion. Cette linéarité entre la quantité d'échantillon injectée et le t_{dyn} est également observée pour de très faibles durées d'expansion, démontrant qu'il est possible d'injecter de faibles quantités d'échantillon de façon contrôlée avec ce mode d'injection. Il apparaît également que les hauteurs évoluent de façon linéaire avec le t_{dyn} jusqu'à une valeur de 2,5 s. Au-delà d'une durée d'expansion de 2,5 s, les hauteurs évoluent moins vite avec le t_{dyn} , les pics ont donc tendance à s'élargir. Ce phénomène est dû à la contribution de la variance associée au processus d'injection ($\sigma^2_{\text{injection}}$) qui n'est alors plus négligeable par rapport à la variance totale des pics électrophorétiques.

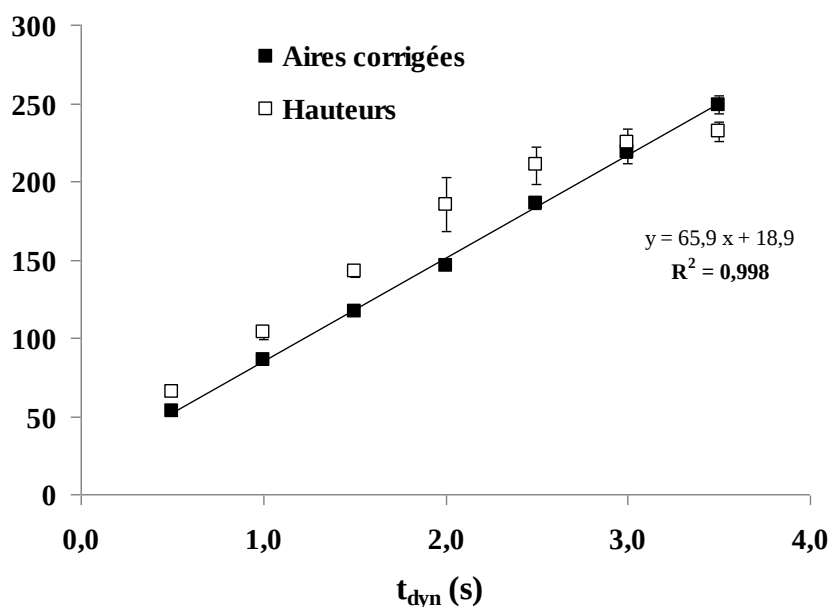


Figure III-II-7. Aires corrigées et hauteurs des pics pour des injections dynamiques d'ombelliférone en fonction de t_{dyn} ($n = 3$). Echantillonnage : $\Phi_S = 823$ V, $\Phi_{\text{SW}} = 0$ V, $\Phi_B = 614$ V, $\Phi_{\text{BW}} = 1631$ V, $R_1 = 0,2$, $t_{\text{ech}} = 1$ min. Expansion : $\Phi_S = 800$ V. Séparation : $\Phi_S = \Phi_{\text{SW}} = 2100$ V, $\Phi_B = 3000$ V, $\Phi_{\text{BW}} = 0$ V, $R_2 = 0,98$, $E_{\text{BW}} = 276$ V.cm⁻¹. Détection : shutter = 30 ms, gain = 0, $L_{\text{eff}} = 70$ mm. Electrolyte : tampon borate de sodium 5 mM (pH 9,2). Echantillon : ombelliférone 10 mg/L dans l'électrolyte.

L'évolution des valeurs d'efficacités des pics (Figure III-II-8) et du rapport signal/bruit (Figure III-II-9) confirme cette tendance. En effet, les valeurs des efficacités des pics sont globalement constantes pour des valeurs de t_{dyn} inférieures à 2,0 - 2,5 s. Au-delà, les efficacités chutent progressivement indiquant que la contribution de la variance associée à l'étape d'injection devient significative. La longueur du créneau d'échantillon au terme de l'étape d'expansion est alors trop importante. En effet, la contribution du processus

d'injection à la hauteur équivalente à un plateau théorique, H , peut être exprimée de la façon suivante :

$$H = \frac{L_{\text{échantillon}}^2}{K^2 l} \quad (\text{eq.4})$$

avec $L_{\text{échantillon}}$, la longueur du créneau d'échantillon le long de l'axe des abscisses, K , le facteur du profil d'injection et l , la longueur de séparation. Il apparaît donc clairement que pour un même profil d'injection, par exemple un créneau d'échantillon rectangulaire, si la contribution de l'injection n'est pas négligeable, la hauteur équivalente à un plateau théorique augmente avec le carré de la longueur du créneau d'échantillon. Par conséquent, une importance particulière doit être apportée à l'étape d'injection surtout à l'échelle miniaturisée qui nécessite d'injecter de grands volumes d'échantillon afin de pallier le manque de sensibilité.

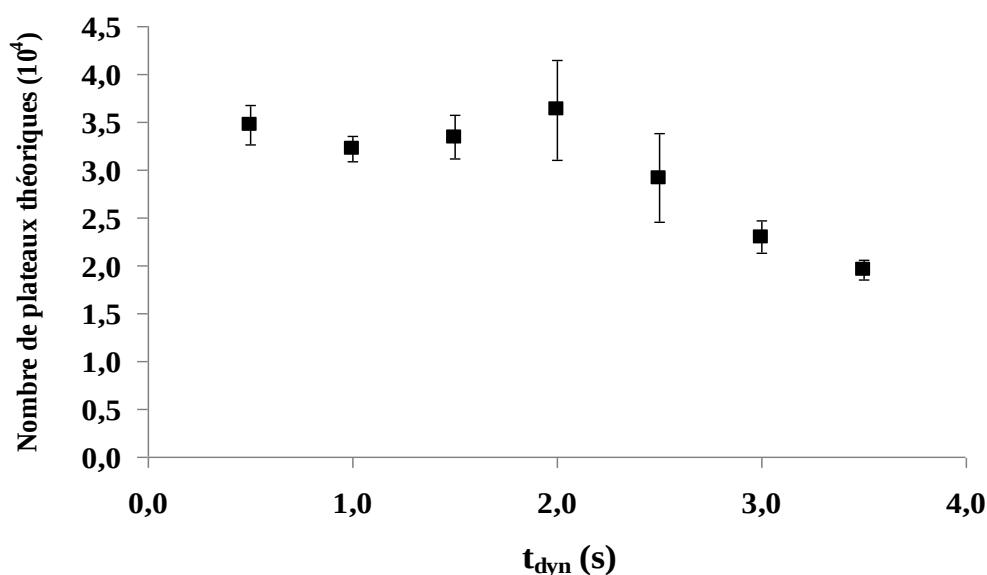


Figure III-II-8. Efficacités des pics pour des injections dynamiques d'ombelliférone en fonction de t_{dyn} ($n = 3$). Autres conditions : cf. Figure III-II-7.

De la même façon, les rapports signal/bruit augmentent linéairement avec le t_{dyn} jusqu'à 2,5 s puis tendent à se stabiliser lorsque la dispersion liée à l'injection ne devient plus négligeable. La Figure III-II-9 montre que la sensibilité a été multipliée par 5 entre une simple injection pincée ($t_{\text{dyn}} = 0$) et une injection dynamique avec une étape d'expansion de 2,5 s malgré une légère diminution des efficacités des pics. Finalement, un bon compromis en termes de quantités d'échantillon injectées, d'efficacités de pics et de rapport signal/bruit a été atteint pour un temps dynamique de 2,5 s. Cette valeur a donc été fixée pour la suite de l'étude. En

augmentant le t_{dyn} de 1 à 2,5 s, la LOQ de l'ombelliférone a été améliorée d'un facteur 2 et était alors estimée à 75 $\mu\text{g/L}$.

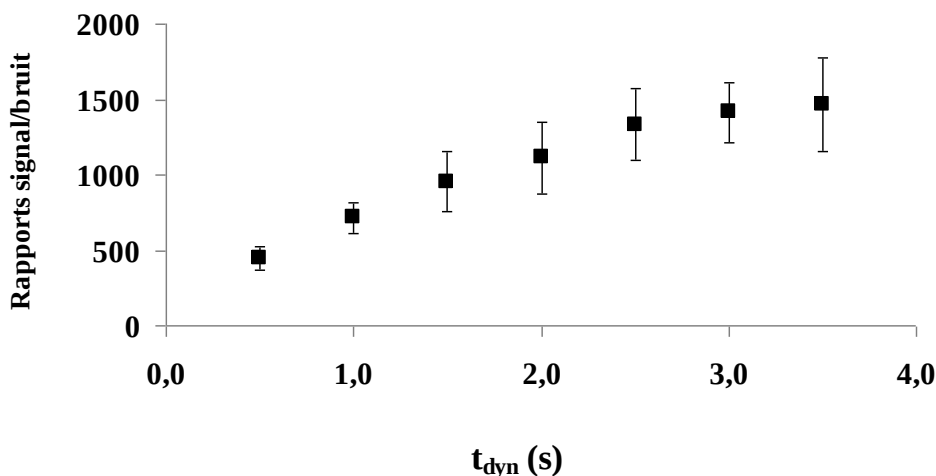


Figure III-II-9. Rapports signal/bruit pour des injections dynamiques d'ombelliférone en fonction de t_{dyn} ($n = 3$). Autres conditions : cf. Figure III-II-7.

Dans les conditions optimisées, la répétabilité du mode d'injection a été étudiée en réalisant 3 injections successives d'ombelliférone. Les coefficients de variation obtenus sont inférieurs à 3 % pour les aires corrigées et inférieurs à 0,6 % pour les temps de migration.

4. Optimisation de la sensibilité de la détection

Sur microsystème, la sensibilité de la détection est fonction à la fois des paramètres de la caméra, notamment la valeur du temps d'exposition du capteur et du gain électronique, et de la taille de la fenêtre de détection. L'influence de la taille de la fenêtre de détection sur la sensibilité n'a pas été évaluée. Une fenêtre de détection de 250 μm de longueur, le long du canal de séparation, et de largeur non contrôlée mais environ égale à la largeur du canal, c'est-à-dire 50 μm , a été utilisée pour l'intégralité de cette étude (Annexe B). Les paramètres de la caméra CCD ont, quant à eux, été optimisés.

4.1 Optimisation de la valeur du temps d'exposition du capteur

Dans les conditions d'injection précédemment optimisées ($R_1 = 0,2$, $R_2 = 0,98$ et $t_{\text{dyn}} = 2,5$ s), la valeur du temps d'exposition du capteur de la caméra CCD, encore appelée « shutter », a

été variée de façon aléatoire entre 50 et 400 ms. Trois mesures ont été réalisées par valeur de shutter. La variation des aires corrigées et des rapports signal/bruit en fonction de la valeur du shutter est représentée sur la Figure III-II-10.

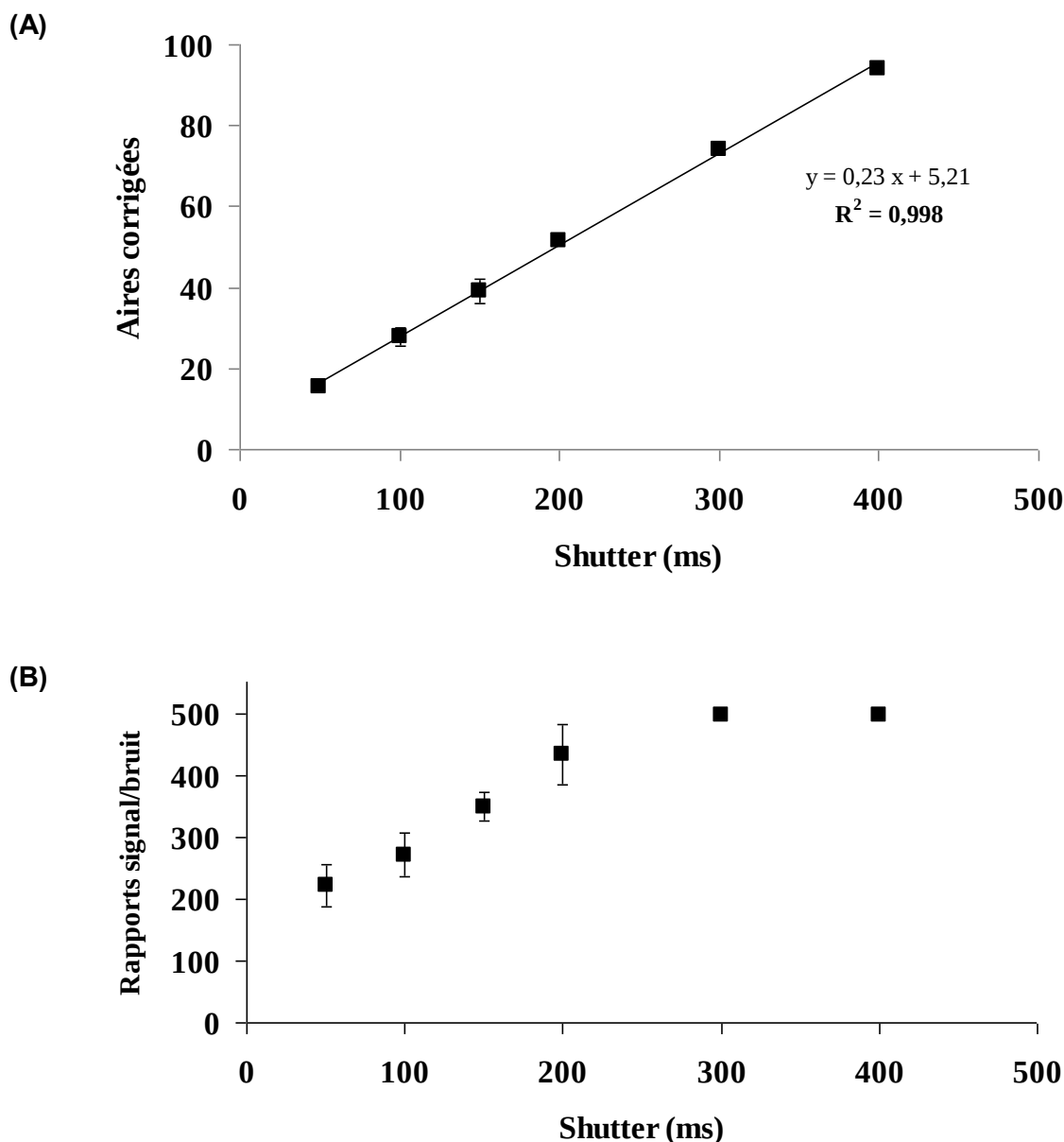


Figure III-II-10. (A) aires corrigées des pics et (B) rapports signal/bruit pour des injections dynamiques d'ombelliférone en fonction de la valeur du shutter de la caméra ($n = 3$). Echantillonnage : $\Phi_S = 823$ V, $\Phi_{SW} = 0$ V, $\Phi_B = 614$ V, $\Phi_{BW} = 1631$ V, $R_1 = 0,2$, $t_{ech} = 1$ min. Expansion : $t_{dyn} = 2,5$ s, $\Phi_S = 800$ V. Séparation : $\Phi_S = \Phi_{SW} = 2100$ V, $\Phi_B = 3000$ V, $\Phi_{BW} = 0$ V, $R_2 = 0,98$, $E_{BW} = 276$ V.cm⁻¹. Détection : gain = 0, $L_{eff} = 70$ mm. Electrolyte : tampon borate de sodium 5 mM (pH 9,2). Echantillon : ombelliférone 1 mg/L dans l'électrolyte.

Il est à noter que les aires corrigées évoluent de façon linéaire avec le temps d'exposition du capteur sur l'ensemble de la gamme étudiée. En effet, plus le temps d'exposition augmente et plus le signal de fluorescence reçu par le capteur est grand ce qui a pour conséquence d'augmenter les valeurs des aires. En revanche, les rapports signal/bruit, et donc la

sensibilité de la détection, varient linéairement avec la valeur du shutter jusqu'à une valeur seuil de 200 ms. Ensuite, la stabilisation du rapport signal/bruit démontre un phénomène de saturation du capteur. L'objectif étant d'accroître au maximum la sensibilité de la détection, une valeur de shutter de 300 ms paraissait optimale. Néanmoins, il paraît évident que plus le temps d'exposition du capteur augmente et plus la fréquence d'acquisition, c'est-à-dire le nombre de point par pic, diminue. Or, en sciences séparatives, il est considéré qu'un nombre minimum de 20 points par pic est nécessaire pour une bonne définition du pic chromatographique. De façon expérimentale, il a été constaté que la valeur de shutter critique, au-dessus de laquelle le nombre de points par pic était inférieur à 20, était de 150 ms. Un temps d'exposition du capteur de la caméra CCD de 150 ms a donc été retenu pour la suite de ce travail. L'optimisation de la valeur du shutter a permis d'améliorer la LOQ de l'ombelliférone jusqu'à une valeur de 30 µg/L environ, valeur alors très proche de celle obtenue en CE.

4.2 Optimisation de la valeur du gain électronique

De la valeur du gain électronique dépend directement la valeur finale d'un pixel. Ainsi, l'augmentation de la valeur du gain, jusqu'à présent fixé à 0, devrait permettre d'amplifier le signal. Différentes valeurs du gain électronique ont donc été testées aléatoirement entre 0 et 200 pour des injections dynamiques d'ombelliférone. Pour chaque valeur de gain, l'analyse a été répétée 3 fois. Comme attendu, la droite représentée en Figure III-II-11A, de coefficient de corrélation 0,997, démontre que les aires corrigées évoluent de façon linéaire avec le gain. En revanche, le graphe de la Figure III-II-11B démontre une dégradation des rapports signal/bruit pour des valeurs de gain croissantes : lors d'une augmentation de la valeur du gain électronique, le bruit de fond de l'analyse croît plus rapidement que le signal. Par conséquent, un gain de 0 a été maintenu pour les prochaines expériences.

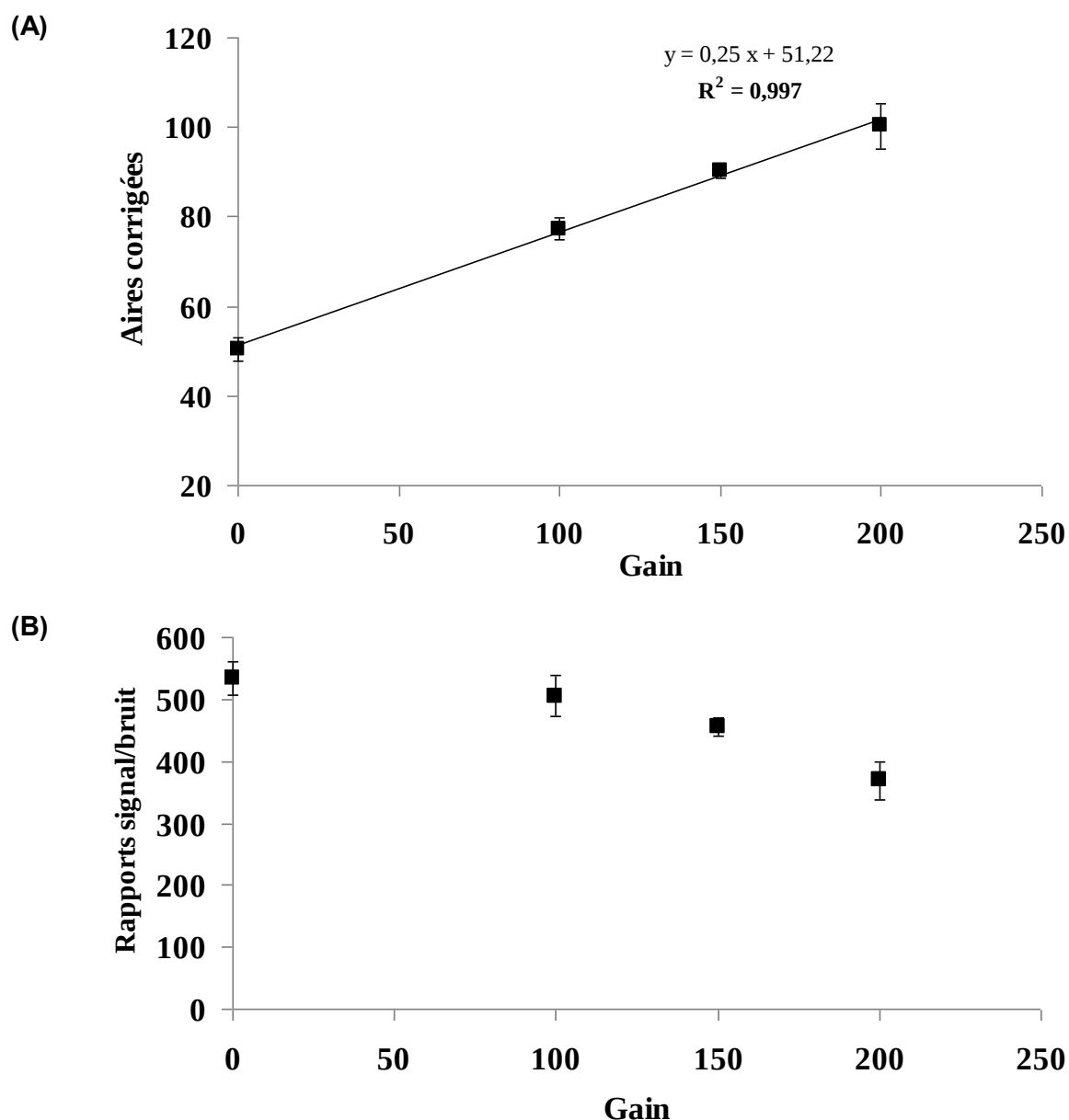


Figure III-II-11. (A) aires corrigées des pics et (B) rapports signal/bruit pour des injections dynamiques d'ombelliférone en fonction de la valeur du gain électronique de la caméra ($n = 3$). Echantillonnage : $\Phi_S = 823$ V, $\Phi_{SW} = 0$ V, $\Phi_B = 614$ V, $\Phi_{BW} = 1631$ V, $R_1 = 0,2$, $t_{ech} = 1$ min. Expansion : $t_{dyn} = 2,5$ s, $\Phi_S = 800$ V. Séparation : $\Phi_S = \Phi_{SW} = 2100$ V, $\Phi_B = 3000$ V, $\Phi_{BW} = 0$ V, $R_2 = 0,98$, $E_{BW} = 276$ V.cm⁻¹. Détection : shutter = 150 ms, $L_{eff} = 70$ mm. Electrolyte : tampon borate de sodium 5 mM (pH 9,2). Echantillon : ombelliférone 1 mg/L dans l'électrolyte.

5. Transposition des conditions de séparation des HAP optimisées sur capillaire au format microsysteme

5.1 Etude du retrait

Dans les conditions d'injection et de détection préalablement déterminées, des injections dynamiques d'ombelliférone ont été réalisées en présence de l'électrolyte optimisé en CE pour la séparation des HAP. Un tampon borate de sodium à 10 mM (pH 9,2) en présence de 600 mM d'urée, de 14,8 mM de SBE- β -CD, de 20,4 mM de Me- β -CD et de 11,2 % de MeOH (v/v) a donc été testé sur microsystèmes. Dès les premières analyses, des fuites importantes de l'échantillon dans le canal de séparation ont démontré que l'intensité de retrait précédemment optimisée pour un tampon borate à 5 mM ($R_2 = 0,98$), n'était alors plus suffisante. En présence du nouvel électrolyte, l'écoulement électroosmotique est alors trop faible pour assurer un retrait satisfaisant de l'échantillon dans le canal d'échantillonnage pendant l'étape de séparation. Cette diminution de l'écoulement électroosmotique est principalement due à une augmentation de la force ionique de l'électrolyte expliquée par une concentration plus élevée en tampon borate et par l'ajout de CD anioniques. En effet, la force ionique a été estimée à 93,8 mM pour l'électrolyte à base de CD contre 2,5 mM pour le tampon borate 5 mM. Les mobilités électroosmotiques étant inversement proportionnelles aux racines carrées des forces ioniques, la diminution de l'écoulement électroosmotique a donc été estimée à 84 % lors du passage aux conditions optimisées (Annexe E). De plus, à l'effet de la force ionique vient s'ajouter l'augmentation de la viscosité provenant de l'ajout de CD neutres, d'urée et de MeOH, qui a pour conséquence de diminuer davantage la mobilité électroosmotique. La Figure III-II-12 met en évidence l'effet du changement d'électrolyte sur l'analyse de l'ombelliférone ainsi que l'efficacité d'un conditionnement à la soude entre deux analyses. Ainsi, les temps de migration ont été plus que doublés tandis que les quantités injectées ont été divisées par 2. De plus, dans les conditions optimisées, un phénomène de fuite de l'échantillon dans le canal de séparation accompagné d'une augmentation des temps de migration a été identifié dès la deuxième analyse. Ces observations concordent tout à fait avec un écoulement électroosmotique trop faible. Par conséquent, afin d'activer les canaux du microsysteme, des rinçages successifs avec de la soude 1 M (5 min), de la soude 0,1 M (5 min), de l'eau (5 min) et de l'électrolyte (10 min) ont été réalisés sous 1 bar. Comme démontré sur la Figure III-II-12, après passage de la soude, le temps de migration chute d'environ 35 %, la quantité d'échantillon injectée augmente d'environ 45 % et les fuites disparaissent. Cependant, dès l'analyse suivante, le phénomène de fuite est réapparu avec une augmentation simultanée du temps de sortie de l'ombelliférone laissant penser que

l'écoulement électroosmotique était redevenu trop faible pour assurer le retrait de l'échantillon. Dans certains cas, un mauvais retrait a été observé dès la première analyse suivant le conditionnement à la soude : l'intensité de retrait appliquée jusqu'alors ($R_2 = 0,98$) devait donc être augmentée.

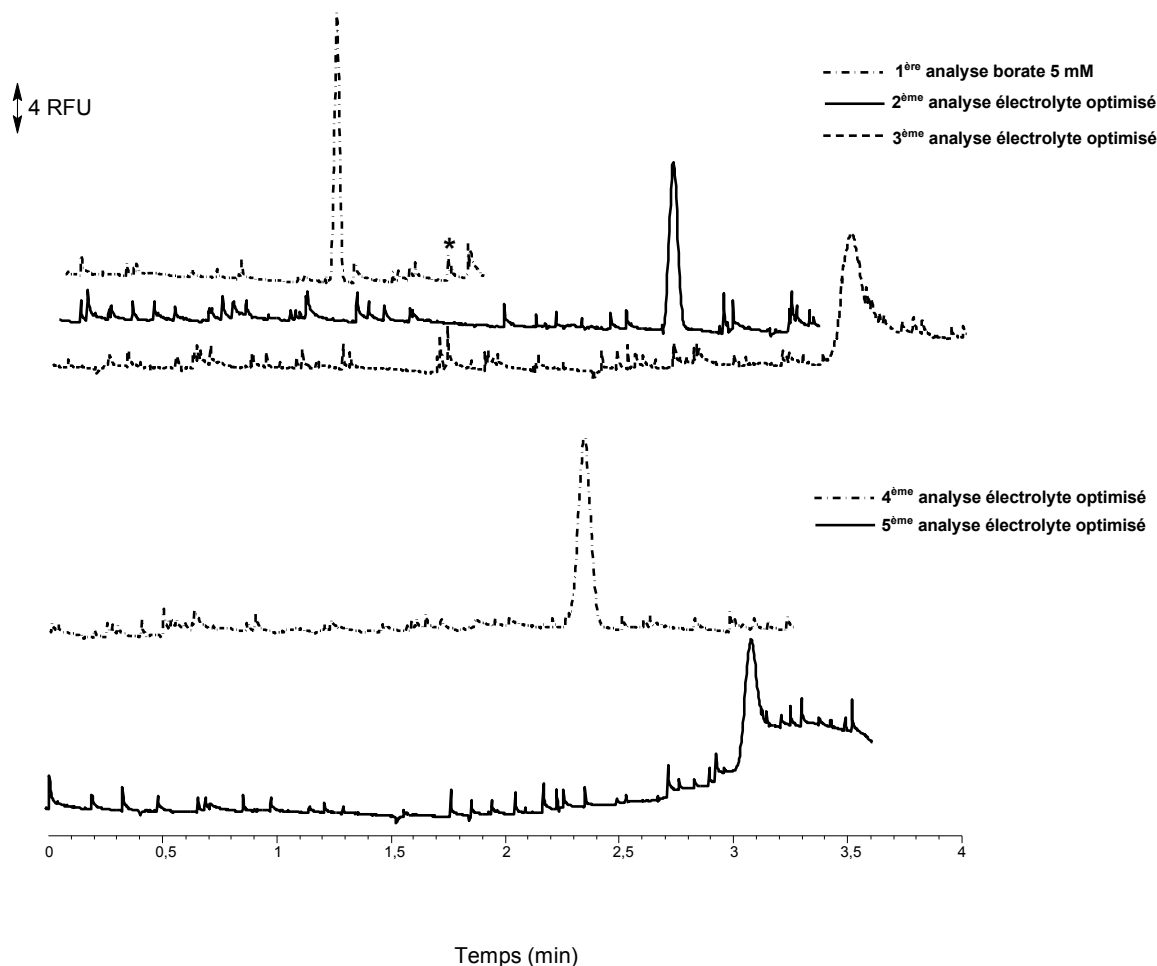


Figure III-II-12. Electrophérogrammes de 5 injections dynamiques successives d'ombelliférone avec un rinçage du microsystème à la soude entre les analyses 3 et 4. Echantillonnage : $\Phi_S = 823$ V, $\Phi_{SW} = 0$ V, $\Phi_B = 614$ V, $\Phi_{BW} = 1631$ V, $R_1 = 0,2$, $t_{ech} = 1$ min. Expansion : $t_{dyn} = 2,5$ s, $\Phi_S = 800$ V. Séparation : $\Phi_S = \Phi_{SW} = 2100$ V, $\Phi_B = 3000$ V, $\Phi_{BW} = 0$ V, $R_2 = 0,98$, $E_{BW} = 276$ V.cm⁻¹. Détection : shutter = 150 ms, gain = 0, $L_{eff} = 70$ mm. 1^{ère} analyse : tampon borate de sodium 5 mM (pH 9,2), de la 2^{ème} à la 5^{ème} analyse : tampon borate de sodium 10 mM avec 600 mM d'urée, 14,8 mM de SBE- β -CD, 20,4 mM de Me- β -CD dans un mélange eau/MeOH en proportions 88,8:11,2 (v/v). Echantillon : ombelliférone 1 mg/L dans l'électrolyte. *Pics parasites provenant du vieillissement de la lampe à vapeur de mercure.

Plusieurs intensités de retrait comprises entre 1,19 et 3,22 ont donc été testées en faisant varier les potentiels aux réservoirs S et SW entre 2000 et 1300 V tout en maintenant le réservoir B à un potentiel de 3000 V. Une intensité de retrait de 2,52, obtenue en appliquant 1500 V en S et SW, s'est avérée être le meilleur compromis entre la fréquence des fuites (toutes les 4 injections en moyenne) et les quantités injectées. En effet, pour des valeurs de R_2 supérieures à 2,52, les quantités injectées deviennent faibles avec des fuites toujours

aussi régulières (toutes les 4 analyses en moyenne). Néanmoins, en augmentant l'intensité de retrait de 0,98 à 2,52, il devient possible de réaliser entre 3 et 5 expériences à la suite avant l'apparition de perturbations de la ligne de base. La Figure III-II-13 présente les électrophérogrammes obtenus pour 7 injections dynamiques d'ombelliférone, en présence de l'électrolyte optimisé et en imposant un R_2 de 2,52. Le microsysteme a été activé à la soude (5 min de NaOH 1 M, 5 min de NaOH 0,1 M, 5 min d'eau et 5 min d'électrolyte sous 1 bar) uniquement avant la première analyse et entre les analyses 6 et 7, tandis qu'entre chaque analyse de la séquence une remise à niveau des liquides dans les réservoirs a été effectuée. Ces acquisitions ont été réalisées après avoir remplacé la lampe à vapeur de mercure ce qui explique l'absence de pics parasites en comparaison avec les analyses présentées sur la Figure III-II-12.

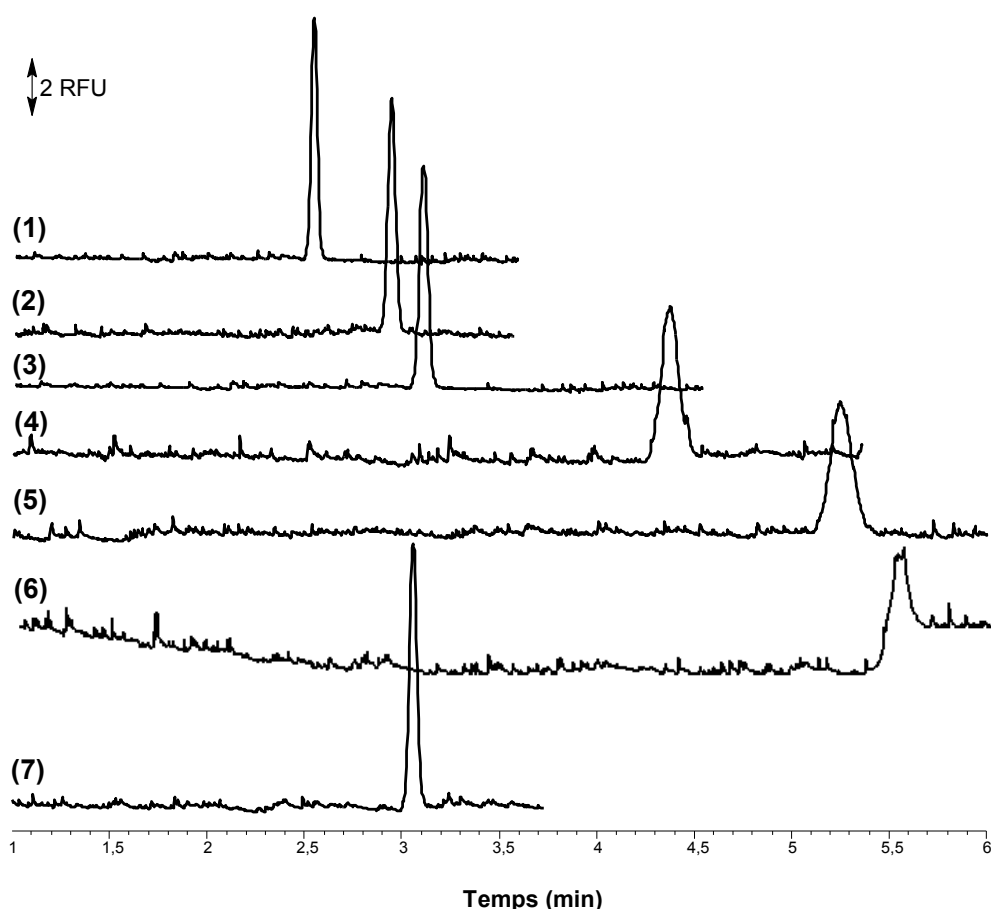


Figure III-II-13. Electrophérogrammes représentant 7 injections dynamiques d'ombelliférone successives avec un rinçage du microsysteme à la soude avant la 1ère analyse et entre les analyses (6) et (7). Echantillonnage : $\Phi_S = 823$ V, $\Phi_{SW} = 0$ V, $\Phi_B = 614$ V, $\Phi_{BW} = 1631$ V, $R_1 = 0,2$, $t_{ech} = 1$ min. Expansion : $t_{dyn} = 2,5$ s, $\Phi_S = 800$ V. Séparation : $\Phi_S = \Phi_{SW} = 1500$ V, $\Phi_B = 3000$ V, $\Phi_{BW} = 0$ V, $R_2 = 2,52$, $E_{BW} = 218$ V.cm⁻¹. Détection : shutter = 150 ms, gain = 0, $L_{eff} = 70$ mm. Electrolyte : tampon borate de sodium 10 mM avec 600 mM d'urée, 14,8 mM de SBE- β -CD, 20,4 mM de Me- β -CD dans un mélange eau/MeOH en proportions 88,8:11,2 (v/v). Echantillon : ombelliférone 500 μ g/L dans l'électrolyte.

L'augmentation de l'intensité de retrait n'ayant pas remédié définitivement aux problèmes de fuites d'échantillon, d'autres conditions du plan d'expériences ont été testées. L'objectif était de travailler avec un électrolyte de viscosité et force ionique plus faibles afin d'augmenter la mobilité électroosmotique et ainsi diminuer les phénomènes de fuites d'échantillon. De plus, un tel électrolyte devait permettre d'augmenter les champs électriques appliqués tout en maintenant une valeur correcte de courant, ce qui aurait pour conséquence de diminuer le temps d'analyse. Pour cela, les 174 conditions pour lesquelles les intervalles de temps entre tous les couples de pics possibles, constitués d'au moins un des 8 HAP prioritaires, étaient supérieurs à 0, ont été classées par intervalles de temps minimums prédits décroissants. Le premier électrolyte dont la concentration en SBE- β -CD était inférieure à 10 mM (valeur codée inférieure à 0) avec la concentration en Me- β -CD inférieure à 20 mM, a été sélectionné. Ce point était de -0,2 pour [SBE- β -CD] (9,4 mM), -1 pour [Me- β -CD] (12 mM) et -1,4 pour %MeOH (11,2 %). En reprenant la méthodologie de calcul développée en Annexe E, la force ionique de ce nouvel électrolyte a été estimée à 61,1 mM. Une diminution de 35 % de la force ionique par rapport au point optimum prédit par le modèle induit donc une augmentation de la mobilité électroosmotique de 24 %. Dans ces nouvelles conditions, lors d'injections d'ombelliférone en séquence, les fuites d'échantillon étaient aussi fréquentes indiquant que la diminution en force ionique et en viscosité de l'électrolyte ne permet pas de maintenir un écoulement électroosmotique suffisant pour assurer le retrait de l'échantillon dans le canal d'échantillonnage pendant une séquence d'analyses.

5.2 Etude de l'écoulement électroosmotique

Le Tableau III-II-1 regroupe les valeurs calculées des mobilités électroosmotiques pour les 7 injections d'ombelliférone présentées en Figure III-II-13 ci-dessus. Elles ont été déterminées à partir de la mobilité apparente de l'ombelliférone calculée sur microsystèmes et de sa mobilité électrophorétique calculée en format capillaire dans les mêmes conditions d'électrolyte ($\mu_{ep} = -10,0 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). En effet, la mobilité électroosmotique n'a pas pu être directement calculée sur microsystèmes puisqu'aucun composé à la fois neutre, sans interaction avec la CD anionique et fluorescent dans les conditions de détection n'a pu être utilisé comme marqueur. De plus, la composition en solvant de l'échantillon étant la même que celle de l'électrolyte, aucun pic négatif n'apparaît en début d'électrophérogramme contrairement à ceux détectés en CE, lors du passage de l'ACN de l'échantillon devant le détecteur. Par conséquent, la méthode de détermination de la mobilité électroosmotique utilisée sur capillaire n'a pas été applicable aux microsystèmes.

Il peut être constaté que pour cette séquence d'analyses, la mobilité électroosmotique a légèrement diminué lors des 3 premières analyses (diminution de 12 %). En revanche, entre la 3^{ème} et la 4^{ème} analyse, elle a chuté brutalement de 20 % environ, puis a continué de diminuer progressivement jusqu'à la 6^{ème} analyse pour laquelle des fuites d'échantillon ont été observées. Sur l'ensemble des 6 analyses successives, l'écoulement électroosmotique a donc été abaissé de plus de 35 %. Un conditionnement à la soude entre les analyses 6 et 7 a alors permis d'augmenter la valeur de l'écoulement de presque 40 % et de retrouver une valeur d'écoulement satisfaisante ($\mu_{eof} = 27,5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). De plus, étant donné la gamme des mobilités électrophorétiques des 8 HAP prioritaires, allant de $-11,2 \times 10^{-5}$ à $-25,3 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, une mobilité électroosmotique supérieure à $25,3 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ est nécessaire pour pouvoir détecter le composé le plus retardé : le BghiP (Tableau III-II-2). Par conséquent, à la vue des faibles valeurs des mobilités électroosmotiques générées au sein des microsystèmes et de leur rapide diminution au cours d'une séquence, une activation à la soude par jour n'était alors plus suffisante. Pour la suite de cette étude, il a donc été envisagé de réaliser un conditionnement à la soude entre chaque analyse. Ainsi, dans ces nouvelles conditions, la mobilité électroosmotique a pu être évaluée sur microsystèmes à $(30,0 \pm 0,2) \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ($n = 3$), valeur très proche de celle déterminée en CE qui s'élevait alors à $(31,6 \pm 0,4) \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ($n = 3$).

Tableau III-II-1. Mobilités électroosmotiques (μ_{eof}) à 25°C environ, calculées sur microsystèmes pour 7 injections dynamiques d'ombelliférone successives avec un rinçage à la soude (5 min de NaOH 1 M, 5 min de NaOH 0,1 M, 5 min d'eau et 5 min d'électrolyte sous 1 bar) avant la 1^{ère} injection et entre les analyses 6 et 7. Autres conditions : voir Figure III-II-13.

Analyse	$\mu_{eof} (10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$
1	31,1
2	28,3
3	27,3
4	22,3
5	20,2
6	19,7
7	27,5

Tableau III-II-2. Mobilités électrophorétiques (μ_{ep}) à 25°C des 8 HAP prioritaires calculées en CE. Autres conditions : voir Figure III-II-1.

HAP	$\mu_{ep} (10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$
DBahA	-11,2
CHR	-16,1
BaA	-16,8
BkFA	-18,7
BaP	-21,2
BbFA	-22,8
IP	-23,2
BghiP	-25,3

5.3 Séparation et détection des HAP

Afin de transposer les conditions opératoires optimisées précédemment à l'analyse des HAP, les premiers essais ont été menés avec le BkFA ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ de 310 nm/420 nm, Annexe F), de part ses propriétés de fluorescence aux longueurs d'onde imposées (λ_{exc} entre 330 et 385 nm) et sa valeur de mobilité électrophorétique située au milieu de la gamme étudiée (Tableau III-II-2). Dans les mêmes conditions d'écoulement électroosmotique ($\mu_{eof} = 30,0 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) et de champ électrique de séparation ($E_{BW} = 218 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$) que précédemment et à partir des expériences en format capillaire, le temps de migration du BkFA a été estimé à environ 4,7 min pour une longueur effective (distance entre le point de détection et l'intersection des canaux) de 70 mm. Afin d'augmenter la rapidité des analyses mais aussi d'être moins sensible aux écoulements hydrodynamiques parasites, l'intensité de ces écoulements parasites étant proportionnelle au temps d'analyse (Annexe C), la longueur effective a été fixée à 15 mm pour les premiers tests. Dans ce cas, le temps de migration du BkFA a été évalué à environ 1 min. En effet, sur microsysteme, il est possible de déplacer le point de détection dans les directions x et y via la platine du microscope. Il est donc possible de décaler le point de détection tout au long du canal de séparation. Dans les conditions optimales déterminées précédemment, le BkFA a été injecté en mode dynamique. Le temps de migration du BkFA obtenu sur microsysteme était de 1,2 min, valeur légèrement supérieure à celle prédite à partir de la CE (1 min) mais qui reste néanmoins tout à fait cohérente (Figure III-II-14). Cette faible augmentation du temps de sortie du BkFA s'explique par une diminution de la mobilité électroosmotique. En effet, l'écoulement calculé expérimentalement ($28,3 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) était plus faible que celui attendu ($30,0 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Sa LOQ a été évaluée à environ 700 $\mu\text{g/L}$ (Figure III-II-14A) ; valeur 70 fois moins bonne que celle estimée en CE avec le laser He/Cd ($\lambda_{exc} = 325 \text{ nm}$).

Dans le but d'améliorer la sensibilité de la détection, une autre source lumineuse ayant fait l'objet d'un prêt par la société Olympus a été testée (Metal Halide Illumination System, X-

cite® 120Q). Cette lampe avait une puissance légèrement supérieure (120 W) à celle de la lampe à vapeur de mercure (100 W) et surtout présentait un spectre de longueurs d'onde d'émission plus riche que celui de la lampe à mercure, permettant de mieux exciter les espèces fluorescentes (Annexe B, Figure B-2). En couplant ce nouveau système de détection, la LOQ du BkFA a été abaissée à environ 350 µg/L (Figure III-II-14B). Pour ce composé, un gain en sensibilité d'un facteur 2 a donc pu être atteint en présence de la source d'excitation Metal Halide.

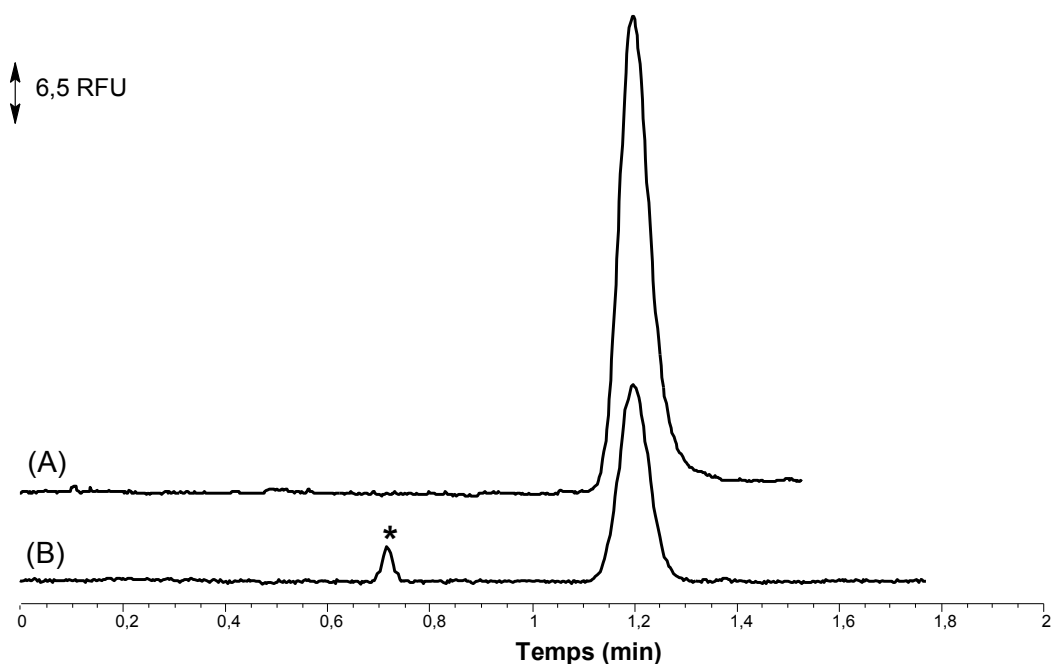


Figure III-II-14. Injections dynamiques du BkFA sur microsystème. Echantillonnage : $\Phi_S = 823$ V, $\Phi_{SW} = 0$ V, $\Phi_B = 614$ V, $\Phi_{BW} = 1631$ V, $R_1 = 0,2$, $t_{ech} = 1$ min. Expansion : $t_{dyn} = 2,5$ s, $\Phi_S = 800$ V. Séparation : $\Phi_S = \Phi_{SW} = 1500$ V, $\Phi_B = 3000$ V, $\Phi_{BW} = 0$ V, $R_2 = 2,52$, $E_{BW} = 218$ V.cm⁻¹. Détection : (A) lampe à mercure, (B) lampe Metal Halide (source X-cite® 120Q), shutter = 150 ms, gain = 0, $L_{eff} = 15$ mm. Température : ambiante (système non-thermostaté). Electrolyte : tampon borate de sodium 10 mM avec 600 mM d'urée, 14,8 mM de SBE-β-CD, 20,4 mM de Me-β-CD dans un mélange eau/MeOH en proportions 88,8:11,2 (v/v). Echantillon : BkFA (A) 5 mg/L dans l'électrolyte et (B) 1 mg/L dans l'électrolyte. *pic d'ombelliférone provenant d'une contamination du réservoir échantillon.

Dans les mêmes conditions opératoires, les 8 HAP prioritaires, dont les spectres de fluorescence sont présentés en Annexe F, ont été injectés individuellement. En présence de la lampe Metal Halide, seulement 2 HAP supplémentaires ont pu être détectés à une concentration inférieure à 10 mg/L : le BaP ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ de 296 nm/416 nm) et le BbFA ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ de 300 nm/440 nm). Pour les 5 autres HAP (DBaH ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ de 285 nm/415 nm), CHR ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ de 260 nm/390 nm), BaA ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ de 260 nm/390 nm), IP ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ de 247 nm/395 nm) et BghiP ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ de 295 nm/420 nm)), des problèmes de précipitation sont apparus à des teneurs supérieures à 10 mg/L dans l'électrolyte, ils n'ont donc pas pu être détectés. Cela s'explique par des intensités de fluorescence globalement plus faibles en

comparaison de celles du BkFA, BaP et BbFA. De plus, les longueurs d'onde d'excitation optimales de ces 5 HAP sont trop basses pour qu'ils puissent être détectés aux longueurs d'onde d'excitation imposées, c'est-à-dire entre 330 et 385 nm. Afin d'augmenter le nombre de HAP analysés sur microsystème, les 11 HAP non prioritaires ont eux aussi été injectés individuellement, dans les conditions opératoires optimisées précédemment. Seul 1 HAP, le FA ($\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$ de 360 nm/460 nm), a pu être détecté à des concentrations compatibles avec une mise en solution dans l'électrolyte. Sur microsystème, seulement 4 HAP en tout ont pu être détectés en plus de l'ombelliférone. Ainsi, ces 5 composés ont été injectés en mélange dans les conditions d'injection, de séparation et de détection précédemment déterminées. La séparation obtenue en positionnant le point de détection à 30 mm de l'intersection des canaux est présentée en Figure III-II-15. Les 4 HAP sont séparés en présence de l'ombelliférone, en moins de 4 min avec des résolutions supérieures à 2,0. Cependant, la résolution de 2,2 déterminée sur microsystème pour les couples BkFA/FA et BaP/BbFA est plus de 2 fois plus faible que celle attendue par extrapolation des résultats obtenus au format capillaire ($R_s \approx 5$, équation 3). Cela s'explique par les faibles valeurs d'efficacités de pics calculées (respectivement $0,7 \times 10^4$, $0,6 \times 10^4$, $0,5 \times 10^4$ et $0,5 \times 10^4$ nombre de plateaux théoriques pour BkFA, FA, BaP et BbFA). En revanche, concernant la paire FA/BaP, la résolution calculée sur microsystème ($R_s = 2,3$) s'est avérée être supérieure à celle prédite à partir des résultats en CE ($R_s \approx 1,7$).

Il est important de souligner que les conditions d'injection (t_{dyn}) et de détection (shutter et gain) ont été optimisées en présence d'un tampon borate et pour une longueur effective de 70 mm. Or, les HAP ont été analysés en mettant en œuvre l'électrolyte optimisé par le plan d'expériences et des longueurs de séparation plus courtes : 15 mm pour le BkFA seul et 30 mm pour le mélange des 4 HAP. La mobilité électroosmotique de l'électrolyte optimisé étant plus faible que celle du tampon borate, les quantités injectées sont, elles aussi, plus faibles. Dans ce cas, le volume maximal qu'il est possible d'injecter sans générer de pertes d'efficacité n'est peut être pas atteint. Par conséquent, une augmentation du t_{dyn} permettrait sans doute d'améliorer les LOQ des HAP. A l'inverse, aux longueurs de séparation fixées pour la détection des HAP, le volume d'échantillon injecté pourrait être devenu trop grand. Cela expliquerait, en partie, les faibles efficacités obtenues. Dans ce cas, une diminution du t_{dyn} serait alors requise pour retrouver des valeurs correctes d'efficacité de pics. Par ailleurs, étant donné la largeur des pics obtenus en présence de l'électrolyte à base de cyclodextrines, le temps d'exposition de la caméra devrait pouvoir être augmenté, ce qui améliorerait davantage la LOQ des HAP. Pour l'analyse des HAP sur microsystèmes, les quantités injectées et les paramètres de la détection devront donc être ré-optimisés. Néanmoins, la sensibilité de la détection est sans doute le facteur limitant qu'il faudra

nécessairement optimiser par la suite. Dans le cadre de ce travail, ces améliorations n'ont pas pu être entreprises par manque de temps.

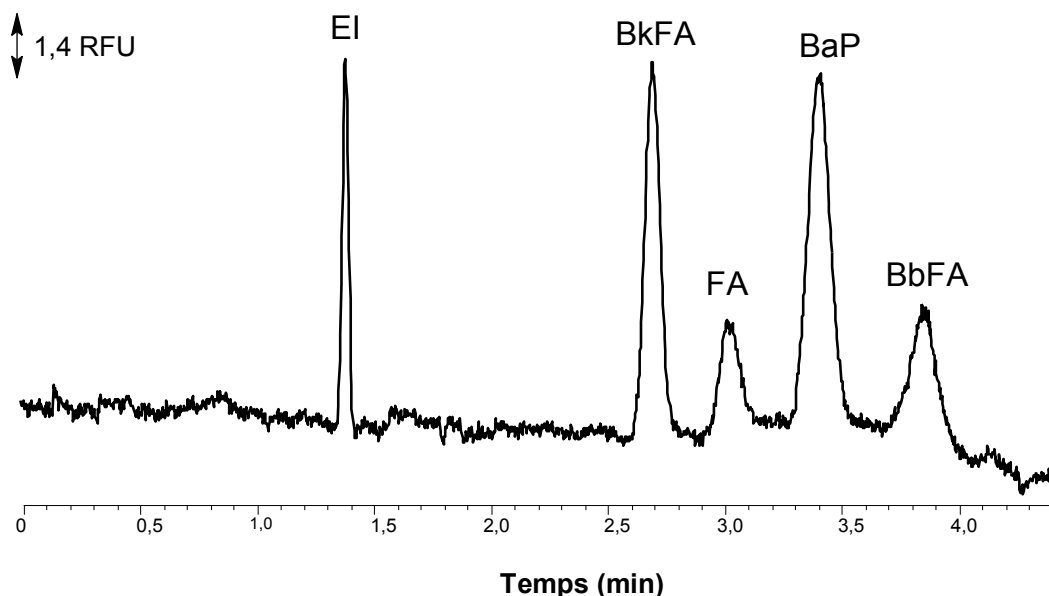


Figure III-II-15. Séparation d'un mélange de 4 HAP plus l'ombelliférone (étalon interne, EI) en microsystème. Echantillonnage : $\Phi_S = 823$ V, $\Phi_{SW} = 0$ V, $\Phi_B = 614$ V, $\Phi_{BW} = 1631$ V, $R_1 = 0,2$, $t_{ech} = 1$ min. Expansion : $t_{dyn} = 2,5$ s, $\Phi_S = 800$ V. Séparation : $\Phi_S = \Phi_{SW} = 1500$ V, $\Phi_B = 3000$ V, $\Phi_{BW} = 0$ V, $R_2 = 2,52$, $E_{BW} = 218$ V.cm⁻¹. Détection : lampe Metal Halide, shutter = 150 ms, gain = 0, $L_{eff} = 30$ mm. Température : ambiante (système non-thermostaté). Electrolyte : tampon borate de sodium 10 mM avec 600 mM d'urée, 14,8 mM de SBE- β -CD, 20,4 mM de Me- β -CD dans un mélange eau/MeOH en proportions 88,8:11,2 (v/v). Echantillon : EI, 100 μ g/L ; BkFA, 1,5 mg/L ; FA, 2 mg/L ; BaP, 2 mg/L et BbFA, 2 mg/L dans l'électrolyte.

CONCLUSION

L'objectif initial de ces travaux était de développer une méthode de séparation des 8 HAP, classés en tant que polluants prioritaires dans les matrices environnementales et alimentaires, sur un microsystème électrophorétique. Pour cela, les données générées par le plan d'expériences de la PARTIE II ont été retraitées en enlevant certaines contraintes, ce qui a permis de déterminer de nouvelles conditions optimales pour la séparation des 8 composés au format miniaturisé.

Pour une prise en main plus aisée du dispositif expérimental, les premiers tests sur microsystèmes ont été réalisés avec l'ombelliférone en présence d'un tampon borate 5 mM à un pH de 9,2. Dans ces conditions, l'intensité de retrait minimale à appliquer pendant l'étape de séparation afin d'éviter des phénomènes de fuites d'échantillon dans le canal de séparation, a été évaluée à 0,98. Puis, étant donné la faible sensibilité du système microscope inversé, lampe à mercure et caméra CCD, utilisé pour la détection sur puce au laboratoire, les études suivantes ont consisté à optimiser les quantités d'échantillon injectées via la durée de l'étape d'expansion du mode d'injection dynamique et la sensibilité de la détection via le temps d'exposition du capteur et le gain électronique de la caméra. A l'issue de ces étapes d'optimisation, la LOQ de l'ombelliférone estimée sur le microsystème (30 µg/L), était devenue similaire à celle évaluée en CE (20 µg/L).

L'électrolyte optimisé par le plan d'expériences a ensuite été testé pour des injections dynamiques d'ombelliférone dans les conditions d'injection, de séparation et de détection préalablement déterminées. De part la viscosité et la force ionique élevées de cet électrolyte, l'écoulement électroosmotique s'est avéré trop faible pour assurer un bon retrait de l'échantillon dans le canal d'échantillonnage pendant l'analyse. L'intensité de retrait a donc dû être augmentée à 2,52. De plus, il a été démontré qu'un conditionnement à la soude entre chaque analyse était nécessaire pour atteindre de bonnes répétabilités de la mobilité électroosmotique.

Enfin, dans les conditions opératoires retenues, les 8 HAP de l'étude ont été injectés individuellement et parmi eux, seulement 3 HAP : le BkFA, le BaP et le BbFA, ont été détectés. Afin d'augmenter le nombre de composés étudiés, les 11 autres HAP ciblés en CE ont également été analysés mais un seul, le FA, a pu être détecté. Toutefois, dans les conditions optimales prédites par le plan d'expériences, ces 4 composés ont été séparés en présence de l'ombelliférone en moins de 4 min avec des résolutions supérieures à 2,0. Ces résultats permettent donc de prouver la faisabilité de la séparation des HAP sur microsystèmes.

Néanmoins, les valeurs des LOQ devront être améliorées en ré-optimisant tout d'abord les paramètres d'injection et de détection, puis en améliorant la sensibilité du système de détection. Il pourrait alors être envisagé de coupler au microsystème, soit le laser He-Cd, utilisé pour les analyses au format capillaire, soit une diode électroluminescente, ce qui aurait pour avantage certain de progresser dans une logique de miniaturisation.

References

- [1] A. Manz, N. Graber, H.M. Widmer, *Sens. Actuators, B* 1 (1990) 244-248.
- [2] A. Manz, D.J. Harrison, E.M.J. Verpoorte, J.C. Fetters, A. Paulus, H. Lüdi, H.M. Widmer, *J. Chromatogr. A* 593 (1992) 253-258.
- [3] J.P. Kutter, *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 352-363.
- [4] A.J. Gawron, R.S. Martin, S.M. Lunte, *Eur. J. Pharm. Sci.* 14 (2001) 1-12.
- [5] D.R. Reyes, D. Lossifidis, P.-A. Auroux, A. Manz, *Anal. Chem.* 74 (2002) 2623-2636.
- [6] P.-A. Auroux, D. Lossifidis, D.R. Reyes, A. Manz, *Anal. Chem.* 74 (2002) 2637-2652.
- [7] M. Blas, N. Delaunay-Bertoncini, J.-L. Rocca, *Spectra Anal.* 246 (2005) 20-31.
- [8] K.E. Herold, A. Rasooly, *Lab on a Chip Technology, Volume 1: Fabrication and Microfluidics*, Caister Academic Press, Norfolk, United Kingdom (2009).
- [9] V. Dolnik, S. Liu, S. Jovanovich, *Electrophoresis* 21 (2000) 41-54.
- [10] J.C. McDonald, D.C. Duffy, J.R. Anderson, D.T. Chiu, H. Wu, O.J.A. Schueller, G.M. Whitesides, *Electrophoresis* 21 (2000) 27-40.
- [11] S.C. Terry, J.H. Jerman, J.B. Angell, *IEEE Trans. Electron Devices* 26 (1979) 1880-1886.
- [12] S.A. Soper, S.M. Ford, S. Qi, R.L. McCarley, K. Kelly, M.C. Murphy, *Anal. Chem.* 72 (2000) 642 A-651 A.
- [13] R. Li, L. Wang, X. Gao, G. Du, H. Zhai, X. Wang, G. Guo, Q. Pu, *J. Hazard. Mater.* 248-249 (2013) 268-275.
- [14] B.E. Slentz, N.A. Penner, F.E. Regnier, *J. Chromatogr. A* 948 (2002) 225-233.
- [15] A. Manz, Y. Miyahara, J. Miura, Y. Watanabe, H. Miyagi, K. Sato, *Sens. Actuators, B* 1 (1990) 249-255.
- [16] C.S. Effenhauser, A. Manz, H.M. Widmer, *Anal. Chem.* 65 (1993) 2637-2642.
- [17] D.J. Harrison, A. Manz, Z. Fan, H. Lüdi, H.M. Widmer, *Anal. Chem.* 64 (1992) 1926-1932.
- [18] S.C. Jacobson, R. Hergenroder, L.B. Koutny, R.J. Warmack, J.M. Ramsey, *Anal. Chem.* 66 (1994) 1107-1113.
- [19] D. Liu, Z. Ou, M. Xu, L. Wang, *J. Chromatogr. A* 1214 (2008) 165-170.
- [20] L.-Y. Qi, X.-F. Yin, J.-H. Liu, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 4510-4516.
- [21] F. Von Heeren, E. Verpoorte, A. Manz, W. Thormann, *Anal. Chem.* 68 (1996) 2044-2053.
- [22] C.T. Culbertson, S.C. Jacobson, J.M. Ramsey, *Anal. Chem.* 72 (2000) 5814-5819.
- [23] C.I.D. Newman, B.C. Giordano, C.L. Copper, G.E. Collins, *Electrophoresis* 29 (2008) 803-810.
- [24] K. Sueyoshi, F. Kitagawa, K. Otsuka, *Anal. Chem.* 80 (2008) 1255-1262.
- [25] S.C. Jacobson, R. Hergenroder, L.B. Koutny, J.M. Ramsey, *Anal. Chem.* 66 (1994) 2369-2373.
- [26] B.S. Broyles, S.C. Jacobson, J.M. Ramsey, *Anal. Chem.* 75 (2003) 2761-2767.
- [27] Y. Ladner, G. Crétier, K. Faure, *Electrophoresis* 33 (2012) 3087-3094.
- [28] J.D. Ramsey, S.C. Jacobson, C.T. Culbertson, J.M. Ramsey, *Anal. Chem.* 75 (2003) 3758-3764.
- [29] R. Wu, Z. Wang, W. Zhao, W.S.-B. Yeung, Y.S. Fung, *J. Chromatogr. A* 1304 (2013) 220-226.
- [30] M. Masar, M. Zuborova, J. Bielikova, D. Kaniansky, M. Johnck, B. Stanislawski, *J. Chromatogr. A* 916 (2001) 101-111.
- [31] J.M. Karlinsey, *Anal. Chim. Acta* 725 (2012) 1-13.
- [32] Z.H. Fan, D.J. Harrison, *Anal. Chem.* 66 (1994) 177-184.
- [33] D.J. Harrison, Z. Fan, K. Seiler, A. Manz, H.M. Widmer, *Anal. Chim. Acta* 283 (1993) 361-366.
- [34] C.S. Effenhauser, A. Paulus, A. Manz, H.M. Widmer, *Anal. Chem.* 66 (1994) 2949-2953.
- [35] S.C. Jacobson, R. Hergenroder, L.B. Koutny, J.M. Ramsey, *Anal. Chem.* 66 (1994) 1114-1118.
- [36] S.V. Ermakov, S.C. Jacobson, J.M. Ramsey, *Anal. Chem.* 72 (2000) 3512-3517.
- [37] R. Bharadwaj, J.G. Santiago, B. Mohammadi, *Electrophoresis* 23 (2002) 2729-2744.
- [38] S.C. Jacobson, L.B. Koutny, R. Hergenroder, A.W. Moore, J.M. Ramsey, *Anal. Chem.* 66 (1994) 3472-3476.
- [39] S.C. Jacobson, J.M. Ramsey, *Electrophoresis* 16 (1995) 481-486.
- [40] L.-M. Fu, C.-H. Lin, *Anal. Chem.* 75 (2003) 5790-5796.
- [41] C.-H. Tsai, R.-J. Yang, C.-H. Tai, L.-M. Fu, *Electrophoresis* 26 (2005) 674-686.
- [42] D. Sinton, L. Ren, D. Li, *J. Colloid Interface Sci.* 266 (2003) 448-456.
- [43] Z. Xu, Y. Nakamura, T. Hirokawa, *Electrophoresis* 26 (2005) 383-390.
- [44] H.J. Crabtree, E.C.S. Cheong, D.A. Tilroe, C.J. Backhouse, *Anal. Chem.* 73 (2001) 4079-4086.
- [45] N.A. Patankar, H.H. Hu, *Anal. Chem.* 70 (1998) 1870-1881.
- [46] D. Xiao, T.V. Le, M.J. Wirth, *Anal. Chem.* 76 (2004) 2055-2061.
- [47] S.C. Jacobson, A.W. Moore, J.M. Ramsey, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2059-2063.
- [48] D. Sinton, L. Ren, X. Xuan, D. Li, *Lab Chip* 3 (2003) 173-179.
- [49] M. Blas, N. Delaunay, J.-L. Rocca, *Electrophoresis* 28 (2007) 4629-4637.

- [50] C.-H. Wu, R.-J. Yang, *Electrophoresis* 27 (2006) 4970-4981.
- [51] A. Ríos, A. Escarpa, M.C. González, A.G. Crevillén, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 467-479.
- [52] K.B. Mogensen, H. Klank, J.P. Kutter, *Electrophoresis* 25 (2004) 3498-3512.
- [53] M.C. Breadmore, J.R.E. Thabano, M. Dawod, A.A. Kazarian, J.P. Quirino, R.M. Guijt, *Electrophoresis* 30 (2009) 230-248.
- [54] M.A. Schwarz, P.C. Hauser, *Lab Chip* 1 (2001) 1-6.
- [55] X. Yang, W. Yan, H. Bai, H. Lv, Z. Liu, *Optik - International Journal for Light and Electron Optics* 123 (2012) 2126-2130.
- [56] J.J.P. Mark, R. Scholz, F.-M. Matysik, *J. Chromatogr. A* 1267 (2012) 45-64.
- [57] R.S. Pai, K.M. Walsh, M.M. Crain, T.J. Roussel, D.J. Jackson, R.P. Baldwin, R.S. Keynton, J.F. Naber, *Anal. Chem.* 81 (2009) 4762-4769.
- [58] J. Wang, *Talanta* 56 (2002) 223-231.
- [59] T. Sikanen, S. Aura, S. Franssila, T. Kotiaho, R. Kostianen, *Anal. Chim. Acta* 711 (2012) 69-76.
- [60] F. Kitagawa, K. Otsuka, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 55 (2011) 668-678.
- [61] F. Shang, E. Guihen, J.D. Glennon, *Electrophoresis* 33 (2012) 105-116.
- [62] G. Chen, Y. Lin, J. Wang, *Talanta* 68 (2006) 497-503.
- [63] L. Marle, G.M. Greenway, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 795-802.

***PARTIE IV – DÉVELOPPEMENT D'UN MIP POUR
L'EXTRACTION DES HAP DES HUILES
ALIMENTAIRES***

CHAPITRE I : Les polymères à empreintes moléculaires

1. Introduction

La détermination des HAP présents à l'état de traces dans des échantillons complexes d'huiles alimentaires nécessite des étapes de purification et de pré-concentration de l'échantillon. Ainsi, l'extraction sur phase solide (SPE) a été largement utilisée pour extraire les HAP de la matrice huile avant leur analyse chromatographique [1-4]. Bien que les supports conventionnels soient, à l'heure actuelle, les plus utilisés, ils présentent l'inconvénient majeur de retenir les analytes via des interactions non sélectives. Cela peut alors engendrer des co-extractions de composés de polarité similaire aux HAP qui peuvent ensuite co-éluer avec les HAP ciblés et ainsi provoquer des problèmes d'identification et de quantification lors de leur analyse chromatographique. Afin d'améliorer la sélectivité de cette étape d'extraction, de nouveaux supports d'extraction impliquant des mécanismes de reconnaissance moléculaire ont été développés ces dernières années. Une première approche consiste à développer des anticorps spécifiques des composés ciblés, de les intégrer dans des cartouches SPE et de procéder à une extraction basée sur des interactions antigènes-anticorps de forte affinité et hautement sélectives [5]. Plusieurs revues démontrant l'intérêt de cette approche pour le développement de méthodes de préparation de l'échantillon sélectives ont été publiées ces dernières années [6-9]. Néanmoins, le développement d'immunoabsorbants présente divers inconvénients comme la durée (de 6 mois à 1 an) et le coût de production des anticorps. De plus, les interactions antigènes-anticorps étant favorisées en milieu aqueux, les immunoabsorbants sont plutôt dédiés à l'analyse de matrices aqueuses. En conséquence, d'autres types de supports d'extraction sélectifs basés sur le même principe de reconnaissance moléculaire que les anticorps ont émergé ces dernières années : les polymères à empreintes moléculaires (MIP) [10, 11].

Les MIP sont des polymères synthétiques possédant des cavités spécifiques envers une molécule empreinte, appelée *template*. La première application d'un MIP comme phase sélective d'extraction en SPE a été démontrée par Sellergren en 1994 pour l'extraction de la pentamidine présente dans de l'urine à de faibles concentrations [12]. Puis, d'autres MIP ont été développés pour l'extraction sélective et la purification d'analytes présents dans des matrices complexes très variées [11, 13-15]. Plusieurs d'entre eux sont d'ailleurs actuellement disponibles dans le commerce.

Tout d'abord, le principe de la synthèse des MIP va être présenté tout en mettant en évidence les paramètres expérimentaux impactant le plus la sélectivité. Puis, les différentes approches d'évaluation de la sélectivité seront abordées. Enfin, le potentiel des MIP en tant

que support de SPE pour extraire sélectivement des analytes à partir d'échantillons complexes sera discuté en mettant l'accent sur les MIP dédiés à l'extraction des HAP décrits dans la littérature.

2. Synthèse des MIP

2.1 Principe de l'impression moléculaire

La synthèse des MIP repose, tout d'abord, sur la formation d'un complexe entre des monomères fonctionnels et une molécule modèle (empreinte ou *template*), le plus souvent par interactions non covalentes. Ainsi, dans le solvant de synthèse, le *template* est mis en présence des monomères, d'un agent réticulant et d'un initiateur de polymérisation. Par initiation thermique ou photochimique, la polymérisation va ensuite s'effectuer entre les monomères complexés avec le *template* et l'agent réticulant formant alors des cavités spécifiques. Enfin, à l'aide d'un solvant adéquat, le *template* est extrait de la structure polymérique révélant ainsi des cavités complémentaires de la molécule empreinte en forme et en taille et renfermant des sites d'interactions spécifiques à cette même molécule [10, 16, 17]. De cette façon, une véritable mémoire moléculaire est introduite au sein du polymère qui est désormais capable de reformer des liaisons spécifiques avec la molécule cible au cours de la percolation de l'échantillon (Figure IV-I-1).

Suivant le type d'interactions développées entre la molécule empreinte et les monomères, on parle d'approche non-covalente, covalente ou semi-covalente. L'approche non covalente, introduite par Mosbach et coll. en 1981 [18], est la plus largement répandue de part sa facilité de mise en œuvre. En effet, l'étape de complexation est réalisée en mélangeant la molécule empreinte avec un ou plusieurs monomères fonctionnels capables de la complexer dans le solvant de synthèse (Figure IV-I-1). Les liaisons ainsi engagées dans les complexes monomères/*template* sont de nature non covalente de type liaisons hydrogène, interactions π - π , interactions de Van der Waals, interactions électrostatiques, interactions hydrophobes ou interactions métal-ligand. Une fois l'étape de synthèse terminée, la molécule modèle est extraite du polymère par une simple étape de rinçage utilisant un solvant ou un mélange de solvants. L'extraction finale se fera alors par l'intermédiaire d'interactions non covalentes similaires entre la phase polymérique et la molécule à analyser. Afin de faciliter ces deux dernières étapes, le solvant porogène doit pouvoir assurer la synthèse d'une structure meso-à macroporeuse. La synthèse polymérique par voie non covalente reste la démarche aujourd'hui privilégiée car elle permet une élimination facile de la molécule empreinte et une recapture rapide des analytes, ce qui est appropriée à des applications de SPE.

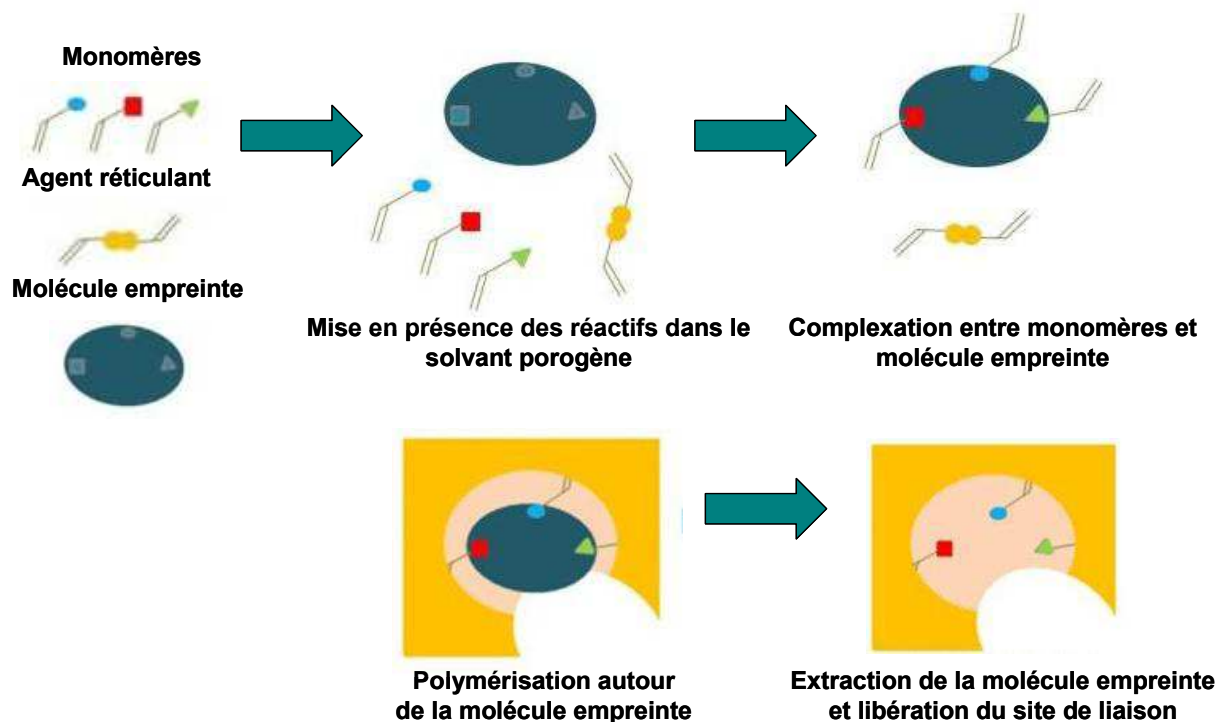


Figure IV-I-1. Principe de synthèse d'un polymère à empreintes moléculaires suivant l'approche non-covalente

L'approche covalente a quant à elle été présentée par Wulff et coll. en 1972 [19]. Lors de cette procédure, la molécule empreinte est liée de façon covalente aux monomères via des liaisons de type ester ou amide. Après l'étape de polymérisation, il est donc nécessaire d'avoir recours à un clivage chimique afin de rompre les liaisons entre le *template* et le polymère et ainsi libérer les cavités formées. Le MIP alors obtenu aura la capacité de retenir les molécules d'intérêt par le biais d'interactions similaires à celles développées lors de la synthèse. Puisque la molécule empreinte est liée plus fortement aux monomères que dans l'approche non-covalente, cette méthode présente l'avantage de générer des cavités spécifiques mieux définies et plus homogènes améliorant ainsi la sélectivité du support d'extraction [20]. Cependant, le relargage de la molécule empreinte reste une étape difficile et la vitesse de recapture de la molécule cible s'avère généralement trop lente pour pouvoir utiliser cette approche à des fins de SPE.

Enfin, la dernière méthode nommée « semi-covalente » est une technique hybride des deux premières [21, 22]. Dans cette approche, l'étape de complexation entre le *template* et les monomères fonctionnels se fait de façon covalente puis, une fois la molécule empreinte extraite de la structure tridimensionnelle polymérique, l'extraction de la molécule cible à partir de l'échantillon se fait par formation de liaisons non covalentes. Par conséquent, cette stratégie combine les avantages des deux premières approches i.e. la stabilité des

complexes et l'homogénéité des sites de l'impression covalente ainsi que la simplicité d'utilisation et la rapidité de recapture de la molécule d'intérêt de la voie non-covalente. Néanmoins, les performances d'extraction des MIP semi-covalents étant plus faibles que ceux obtenus par voie non-covalente, ils ont rarement été utilisés en SPE [23, 24].

2.2 Choix des réactifs

Afin de créer des cavités hautement spécifiques envers la molécule empreinte, le choix des réactifs chimiques utilisés pour la synthèse du MIP est crucial.

2.2.1 Molécule empreinte

Un MIP est généralement synthétisé en vue d'une application analytique spécifique, il est donc nécessaire de sélectionner la molécule modèle adaptée. Sa structure ainsi que ses fonctionnalités détermineront les propriétés des sites de liaison, c'est pourquoi, elle doit ressembler le plus possible aux molécules que l'on souhaite extraire par la suite. La molécule modèle devra donc avoir une taille, une forme ainsi que des groupes fonctionnels de nature et de positionnement similaires aux molécules recherchées.

En plus de ses fonctionnalités chimiques, le coût et la disponibilité de la molécule empreinte sont des critères à considérer. Dans le cas d'une impression non-covalente, les interactions impliquées sont faibles [25], c'est pourquoi, il est préférable que la molécule modèle possède plusieurs sites fonctionnels afin d'augmenter la stabilité et la force du complexe formé. Dans la majorité des cas, la molécule empreinte est identique à la molécule d'intérêt que l'on souhaite sélectivement retenir dans le réseau du MIP [26]. Cependant, pour des raisons de coût et de disponibilité, il est parfois nécessaire d'avoir recours à une molécule de structure analogue (*dummy molécule*) mais différente de la molécule à extraire. L'approche « dummy imprinting » permet également de remédier aux phénomènes de relargage très fréquemment rencontrés [27-31]. Il s'agit d'une élution tardive de la molécule empreinte au cours de l'utilisation du MIP, particulièrement gênante dans le cas d'analyse de traces de la molécule ayant servi d'empreinte. Lorsqu'une molécule analogue est utilisée, son possible relargage ne perturbera pas la quantification des composés ciblés. Enfin, l'utilisation d'une « dummy molécule » peut également être intéressante dans le cas de composés difficiles à solubiliser.

2.2.2 Monomère

Le choix du monomère est essentiel puisqu'il va directement impacter la sélectivité du MIP au travers de la stabilité du pré-complexe établi avec le *template* et de la géométrie des cavités formées [32]. Celui-ci doit être capable de former des interactions fortes avec la molécule empreinte tout en étant soluble dans le solvant porogène. Bien qu'il existe un nombre important de monomères commerciaux, les plus largement utilisés jusqu'à présent ont été l'acide méthacrylique (MAA), interagissant avec des composés basiques (interactions électrostatiques et/ou liaisons hydrogène) et le 4-vinylpyridine (4-VP) capable d'interagir avec des molécules acides par interactions électrostatiques ou avec des molécules possédant un cycle aromatique par liaisons π - π (Figure IV-I-2). Enfin, le styrène (Sty) est le monomère neutre le plus répandu dans la littérature pour l'extraction de molécules ne présentant pas de caractère acido-basique, par l'intermédiaire d'interactions hydrophobes ou de type π - π [33] (Figure IV-I-2). Néanmoins, dans le cas d'un analyte neutre, le choix peut également se porter sur le MAA qui va alors développer des liaisons hydrogène avec l'empreinte. Etant à la fois donneur et accepteur de liaisons hydrogène, le MAA est le monomère fonctionnel le plus utilisé lorsque les molécules cibles sont basiques ou neutres.

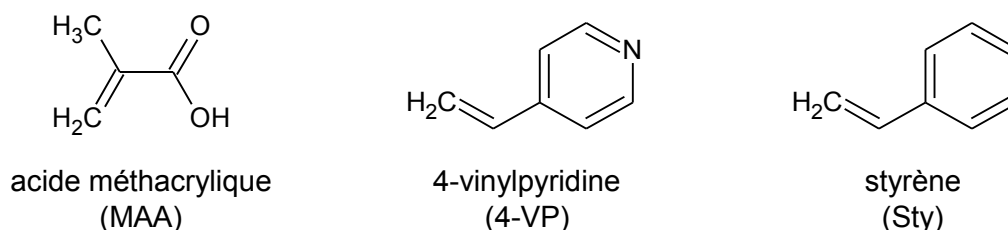


Figure IV-I-2. Monomères les plus utilisés pour la synthèse de MIP.

2.2.3 Agent réticulant

L'agent réticulant a pour fonction d'assurer la stabilité mécanique du polymère et de figer la structure des sites de reconnaissance moléculaire. La capacité de rétention d'un MIP étant directement corrélée à son degré de réticulation, le choix de l'agent réticulant est important [34]. De plus, la nature de l'agent réticulant conditionnera la polarité du polymère synthétisé, il pourra donc être intéressant de le modifier afin de minimiser les interactions non-spécifiques [35]. Parmi le nombre important d'agents réticulants existant, les plus utilisés sont l'éthylèneglycol diméthacrylate (EGDMA) [24, 36-38] suivi du triméthylolpropane triméthacrylate (TRIM) [39, 40] et du divinylbenzène (DVB) [41] (Figure IV-I-3).

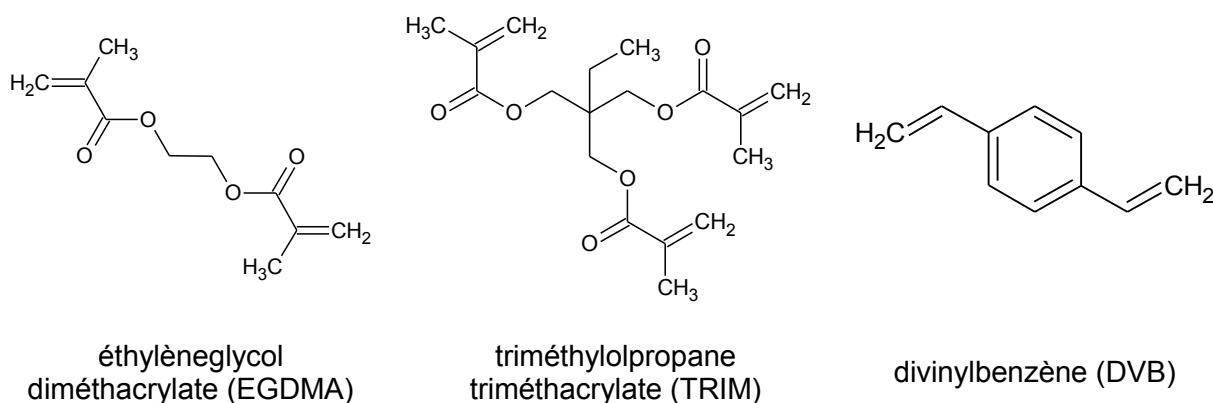


Figure IV-I-3. Agents réticulants les plus courants pour la synthèse de MIP.

2.2.4 Solvant de polymérisation

Le solvant de synthèse, ou porogène, doit permettre la solubilisation de tous les réactifs tout en assurant la formation du complexe entre la molécule empreinte et le monomère avant polymérisation. En effet, la reconnaissance moléculaire est fortement dépendante des caractéristiques physico-chimiques du solvant porogène introduit dans le mélange de pré-polymérisation.

Généralement, afin de favoriser des interactions fortes polaires telles que les liaisons hydrogène et les interactions électrostatiques, le solvant porogène utilisé est peu ou pas polaire et aprotique tel que le toluène, le dichlorométhane (DCM), le chloroforme et l'acétonitrile (ACN). A l'inverse, l'utilisation de solvants polaires favorisera la formation d'interactions hydrophobes entre le monomère et la molécule empreinte.

2.2.5 Initiateur radicalaire

Les MIP sont principalement synthétisés par polymérisation radicalaire qui peut être initiée soit de façon thermique, en plaçant le mélange réactionnel à haute température, soit de façon photochimique, en appliquant un rayonnement UV tout en thermostatant le mélange réactionnel à une faible température. Le choix du type d'initiation sera donc fonction de la stabilité du *template* à de fortes températures et de son caractère photodégradable. L'endroit où le MIP doit être synthétisé influence également le type d'initiation : une initiation photochimique est généralement privilégiée pour la synthèse de MIP *in-situ* dans un canal de puce, par exemple. L'AIBN (2,2'-azo-bis-isobutyronitrile) est l'initiateur le plus largement utilisé puisque permettant d'initier les deux types de polymérisation (thermique et photochimique). Peu d'études ont comparé les deux modes d'initiation [42-45]. Cependant, le type d'initiation conditionne la vitesse de polymérisation et la résolution spatiale des

matériaux synthétisés. L'initiation par voie photochimique, dont la durée de polymérisation est généralement plus élevée que celle de la voie thermique, peut permettre d'atteindre une meilleure résolution spatiale.

2.3 Techniques de polymérisation

Plusieurs techniques de polymérisation ont été développées pour la synthèse des MIP à des fins de SPE. Depuis l'apparition des MIP, le mode de synthèse le plus couramment utilisé est la polymérisation en bloc [46, 47]. La première étape de cette synthèse consiste à solubiliser l'ensemble des réactifs nécessaires à la polymérisation, dans un faible volume de solvant porogène. Après une étape de dégazage du milieu réactionnel sous diazote dont l'objectif est d'éliminer le dioxygène dissous, susceptible de produire des radicaux libres, la polymérisation thermique ou photochimique a lieu dans un environnement thermostaté. Au bout de 24 h environ, un monolithe dur nommé « bulk » est obtenu. Celui-ci est alors broyé et tamisé afin d'obtenir des particules de tailles homogènes comprises entre 25 et 50 μm . Une étape de sédimentation permet ensuite d'éliminer les plus petites particules (inférieures à 25 μm). Finalement, pour des applications de SPE, le MIP est introduit dans une cartouche vide et maintenu en place par deux frittés. Ces différentes étapes sont longues et laborieuses et conduisent à de faibles rendements de synthèse de particules de bonnes tailles. En effet, seulement 30 à 40 % de la masse de polymère synthétisée est réellement utilisée. De plus, les particules de MIP ainsi obtenues ont des tailles et des formes irrégulières. Cela est particulièrement gênant dans le cas d'un couplage du MIP en ligne avec la HPLC (pics obtenus larges et asymétriques). D'autres méthodes de polymérisation ont donc été développées : la polymérisation par précipitation [32, 48, 49], la polymérisation en suspension [37, 50, 51] et la polymérisation par « multi-step swelling » [52-54].

Malgré ses principaux inconvénients (faibles rendements et irrégularité des particules), la polymérisation en bloc reste la plus répandue grâce à sa simplicité de mise en œuvre. De plus, elle utilise des instruments peu sophistiqués et donc peu onéreux.

Les monolithes obtenus par polymérisation en bloc peuvent également être synthétisés directement *in-situ* dans un capillaire de silice [55] ou dans un canal de microsystème [56, 57]. Pour cela, une étape d'activation de la silice ou du verre est nécessaire afin de pouvoir immobiliser le monolithe de façon covalente sur la surface interne du capillaire ou du canal. Contrairement à une introduction directe des particules de MIP, ce mode de synthèse ne requiert pas l'utilisation de frittés dont la fabrication est délicate. Après activation de la paroi,

le mélange de pré-polymérisation est introduit dans le canal ou le capillaire. La polymérisation est ensuite initiée majoritairement de façon photochimique, à l'aide d'un rayonnement UV, en veillant à placer un cache aux endroits où on ne souhaite pas effectuer la polymérisation. Une fois la polymérisation terminée, le capillaire ou le canal est lavé avec des solvants appropriés afin d'éliminer la molécule empreinte. Cette approche permet de synthétiser un MIP en 3 h environ. Pour un bon écoulement des fluides et une bonne accessibilité aux sites de reconnaissance, le monolithe ainsi synthétisé doit présenter une bonne perméabilité et donc être macroporeux [58]. Les monolithes synthétisés *in-situ* peuvent être utilisés soit comme supports de SPE, pour un couplage de l'étape d'extraction en ligne avec les étapes de séparation et de détection, soit comme véritable phase stationnaire en électrochromatographie. Cette dernière utilisation permet de combiner les grandes efficacités de l'électrochromatographie avec la haute sélectivité des MIP, avantageuse dans le cas de séparations chirales, par exemple [59-61]. Néanmoins, les conditions de synthèse d'un MIP *in-situ* sont difficiles à déterminer. En effet, plus un MIP sera macroporeux et moins il possèdera de cavités spécifiques. Un compromis doit donc être atteint. Cela explique probablement le peu de références dans ce domaine qui sont, d'ailleurs, toutes issues d'un même groupe de recherche.

3. Evaluation de la sélectivité des MIP

Evaluer la sélectivité d'un MIP revient à vérifier la présence de cavités spécifiques envers la molécule cible. Plusieurs approches, basées sur l'étude des interactions entre la molécule cible et le MIP, existent. Généralement, elles s'appuient sur la comparaison de la rétention de l'analyte d'intérêt obtenue sur le MIP à celle obtenue sur un support dépourvu d'interactions spécifiques à savoir un polymère non-imprimé, appelé NIP (Non-Imprinted Polymer), obtenu en suivant la même procédure de polymérisation mais en absence de *template*. Ces caractérisations se font, la plupart du temps, dans le solvant de polymérisation afin de retrouver les interactions spécifiques développées lors de la polymérisation.

3.1 Mesures chromatographiques

La sélectivité d'un MIP peut être évaluée en chromatographie d'élution, en comparant la rétention du composé d'intérêt sur des colonnes remplies respectivement avec le MIP et le NIP. Ainsi, selon l'équation 1, le rapport entre le facteur de rétention de l'analyte cible sur le

support imprimé (k_{MIP}) et celui obtenu sur le support non imprimé (k_{NIP}), permet de calculer le facteur d'impression (*Imprinting factor*, IF).

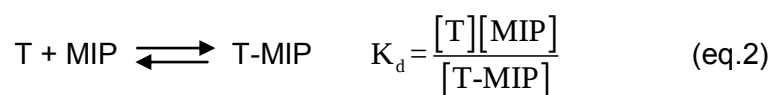
$$\text{IF} = k_{\text{MIP}}/k_{\text{NIP}} \quad (\text{eq.1})$$

Ainsi, plus IF sera élevé, plus l'affinité du MIP sera grande vis-à-vis de la molécule cible en comparaison du NIP et, par conséquent, plus le nombre de cavités spécifiques du MIP sera grand.

Cette méthode est généralement celle employée pour caractériser un MIP avant son utilisation en HPLC ou en SPE. Cependant, l'irrégularité des particules de MIP provoque des élargissements de pics qui dégradent la précision de mesure des temps de rétention. De plus, le facteur d'impression dépend de la phase mobile utilisée puisqu'elle contrôle la nature des interactions engagées dans la reconnaissance moléculaire. Enfin, de grandes quantités d'adsorbants sont nécessaires pour le remplissage de la colonne.

3.2 Tests de fixation

Lors de tests de fixation, appelés également tests de « binding » ou encore mesures « en batch », une quantité connue d'analyte et une certaine masse de MIP ou de NIP sont mises en solution dans le solvant de synthèse ou un solvant proche de celui-ci pour favoriser les interactions développées lors de la synthèse. Après agitation, une fois l'équilibre du système atteint, la quantité d'analyte non fixée, i.e. libre en solution, est déterminée, ce qui permet d'en déduire la quantité fixée. La différence entre les quantités retenues sur le MIP et sur le NIP permet alors d'évaluer le nombre de cavités spécifiques du matériau imprimé. Il est alors possible de déterminer la constante thermodynamique de dissociation, K_d . Cette constante permet d'estimer quantitativement l'affinité du support imprimé (ou du support non-imprimé) pour la molécule empreinte. Elle est calculée à partir de l'étude de l'équilibre entre la molécule empreinte libre (T), le MIP et le complexe molécule empreinte-MIP (T-MIP) :



Les isothermes d'adsorption, tracées lors de ces tests de « binding », représentent la quantité de molécule empreinte fixée sur le support MIP ou NIP en fonction de la quantité globale de molécule empreinte introduite dans la solution. La comparaison des isothermes d'adsorption obtenues sur le MIP et sur le NIP permet de mettre en évidence une différence de comportement entre les deux supports. Une croissance plus rapide de l'isotherme du MIP

que de celle du NIP démontrera la présence de cavités de reconnaissance spécifique et le nombre de cavités sera corrélé à la différence de quantité adsorbée sur les deux supports [15]. Enfin, si l'isotherme d'adsorption obtenue sur le support imprimé présente un plateau caractéristique d'une saturation des sites spécifiques, la capacité du support pourra également être déterminée. Tout comme les précédentes études sur colonnes, les résultats obtenus sont difficilement transposables à une utilisation du MIP en tant que support SPE, puisqu'ils dépendent fortement du solvant utilisé pour réaliser les tests. En effet, en milieu réel, les interactions développées seront différentes et des effets de matrice pourront survenir.

3.3 Etude des profils d'élution en SPE

Une autre façon de caractériser un MIP est de l'utiliser comme adsorbant pour des applications de SPE. Pour cela, la même procédure d'extraction, constituée des étapes de conditionnement, de percolation, de lavage et d'élution, est réalisée en parallèle sur le MIP et le NIP. La comparaison des taux de récupération de la molécule cible dans les différentes fractions obtenues sur les deux types de supports permet alors de vérifier la présence de cavités spécifiques sur le MIP et donc d'évaluer sa sélectivité. Pour ce type de caractérisation, la présence de cavités est généralement mise en évidence par la percolation de solvants proches du solvant de synthèse. Cependant, il est préférable d'utiliser un solvant de percolation de composition la plus proche possible de la matrice à analyser pour faciliter une future transposition au milieu réel.

Lors d'une telle approche, le profil d'élution idéal correspond à des rendements d'extraction de 100 % sur le MIP et de 0 % sur le NIP, i.e. une récupération totale des analytes dans les fractions précédant l'élution dans le cas du support non imprimé et dans la fraction d'élution dans le cas du support imprimé, comme le montre la Figure IV-I-4.

Après avoir suivi la même procédure d'extraction sur le MIP et sur le NIP, l'obtention d'un tel profil d'extraction démontre que la rétention de l'analyte sur le MIP est due exclusivement à la présence de cavités spécifiques au sein de ce support.

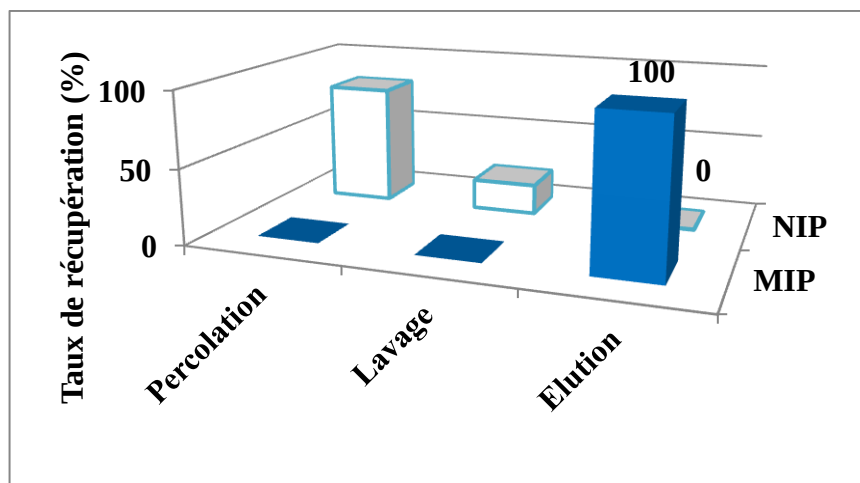
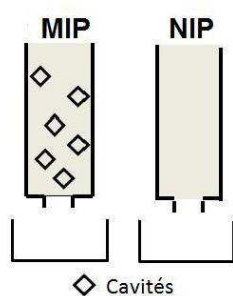


Figure IV-I-4. Profil d'extraction idéal sur un support imprimé et non imprimé.

Cette démarche permet également de déterminer la capacité du MIP, pour ensuite en déduire le nombre de cavités qui interviennent dans le processus de reconnaissance spécifique. Pour cela, la courbe représentant la quantité d'analyte retenue en fonction de la quantité d'analyte percolée est tracée en percolant des quantités croissantes de molécules cibles. Tant que la capacité du support n'est pas atteinte, la courbe obtenue est une droite de coefficient directeur égal au rendement d'extraction. La valeur de capacité est alors déterminée au point de rupture entre les domaines linéaires et non-linéaires et s'exprime généralement en milligrammes d'analytes retenus par gramme de support. Par cette technique, le nombre de sites spécifiques du MIP peut également être évalué et correspond à la différence entre les courbes obtenues sur le MIP et sur le NIP, au point de rupture. Dans notre étude, ce dernier mode de caractérisation a été utilisé afin d'évaluer le pouvoir de rétention et la sélectivité des phases d'extraction développées.

4. Applications des MIP en SPE

L'utilisation des MIP en tant que support SPE, nommée MISPE, est à l'heure actuelle, l'application la plus avancée de ces supports en milieu réel. En effet, de part la présence de cavités spécifiques, les MIP sont capables de retenir plus fortement l'analyte cible que les autres composés présents dans la matrice et donc d'apporter une amélioration notable en terme de sélectivité d'extraction par rapport aux phases SPE conventionnelles.

4.1 Principe

La procédure d'extraction sur MIP est similaire à celle utilisée sur des supports de SPE classiques comme le montre la Figure IV-I-5.

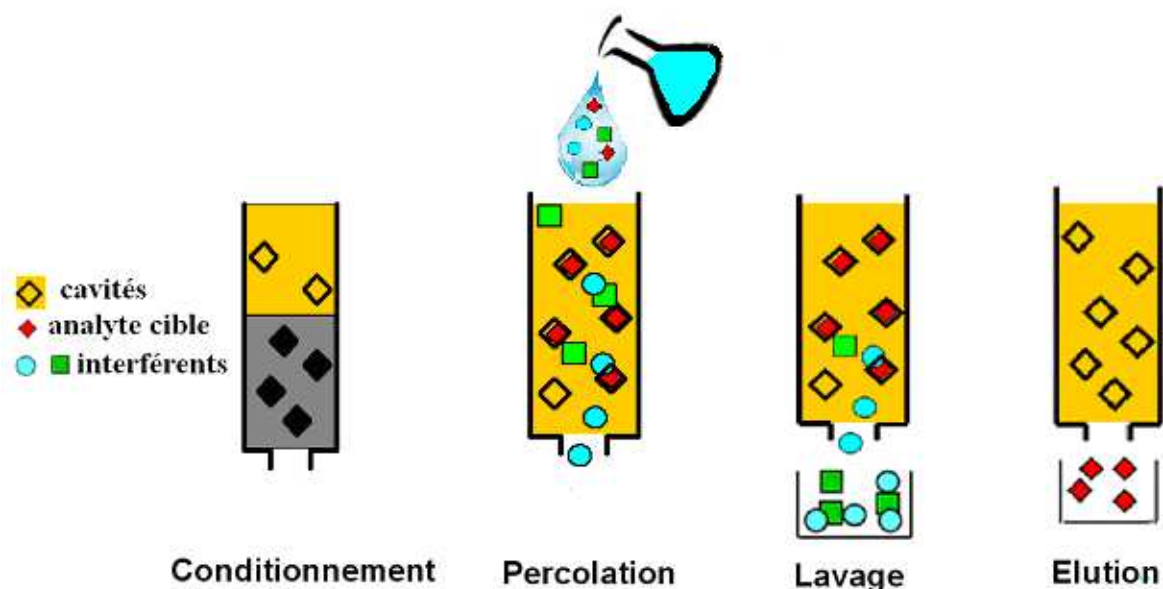


Figure IV-I-5. Etapes d'une extraction sur MIP

Une première étape de conditionnement consiste à solvater les groupements fonctionnels en surface, à l'aide d'un solvant de nature proche de celle du solvant de polymérisation. Puis, lors de la percolation de l'échantillon à travers le support MIP, les molécules à extraire se fixent dans les cavités du MIP grâce aux interactions spécifiques qu'elles développent avec les monomères. La rétention des composés peut également provenir d'interactions non-spécifiques développées en dehors des cavités à la fois sur le polymère imprimé et sur le non-imprimé. Comme précisé précédemment, la nature du solvant de mise en solution de l'analyte cible doit être proche de celle du solvant de polymérisation pour développer des interactions similaires à celles générées pendant la synthèse.

Une ou plusieurs étapes de lavage peuvent ensuite être effectuées. Il convient alors d'optimiser la nature, le pH et la quantité du ou des solvants utilisés afin de rompre les interactions existantes entre le MIP et les composés interférents de structures non complémentaires aux cavités, tout en maintenant sur le support les molécules cibles fixées par interactions spécifiques au sein des cavités. Lors de ces étapes de lavage, les molécules cibles retenues par interactions non-spécifiques, c'est-à-dire à l'extérieur des cavités, se retrouvent également éluées du MIP.

Enfin, lors de l'étape d'élution, un solvant de force éluante suffisamment importante est employé pour rompre les interactions spécifiques entre les composés et les cavités.

Pour que la sélectivité d'extraction soit optimale lors d'une analyse d'échantillon réel, la procédure appliquée doit permettre aux analytes d'interagir spécifiquement avec les monomères présents dans les cavités. Ces interactions fortes doivent être favorisées et ne doivent pas être affectées par les composés interférents présents dans la matrice. En revanche, les interactions faibles engagées entre la molécule cible et les monomères présents en surface du polymère ne sont pas désirables ; c'est pourquoi, les solvants utilisés lors des étapes de percolation ou de lavage doivent idéalement avoir une force éluante suffisamment importante pour rompre ces interactions non spécifiques sans affecter les molécules retenues au sein des empreintes. Comme mentionné précédemment, afin de pouvoir évaluer et minimiser ces interactions non spécifiques développées en surface du polymère, un processus d'extraction identique est généralement testé en parallèle sur le NIP [45, 62]. Cette comparaison permet de s'assurer que la rétention obtenue sur le MIP provient bien des cavités spécifiques synthétisées et non des interactions de surface avec le polymère.

4.2 Extraction sélective d'une famille de molécules

Bien que la majorité des MIP ait été développée envers un analyte en particulier, ils peuvent également extraire des composés de structure proche de la molécule empreinte, souvent d'une même famille. Ce phénomène, connu sous le nom de réactivité croisée, permet d'extraire de façon sélective des analogues structuraux de la molécule empreinte, qui doit être capable de produire des cavités complémentaires pour toutes les molécules ciblées. Par exemple, Sun et coll. ont développé deux MIP de structures très proches visant à extraire des antibiotiques de la famille des fluoroquinolones, présents dans des échantillons biologiques [63, 64]. Ces deux MIP, qui se différenciaient uniquement par l'agent réticulant utilisé lors de la synthèse, ont démontré une grande réactivité croisée envers plusieurs composés de cette famille. En effet, un premier MIP a permis d'extraire six fluoroquinolones différents d'un échantillon de sérum [63] tandis que neuf composés différents ont été retenus sur un deuxième MIP [64].

Un autre exemple de MIP possédant de fortes réactivités croisées sont ceux qui ont été développés pour extraire sélectivement des composés appartenant à une famille d'herbicide très étudiée : les triazines. En effet, Cacho et coll. ont synthétisé un MIP capable d'extraire simultanément cinq triazines de sols, de maïs et de pomme de terre [24]. Carabias-Martínez

et coll. ont développé un autre MIP anti-triazine en utilisant la propazine comme molécule empreinte, pour l'extraction sélective des triazines et de leurs métabolites à partir d'eaux de rivière [65]. Le MIP synthétisé a démontré de grandes sélectivités envers les triazines et leurs composés dérivés.

Dans de nombreuses études, le choix du *template* s'est révélé essentiel lors du développement d'un MIP visant à extraire sélectivement un groupe d'analogues structuraux comme les méthylxanthines [66], les anti-inflammatoires non stéroïdiens [67], la mycotoxine zéaralénone et ses métabolites [31] ou encore les explosifs nitroaromatiques [68].

4.3 Développement d'une procédure SPE sélective

Il a été largement démontré qu'une reconnaissance sélective maximale est obtenue lorsque les composés cibles sont mis en solution directement dans le solvant de synthèse du MIP [69]. La majorité des MIP étant synthétisée dans des solvants porogènes de type peu polaire et aprotique, les interactions polaires sont les plus souvent favorisées lors de l'extraction telles que les liaisons hydrogène et/ou électrostatiques. Puis, une ou plusieurs étapes de lavage sont généralement réalisées avec ce même solvant en présence d'un pourcentage croissant de solvant polaire, i.e. avec des solutions de force éluante croissante afin de rompre les interactions non-spécifiques entre la surface externe du MIP et les analytes. L'efficacité du lavage est alors évaluée en étudiant le NIP en parallèle. Enfin, un solvant polaire protique comme le méthanol, capable de développer des interactions avec le support et/ou les analytes et ainsi de rompre les interactions polaires existantes entre l'analyte et les cavités, est fréquemment utilisé pour l'étape d'élution. Lorsque des interactions électrostatiques sont mises en jeu, il convient d'ajouter un faible pourcentage d'un acide ou d'une base au méthanol afin de rompre ces interactions.

5. Applications des MIP aux HAP

Comme les HAP sont fortement hydrophobes, de structure plane et condensée sans aucun groupe fonctionnel, des interactions non-covalentes de type liaisons hydrogène ou interactions électrostatiques ne pourront pas être formées entre ces composés et les monomères. L'impression moléculaire des HAP ne pourra donc se baser que sur des interactions faibles de type hydrophobe, π - π ou de reconnaissance de forme. La synthèse d'un MIP spécifique aux HAP n'est donc pas triviale, ce qui explique sans doute le faible nombre d'études publiées dans ce domaine.

Les premiers MIP, développés pour cette famille de molécules, ont été utilisés sous forme de capteurs. Dickert et coll. ont été les pionniers dans ce domaine de recherche [70]. Dès 1999, ce groupe a développé un capteur, revêtu de films de polyuréthanes imprimés, pour la détection spécifique des HAP dans l'eau. Pour la synthèse des MIP, des HAP de différentes formes et tailles, du naphthalène (deux cycles) jusqu'au pérylène (cinq cycles), ont été testés comme *template*. Le phloroglucinol et le bisphenol A ont été utilisés pour la synthèse du MIP afin de développer des interactions π - π avec les HAP. Dans cette étude, il a été démontré que la molécule cible atteignait une sensibilité de détection maximale lorsqu'une molécule empreinte de plus petite taille était utilisée.

Ce même groupe a, par la suite, introduit le concept de la double empreinte afin d'améliorer les chemins de diffusion à l'intérieur du polymère et donc de rendre les sites de reconnaissance plus accessibles [71]. En effet, dans cette technique, une des deux molécules empreintes jouait le rôle de porogène et améliorait la porosité du matériau. De plus, en adaptant la nature des deux molécules empreintes, il a été possible d'optimiser les couches de polyuréthane envers l'extraction de deux analytes différents ou d'un analyte en particulier. Cependant, il est impossible d'appréhender la sélectivité des MIP obtenus puisque les NIP correspondants n'ont jamais été évalués.

Les travaux rapportant la synthèse de MIP spécifiques aux HAP, évalués simplement via des tests de fixation ou jusqu'à leur application en SPE, sont regroupés dans le Tableau IV-I-1.

La première application en SPE d'un MIP spécifique des HAP a été publiée par Lai et coll. [72]. Cette équipe a synthétisé quatre MIP différents dans du DCM à partir de trois monomères (MAA, acide trifluorométhacrylique (TFMAA) et 4-VP) et de deux agents réticulant (DVB et EGDMA), pour l'extraction spécifique du BaP dans des échantillons d'eau et de café. Les MIP synthétisés ont tous été caractérisés à l'aide de tests de mise à l'équilibre, de mesures chromatographiques et en SPE. L'ensemble des résultats a démontré que l'affinité du BaP pour le MIP augmentait à mesure que la polarité du monomère et de l'agent réticulant diminuait. En effet, le MIP 4-VP-co-DVB offre les meilleurs résultats en termes de quantités de BaP fixées lors des tests d'adsorption (Tableau IV-I-2), de facteur de rétention lors de l'analyse chromatographique et de sélectivité d'extraction lors de tests SPE réalisés en parallèle sur le MIP et le NIP.

Tableau IV-I-1. Conditions de synthèse des MIP publiées dans la littérature pour l'extraction sélective des HAP.

Analytes ciblés	Matrices	Molécule(s) empreinte(s)	Agent réticulant	Utilisation	Ref.
BaP, CHR, ANT, BaA, PYR, BkFA, BbFA, DBahA, BghiP, IP	Eau/café	BaP	4-VP/EGDMA/DCM/AIBN	SPE	[72]
			4-VP/DVB/DCM/AIBN		
			MAA/DVB/DCM/AIBN		
			TFMAA/DVB/DCM/AIBN		
ACP, BaA, BaP, CHR, FA, FLR, PHE, PYR,	Sédiments, particules atmosphériques, effluents industriels	Mélange des 16 HAP US-EPA	MAA/EGDMA/ACN/AIBN	Fixation	[73]
BAP, BaA, BbFA, CHR, DBahP, IP	Eaux souterraines	BaP + BaA + BbFA + CHR + DBahP + IP	MAA/EGDMA/ACN/AIBN		[74]
CHR, BaP, BbFA, IP, DBahA	Lixiviats de particules atmosphériques	CHR + BaP + BbFA + IP + DBahA	4-VP/EGDMA/DCM/AIBN	SPE	[75]
BaP	Fumées de cigarette	BaP	4-VP/TRIM/DCM/AIBN	SPE	[76]
			MAA/TRIM/DCM/AIBN		
			DMAEM/TRIM/DCM/AIBN		
			DMAEM/DVB/DCM/AIBN		
16 HAP US-EPA	Eau de mer	Mélange des 16 HAP US-EPA	PTMS/TEOS	SPE	[77]
15+1 HAP EFSA	Huiles végétales	Cartouches commerciales « SupelMIP® SPE-PAH » (Supelco®)		SPE	[78]

ACN : acétonitrile, DCM : dichlorométhane, 4-VP : 4-vinylpyridine, MAA : acide méthacrylique, TFMAA : acide trifluorométhacrylique, DMAEM : 2-diméthyl(aminoéthyl)méthacrylate, PTMS : phényltriméthoxysilane, EGDMA : éthylèneglycol diméthacrylate, DVB : divinylbenzène, TRIM : triméthylolpropane triméthacrylate, TEOS : tétraéthoxysilane, AIBN : 2,2'-azo-bis-isobutyronitrile.

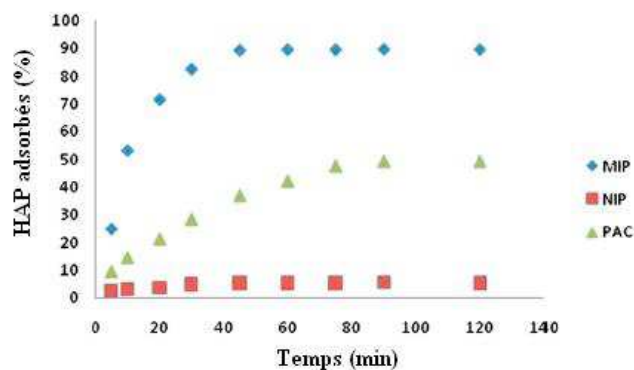
Tableau IV-I-2. Comparaison des quantités maximales ($Q_{\max}$) de BaP fixées sur les différents MIP et NIP lors des tests d'adsorption (20 mg de phase, 1 mL de DCM dopé à 1 $\mu\text{g/mL}$ en BaP et 16 h d'incubation) [72].

Polymères	$Q_{\max}$ ($\mu\text{g/g}$) (CV (%)) (n = 3)		$Q_{\text{MIP}}/Q_{\text{NIP}}$
	Q_{MIP}	Q_{NIP}	
4-VP-co-DVB	16,3 (2,5)	7,8 (1,6)	2,09
MAA-co-DVB	9,7 (3,5)	5,6 (1,8)	1,73
TFMAA-co-DVB	5,8 (1,6)	4,9 (1,2)	1,18
4-VP-co-EGDMA	10,4 (2,2)	5,5 (1,3)	1,89

Deux MIP anti-HAP, MAA-co-EGDMA, ont également été synthétisés par Krupadam et coll., à partir de différents mélanges de molécules empreintes, dans l'ACN. Un premier MIP, obtenu en mélangeant 16 HAP, a été utilisé en tant que support pour l'extraction sélective de 8 HAP présents dans des sédiments, des particules atmosphériques et des effluents industriels [73]. Les rendements d'extraction sont supérieurs à 71 % pour l'ensemble des HAP et les capacités de fixation sont de 6,93 $\mu\text{g/mg}$ pour le MIP et de 1,53 $\mu\text{g/mg}$ pour le NIP. Des valeurs de LOD, allant de 10 à 30 ng/L dans les effluents industriels et de 0,1 à 2,9 ng/kg dans les échantillons solides (sédiments et particules atmosphériques), traduisent les bonnes sensibilités que le couplage de l'extraction sur MIP avec la spectroscopie de fluorescence permettait d'atteindre. Un deuxième MIP, synthétisé à partir d'un mélange de 6 HAP a, quant à lui, été utilisé pour des applications de fixation à l'équilibre de ces composés présents dans des eaux souterraines [74]. En comparaison avec le NIP, le MIP démontre une très bonne sélectivité envers les HAP présents en solution aqueuse. En effet, d'après les tests d'adsorption, le MIP permet de fixer plus de 80 % des HAP en 45 min contre moins de 10 % pour le NIP (Figure IV-I-6A). A partir des isothermes d'adsorption, des valeurs de capacité de 687 $\mu\text{g/g}$ sur le MIP et de 119 $\mu\text{g/g}$ sur le NIP ont été calculées (Figure IV-I-6B). Les capacités d'adsorption obtenues sur le MIP se sont également révélées meilleures que celles obtenues sur un support conventionnel de type charbon actif (capacité de 386 $\mu\text{g/g}$).

Un autre type de MIP a été développé par cette même équipe en suivant une nouvelle fois le concept de « l'impression multiple ». Cette fois, un MIP 4-VP-co-EGDMA, synthétisé dans du DCM et en présence d'un mélange de 5 HAP, a permis d'extraire par SPE les HAP dans des lixiviats de particules atmosphériques avant leur analyse en GC-MS [75]. Les capacités du MIP se sont avérées meilleures que celles d'autres supports SPE commerciaux de type charbon actif ou polystyrène/DVB. Une étude comparative menée sur le NIP a démontré la sélectivité du matériau imprimé. Enfin, il a été également démontré que les principales interactions mises en jeu entre les HAP et le 4-VP, à l'origine de la rétention des HAP sur le MIP, étaient de type π - π .

(A)



(B)

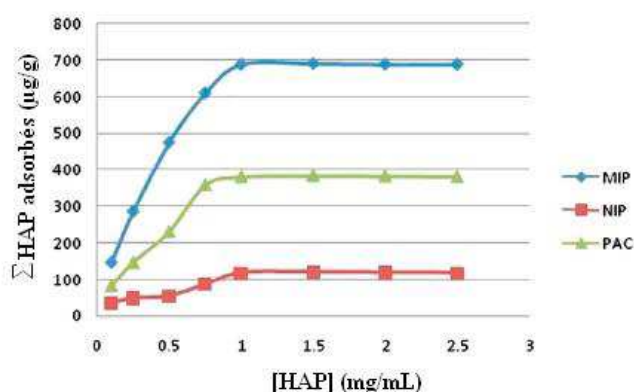


Figure IV-I-6. (A) Quantité de HAP adsorbée sur le MIP, le NIP et sur une phase de charbon actif (PAC) au cours du temps ([HAP] : 1,2 mg/mL d'eau), (B) Isothermes de fixation du MIP, du NIP et du PAC pour un mélange d'HAP présents dans l'eau (60 min d'incubation à 30°C) [74].

Un MIP a ensuite été proposé par Ho et coll. afin d'extraire spécifiquement le BaP, parmi un mélange des 16 HAP US-EPA, de la fumée de cigarette [76]. Quatre types de MIP ont été caractérisés en faisant varier le monomère fonctionnel (4-VP, 2-diméthyl(aminoéthyl)méthacrylate (DMAEM) et MAA) et l'agent réticulant (TRIM et DVB) et en conservant le BaP comme molécule empreinte. Le MIP MAA-co-TRIM a été identifié comme étant le plus performant en termes de capacité de fixation (7,8 $\mu\text{g/g}$), de taux de fixation du BaP en présence des 16 HAP US-EPA (84 %) et de rendement d'extraction du BaP par SPE (80 %).

Le premier MIS (Molecularly Imprinted Silicas) dédié à l'extraction sélective de HAP, a été récemment publié par Song et coll. [77]. Ce MIS a été synthétisé à partir du monomère phényltriméthoxysilane (PTMS), de l'agent réticulant tétraéthoxysilane (TEOS) et en présence d'un mélange des 16 HAP US-EPA, pour extraire sélectivement ces 16 composés d'eaux de mer. De bons rendements d'extraction allant de 83 à 113 % ont été obtenus et de bonnes LOD comprises entre 5,2 et 12,6 ng/L ont pu être atteintes après leur analyse en GC-MS. Contrairement au NIP, le MIP ainsi synthétisé démontre une grande affinité envers

les 16 HAP, avec des valeurs de capacités allant de 111 à 195 µg/g et des facteurs d'impression entre 1,50 et 3,12. Dans ce cas, ce sont les interactions hydrophobes et de type π - π entre les cycles aromatiques des HAP et du PTMS, qui ont permis l'impression moléculaire par polymérisation non covalente.

Enfin, à notre connaissance, un seul travail, récemment publié par Drabova et coll., concerne l'utilisation d'un MIP pour extraire de manière sélective des HAP dans les huiles [78]. Ce MIP, commercialisé par la société Supelco sous le nom de « SupelMIP® SPE-PAH », a permis d'extraire les « 15 + 1 HAP » listés par l'EFSA, de différentes huiles végétales avec de bons rendements d'extraction compris entre 70 et 99 % et une bonne répétabilité (CV entre 2 et 11 %, $n = 6$). Après l'étape de purification sur la phase MIP, les extraits d'huile ont été analysés en GC-2D-MS, permettant ainsi d'atteindre des LOQ de 0,1 à 0,3 µg/kg, très inférieures au niveau de concentration actuellement réglementé pour le BaP par la législation européenne (2 µg/kg).

En conclusion, les MIP anti-HAP déjà synthétisés ont été utilisés soit comme capteur, soit pour des applications de SPE, très majoritairement avec des échantillons aqueux. En effet, étant donné leur forte hydrophobie, il paraît plus aisé d'extraire ces composés à partir de matrices aqueuses qui favorisent alors les interactions de type hydrophobe entre les HAP et les cavités imprimées dans le polymère. De plus, la majorité des caractérisations a été réalisée dans des milieux simples (eaux pures, du robinet, de lac, de mer et solvants organiques).

Aujourd'hui, la synthèse d'un MIP dédié à l'extraction des HAP dans des matrices hydrophobes telles que les huiles alimentaires demeure un véritable défi analytique. Ainsi, il apparaît intéressant de commencer l'étude par un criblage des conditions de synthèse. L'objectif sera alors d'identifier les conditions les plus prometteuses en vue du développement d'un MIP capable d'extraire spécifiquement les HAP des huiles alimentaires. En effet, les résultats publiés jusqu'à présent restent difficilement transposables à notre étude, soulignant l'intérêt de celle-ci notamment en vue d'une miniaturisation pour un couplage de l'étape d'extraction en ligne avec celles de séparation et de détection.

References

- [1] S. Moret, L.S. Conte, J. Sep. Sci. 25 (2002) 96-100.
- [2] A. Barranco, R.M. Alonso-Salces, A. Bakkali, L.A. Berrueta, B. Gallo, F. Vicente, M. Sarobe, J. Chromatogr. A 988 (2003) 33-40.
- [3] D. Luo, Q.-W. Yu, H.-R. Yin, Y.-Q. Feng, Anal. Chim. Acta 588 (2007) 261-267.
- [4] R. Weißhaar, Eur. J. Lipid Sci. Technol. 104 (2002) 282-285.
- [5] M.-C. Hennion, V. Pichon, J. Chromatogr. A 1000 (2003) 29-52.
- [6] D.S. Hage, J. Chromatogr. B 715 (1998) 3-28.
- [7] V. Pichon, M. Bouzige, C. Miège, M.-C. Hennion, Trends Anal. Chem. 18 (1999) 219-235.
- [8] F. Augusto, L.W. Hantao, N.G.S. Mogollón, S.C.G.N. Braga, Trends Anal. Chem. 43 14-23.
- [9] N. Delaunay, V. Pichon, M.-C. Hennion, J. Chromatogr. B 745 (2000) 15-37.
- [10] K. Haupt, Anal. Chem. 75 (2003) 376 A-383 A.
- [11] V. Pichon, F. Chapuis-Hugon, Anal. Chim. Acta 622 (2008) 48-61.
- [12] B. Sellergren, Anal. Chem. 66 (1994) 1578-1582.
- [13] F.G. Tamayo, E. Turiel, A. Martín-Esteban, J. Chromatogr. A 1152 (2007) 32-40.
- [14] E. Caro, R.M. Marcé, F. Borrull, P.A.G. Cormack, D.C. Sherrington, Trends Anal. Chem. 25 (2006) 143-154.
- [15] V. Pichon, J. Chromatogr. A 1152 (2007) 41-53.
- [16] K. Haupt, Chem. Commun. (2003) 171-178.
- [17] F. Hugon-Chapuis, V. Pichon, Ann. Toxicol. Anal. 19 (2007) 239-251.
- [18] R. Arshady, K. Mosbach, Makromol. Chem. 182 (1981) 687-692.
- [19] G. Wulff, A. Sarhan, Angew. Chem. Int. Ed. 11 (1972) 341-344.
- [20] G. Wulff, A. Biffis, in: B. Sellergren (Ed.), *Molecularly Imprinted Polymers: Man-Made Mimics of Antibodies and Their Applications in Analytical Chemistry*, Elsevier, Amsterdam, (2001) 71.
- [21] D.K. Alexiadou, N.C. Maragou, N.S. Thomaidis, G.A. Theodoridis, M.A. Koupparis, J. Sep. Sci. 31 (2008) 2272-2282.
- [22] Y.-Q. Xia, T.-Y. Guo, H.-L. Zhao, M.-D. Song, B.-H. Zhang, B.-L. Zhang, J. Sep. Sci. 30 (2007) 1300-1306.
- [23] E. Caro, N. Masque, R.M. Marce, F. Borrull, P.A.G. Cormack, D.C. Sherrington, J. Chromatogr. A 963 (2002) 169-178.
- [24] C. Cacho, E. Turiel, A. Martín-Esteban, D. Ayala, C. Pérez-Conde, J. Chromatogr. A 1114 (2006) 255-262.
- [25] R. Rosset, M. Claude, A. Jardy, *Chromatographies en phase liquide et supercritique*, 3ème ed: Masson, Paris, (1991).
- [26] F. Hugon-Chapuis, J.U. Mullot, G. Tuffal, M.C. Hennion, V. Pichon, J. Chromatogr. A 1196-1197 (2008) 73-80.
- [27] B. Claude, P. Morin, S. Bayoudh, J. de Ceaurriz, J. Chromatogr. A 1196-1197 (2008) 81-88.
- [28] J. Xie, L. Zhu, X. Xu, Anal. Chem. 74 (2002) 2352-2360.
- [29] T. Kubo, K. Hosoya, Y. Watabe, T. Ikegami, N. Tanaka, T. Sano, K. Kaya, J. Chromatogr. A 987 (2003) 389-394.
- [30] A. Kugimiya, H. Takei, Anal. Chim. Acta 606 (2008) 252-256.
- [31] J.L. Urraca, M.D. Marazuela, E.R. Merino, G. Orellana, M.C. Moreno-Bondi, J. Chromatogr. A 1116 (2006) 127-134.
- [32] M.L. Hu, M. Jiang, P. Wang, S.R. Mei, Y.F. Lin, X.Z. Hu, Y. Shi, B. Lu, K. Dai, Anal. Bioanal. Chem. 387 (2007) 1007-1016.
- [33] C. Maisonnète, *Développement de phases pour l'extraction sélective de traces de biomarqueurs urinaires d'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques : caractérisation d'immunoabsorbants et de polymères à empreintes moléculaires*, Thèse de doctorat, UPMC, 2006.
- [34] V. Pichon, K. Haupt, J. Liq. Chromatogr. Related Technol. 29 (2006) 989-1023.
- [35] M.A. Gore, R.N. Karmalkar, M.G. Kulkarni, J. Chromatogr. B 804 (2004) 211-221.
- [36] A. Beltran, F. Borrull, P.A.G. Cormack, R.M. Marcé, Trends Anal. Chem. 29 (2010) 1363-1375.
- [37] G. Qu, A. Wu, X. Shi, Z. Niu, W. Xie, D. Zhang, Anal. Lett. 41 (2008) 1443-1458.
- [38] Y. Xiong, H. Zhou, Z. Zhang, D. He, C. He, Analyst 131 (2006) 829-834.
- [39] D. De Smet, P. Dubruel, C. Van Peteghem, E. Schacht, S. De Saeger, Food Addit. Contam. 26 (2009) 874-884.
- [40] J.L. Urraca, M.D. Marazuela, M.C. Moreno-Bondi, Anal. Bioanal. Chem. 385 (2006) 1155-1161.
- [41] Q.-Z. Zhu, P. Degelmann, R. Niessner, D. Knopp, Environ. Sci. Technol. 36 (2002) 5411-5420.
- [42] I. Mijangos, F. Navarro-Villoslada, A. Guerreiro, E. Piletska, I. Chianella, K. Karim, A. Turner, S. Piletsky, Biosens. Bioelectron. 22 (2006) 381-387.

- [43] B. Sellergren, K.J. Shea, *J. Chromatogr. A* 635 (1993) 31-49.
- [44] K. Hosoya, Y. Iwakoshi, K. Yoshizako, K. Kimata, N. Tanaka, H. Takehira, J. Haginaka, *J. High. Resolut. Chromatogr.* 22 (1999) 256-260.
- [45] V. Thibert, P. Legeay, F. Chapuis-Hugon, V. Pichon, *Talanta* 88 (2012) 412-419.
- [46] G. Wulff, *Angew. Chem. Int. Ed.* 34 (1995) 1812-1832.
- [47] K. Mosbach, O. Ramstrom, *Nat Biotech* 14 (1996) 163-170.
- [48] L. Ye, P. A. G. Cormack, K. Mosbach, *Anal. Commun.* 36 (1999) 35-38.
- [49] E. Caro, R.M. Marcé, P.A.G. Cormack, D.C. Sherrington, F. Borrull, *Anal. Chim. Acta* 562 (2006) 145-151.
- [50] X. Shi, A. Wu, S. Zheng, R. Li, D. Zhang, *J. Chromatogr. B* 850 (2007) 24-30.
- [51] A.G. Mayes, K. Mosbach, *Anal. Chem.* 68 (1996) 3769-3774.
- [52] K. Hosoya, K. Yoshizako, N. Tanaka, K. Kimata, T. Araki, J. Haginaka, *Chem. Lett.* 23 (1994) 1437-1438.
- [53] J. Haginaka, Y. Sakai, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 22 (2000) 899-907.
- [54] T. Kubo, M. Nomachi, K. Nemoto, T. Sano, K. Hosoya, N. Tanaka, K. Kaya, *Anal. Chim. Acta* 577 (2006) 1-7.
- [55] S. Hjerten, *J. Chromatogr. A* 347 (1985) 191-198.
- [56] J. Courtois, G. Fischer, B. Sellergren, K. Irgum, *J. Chromatogr. A* 1109 (2006) 92-99.
- [57] W. Thongchai, B. Liawruangath, S. Liawruangrath, G.M. Greenway, *Talanta* 82 (2010) 560-566.
- [58] L. Schweitz, L.I. Andersson, S. Nilsson, *J. Chromatogr. A* 792 (1997) 401-409.
- [59] L. Schweitz, L.I. Andersson, S. Nilsson, *Anal. Chim. Acta* 435 (2001) 43-47.
- [60] P. Qu, J. Lei, R. Ouyang, H. Ju, *Anal. Chem.* 81 (2009) 9651-9656.
- [61] P. Qu, J. Lei, L. Zhang, R. Ouyang, H. Ju, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 6115-6121.
- [62] S. Le Moullec, A. Begos, V. Pichon, B. Bellier, *J. Chromatogr. A* 1108 (2006) 7-13.
- [63] H. Sun, F. Qiao, G. Liu, S. Liang, *Anal. Chim. Acta* 625 (2008) 154-159.
- [64] H.-W. Sun, F.-X. Qiao, *J. Chromatogr. A* 1212 (2008) 1-9.
- [65] R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, E. Herrero-Hernández, *J. Chromatogr. A* 1085 (2005) 199-206.
- [66] R.G. da Costa Silva, F. Augusto, *J. Chromatogr. A* 1114 (2006) 216-223.
- [67] E. Caro, R.M. Marcé, P.A.G. Cormack, D.C. Sherrington, F. Borrull, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 2080-2085.
- [68] S. Lordel, F. Chapuis-Hugon, V. Eudes, V. Pichon, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 449-458.
- [69] K. Yoshizako, K. Hosoya, Y. Iwakoshi, K. Kimata, N. Tanaka, *Anal. Chem.* 70 (1998) 386-389.
- [70] F.L. Dickert, M. Tortschanoff, W.E. Bulst, G. Fischerauer, *Anal. Chem.* 71 (1999) 4559-4563.
- [71] F.L. Dickert, P. Achatz, K. Halikias, *Fresenius J. Anal. Chem.* 371 (2001) 11-15.
- [72] J.-P. Lai, R. Niessner, D. Knopp, *Anal. Chim. Acta* 522 (2004) 137-144.
- [73] R.J. Krupadam, B. Bhagat, S.R. Wate, G.L. Bodhe, B. Sellergren, Y. Anjaneyulu, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 2871-2877.
- [74] R.J. Krupadam, M.S. Khan, S.R. Wate, *Water Res.* 44 (2010) 681-688.
- [75] R. Krupadam, B. Bhagat, M. Khan, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 3097-3106.
- [76] W.-L. Ho, Y.-Y. Liu, T.-C. Lin, *Environ. Eng. Sci.* 28 (2011) 421-434.
- [77] X.L. Song, J.H. Li, S.F. Xu, R.J. Ying, J.P. Ma, C.Y. Liao, D.Y. Liu, J.B. Yu, L.X. Chen, *Talanta* 99 (2012) 75-82.
- [78] L. Drabova, M. Tomaniova, K. Kalachova, V. Kocourek, J. Hajslova, J. Pulkralova, *Food Control* 33 (2013) 489-497.

CHAPITRE II : Synthèse et caractérisation d'un MIP pour l'extraction des HAP des huiles alimentaires (article)

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF MOLECULARLY IMPRINTED POLYMERS FOR THE SELECTIVE EXTRACTION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS FROM EDIBLE OILS

Nolwenn Prache¹, Ludivine Ferey^{1,2,3}, Nathalie Delaunay^{1,4,5}, Alain Huertas⁶, Yann Raoul³, Aude Cordin⁷, Karsten Haupt⁷, Valérie Pichon^{1,4,5}

¹ESPCI ParisTech, Laboratory of Physicochemistry of Electrolytes, Colloids and Analytical Sciences (PECSA), 75005 Paris, France

²AgroParisTech, UMR INRA 1145 Ingénierie Procédés Aliments, 75005 Paris, France

³Sofiprotéol, 75008 Paris, France

⁴CNRS, UMR 7195, Paris, France

⁵UPMC Université Paris 06, Paris, France

⁶Lesieur, 92600 Asnières sur Seine, France

⁷Compiègne University of Technology, CNRS UMR 6022, 60200 Compiègne, France

Key words: molecularly imprinted polymer, solid-phase extraction, polycyclic aromatic hydrocarbons, edible oils

Abstract

Molecularly imprinted polymers (MIPs) were synthesized and characterized for the selective extraction of 8 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in oil samples. A screening of several polymerization conditions was performed by testing different monomers and cross-linkers. The selectivity of each imprinted material was evaluated by comparing the retention of the 8 PAHs on a MIP and on its corresponding non-imprinted polymer. The MIP synthesized using methacrylic acid as monomer, trimethylolpropane trimethacrylate as cross-linker and pyrene as template, gives the most promising results. Using the procedure developed in cyclohexane media, all 8 PAHs were retained on the MIP with extraction recoveries above 78 %, while only low recoveries were obtained on the non-imprinted polymer, thus demonstrating the high selectivity of the MIP. For the first time, a MIP was successfully synthesized to selectively extract a mixture of heavy PAHs from a hydrophobic media. Finally, the potential of this imprinted sorbent for the clean-up of spiked sunflower oil samples was evaluated. Although extraction recoveries of PAHs were affected by matrix effect, a high degree of selectivity was maintained in real media.

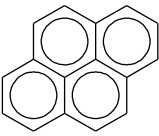
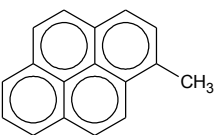
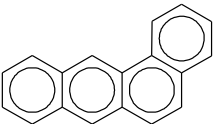
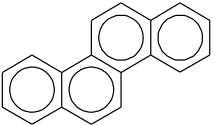
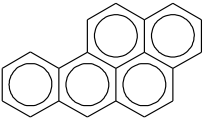
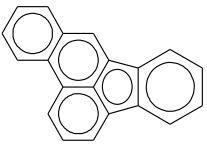
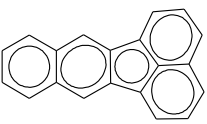
1. Introduction

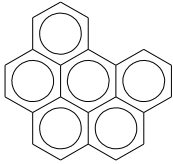
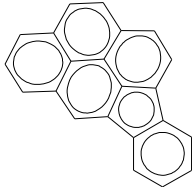
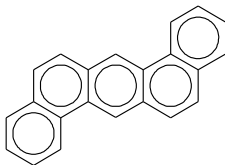
Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are widespread contaminants in the environment mainly arising from a variety of combustion and pyrolysis processes from anthropogenic (incomplete combustion of organic matter such as wood and fossil fuels, motor vehicle exhaust, cigarettes...) [1, 2] and natural (forest fires or volcanoes) [3] sources. Some PAHs are known to have carcinogenic and mutagenic effects caused by the binding of their metabolites to DNA [4]. The presence of PAHs in the environment therefore constitutes a concern of health since humans are exposed to these compounds, for instance, by the air. However, the major route of human exposure to PAHs in non-smoking people is food [5]. Food can be contaminated either by the deposition of contaminated atmospheric particles on crops, used for their production [2, 6] or by industrial food processing methods (heating, drying, and smoking processes) and home food preparation (grilling and roasting processes), which induce the direct contact between food and combustion products [5]. In the case of edible oils, the oilseed drying processes by direct combustion can cause high levels of contamination, thus representing a potential contribution to human dietary exposure to hazardous chemicals [7].

The most monitored PAHs are those included in the United States Environmental Protection Agency (US-EPA) list of priority pollutants called “the 16 US-EPA PAHs” [8]. In 2002, the Scientific Committee on Food of the European Commission (today replaced by the Scientific Panel of the European Food Safety Authority, EFSA) established a list of 15 priority PAHs for monitoring the contamination in food, including some compounds of the US-EPA list [9]. Then, in 2005, the Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization Expert Committee on Food Additives recommended a 16th compound (benzo(c)fluorene), also considered as genotoxic [10], which was officially included into the EU priority PAHs by the EFSA in 2008 [5]. To distinguish this list from the 16 US-EPA PAHs one, it is commonly called the “15+1 EU priority PAHs”. In the same time, the EFSA also concluded that benzo(a)pyrene (BaP) was not a sufficient indicator of PAH occurrence in food and required a special attention to two sets of higher molecular weight PAHs: PAH4 and PAH8, composed of 4 and 8 PAHs, respectively [5]. The maximum levels for both BaP and PAH4, including BaP, benzo(a)anthracene, benzo(b)fluoranthene, and chrysene are presently regulated in relevant food matrices by Commission Regulation (EU) n° 835/2011 of August 19, 2011. The maximum legislation limits for fats and oils are 2 µg/kg and 10 µg/kg for BaP and PAH4, respectively. PAH8 is composed of PAH4 plus benzo(k)fluoranthene, benzo[ghi]perylene, dibenzo[a,h]anthracene, and indeno[1,2,3-cd]pyrene. Those PAHs are also those in common between the two US-EPA and EFSA lists,

and therefore constitute a priority list for environmental and food sample analysis. The structures of these 8 PAHs are presented in Table IV-II-1.

Table IV-II-1. Names, abbreviations, structures, molecular weights and logP of studied PAHs and templates.

PAH	Abbreviation	Structure	M_w (g mol ⁻¹)	logP ^a
Pyrene	PYR		202	5.3
1-Methylpyrene	MePYR		216	5.5
Benzo(a)anthracene	BaA		228	5.7
Chrysene	CHR		228	5.6
Benzo(a)pyrene	BaP		252	6.0
Benzo(b)fluoranthene	BbFA		252	6.6
Benzo(k)fluoranthene	BkFA		252	6.8

PAH	Abbreviation	Structure	M_w (g mol ⁻¹)	logP ^a
Benzo(ghi)perylene	BghiP		276	6.7
Indeno(1,2,3-cd)pyrene	IP		276	6.6
Dibenzo(a,h)anthracene	DBahA		278	6.7

^a INERIS toxicological and environmental data sheets

Fast and reliable analytical methods for the investigation of these “8 priority PAHs” in food and environmental samples are therefore needed to establish clearer contamination profiles. However, analysis of PAHs in vegetable oils is a rather difficult task because of the complexity of the matrix (high fat content, e.g. lipids, fatty acids, triglycerides) and the low levels of PAH concentrations [11]. An appropriate sample clean-up is therefore required to analyze PAHs at trace levels in such complex sample. Solid phase extraction (SPE) still remains the most common sample treatment used for the purification and the preconcentration steps [12]. Nevertheless, extraction on conventional sorbents is mainly based on non-selective interactions, leading to the co-extraction of interfering compounds. Consequently, to improve extraction performances, selective sorbents based on molecular recognition have been developed. First, selective extraction can be performed using immunosorbents which exploit the high affinity and selectivity of antigen-antibody interactions [13]. Even if these sorbents have showed high selectivity, their development is time consuming and expensive. Moreover, immunosorbents are rather dedicated to the analysis of aqueous matrix than organic ones. Therefore, a second type of sorbents, molecularly imprinted polymers (MIP), have appeared in the field of selective SPE. These materials are synthetic polymers that possess specific cavities designed for a targeted analyte, thus allowing a retention mechanism based on molecular recognition [14]. The imprinting process involves several steps: first, a functional monomer is mixed with a template (the targeted

analyte or a structural analogue) to form a complex in a porogen solvent, then, the polymerization is carried out around the complex in the presence of a cross-linking agent and an initiator, and finally, the template is removed from the polymer, leaving specific cavities complementary to the template in size, shape, and functionalities. In parallel of each synthesis, a non-imprinted polymer (NIP) is usually synthesized using the same protocol as for the MIP but without the presence of the template, to assess the selectivity of the retention mechanism involved by the MIP. MIPs have already shown their great potential for selective SPE in many areas such as environmental, food, and pharmaceutical analysis [15-17].

As PAHs are highly hydrophobic compounds without functional groups (Table IV-II-1), strong interactions such as hydrogen bonds and/or electrostatic interactions between PAHs and monomers/cross-linkers are impossible. The only interactions that can be induced in the imprinting and recognition process are the hydrophobic interactions, Van der Waals interactions (dipole-induced/dipole or dipole-induced/dipole-induced) and π - π interactions which are one or two orders of magnitude weaker than the electrostatic forces. This can explain why only few publications have reported the synthesis of molecularly imprinted materials for the selective retention of PAHs. In addition to this, shape recognition can be involved.

Molecularly imprinted polyurethanes to be used as sensitive sensor layers for the detection of PAHs in water, were prepared using bisphenol A as functional monomer and *p,p'*-diisocyanatodiphenylmethane with phloroglucinol as cross-linkers [18, 19]. The synthesis was carried out in tetrahydrofuran using PAHs of different sizes and shapes from naphthalene up to perylene as template molecule. A PAH slightly larger than the template was found to be better included into the cavity than the template itself [18]. This team also introduced the double molecular imprinting; by modifying the nature of both templates, the layers could be optimized with respect to the extraction of two different analytes or of a distinct analyte [19]. However, no comparative studies with the NIP were attempted so that the selectivity of the MIP could not be evaluated.

Pyrene-imprinted microbeads were prepared in chloroform using 4-vinylpyridine (4-VP) as monomer and divinylbenzene (DVB) as cross-linker [20]. The molecular recognition properties of these microbeads towards the template and 22 other related PAHs were deeply studied through quantitative structure-retention relationships between 12 molecular descriptors and the retention of PAHs on imprinted and non-imprinted microbeads in acetonitrile (ACN)/dichloromethane (DCM) (4/1, v/v) media. The microbeads were found to be selective since imprinting factors ($IF = k_{MIP}/k_{NIP}$, where k_{MIP} and k_{NIP} are the PAH retention factors on the MIP and the NIP, respectively) were significantly higher than 1 for most of the selected PAHs. The retention capacity correlated well with molecular descriptors which had

structural character while the effect of molecular descriptors with electronic character was negligible, thus demonstrating that the molecular recognition of PAHs by the MIP was controlled mainly by the shape and dimension of the binding sites through hydrophobic interactions. Again, the aim of this work was not to develop a MIP-SPE procedure and no real samples were analyzed with this sorbent.

The first demonstration of the use of a MIP as SPE sorbent for PAHs was reported for BaP extraction from water and coffee samples [21]. Three monomers (4-VP, methacrylic acid (MAA), and trifluoromethacrylic acid) and two cross-linkers (ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) and DVB) were investigated and the synthesis was performed in DCM using BaP as template molecule. The maximum retention capacity of BaP was found to increase while decreasing the polarity of the monomer and cross-linker, thus indicating that hydrophobic interactions between BaP and the MIP played a key role in the retention process. Consequently, the MIP 4-VP-co-DVB showed the best results in terms of rebinding capacity and selectivity with an imprinting factor of 8.44 in ACN/DCM (85/15, v/v) media. However, this sorbent was used as SPE sorbent for the extraction of BaP only and from aqueous samples.

A PAH MIP synthesized with MAA and EGDMA in ACN, and using a mixture of 6 PAHs as template, was applied to the extraction of these PAHs from aqueous media. The MIP showed higher affinity than the NIP towards PAHs in water with binding capacity of 687 µg/g against 119 µg/g for the NIP and allowed an efficient removal of PAHs from contaminated groundwater. Again, this support was not tested as SPE sorbent and was only applied to aqueous media [22]. The same team evaluated another MIP based on 4-VP and EGDMA, and synthesized in DCM using a mixture of 5 PAHs as template. Binding assays in water proved that the MIP was able to extract PAHs from spiked air dust leachates before their GC-MS analysis [23].

In another study, a MIP was applied to the selective extraction of BaP from a 16 PAH mixture in cigarette smoke [24]. Based on three functional monomers (4-VP, 2-dimethyl(aminoethyl)methacrylate (DMAEM), and MAA) and two cross-linkers (trimethylolpropane trimethacrylate (TRIM) and DVB), 4 MIPs were synthesized in DCM using BaP as template. With a binding capacity of 7.80 µg/g (against 3.88 µg/g for the corresponding NIP) and extraction recovery exceeding 80 % (against 30 % on the NIP) for BaP in ACN, the MIP MAA-co-TRIM gave the best results in terms of strength of retention and selectivity.

Thus, in literature, several PAH MIPs were synthesized for different applications (sensors, adsorption, and SPE) but they were all applied to aqueous media (tap water, lake water,

groundwater, coffee etc.). Indeed, given their hydrophobicity, PAH extraction is favored from aqueous matrix, where retention mechanism can easily be based on hydrophobic interactions between PAHs and monomers.

To our knowledge, only one recent article concerns the use of a MIP dedicated to the selective extraction of PAHs from edible oils [25]. Using a commercially available MIP (SupelMIP^(R) SPE-PAH, Supelco, France) as SPE material, the 15+1 EU PAHs were successfully analyzed by 2D-GC-MS in vegetable oils with recoveries between 70 and 99 % and limits of quantitation ranging from 0.1 to 0.3 µg/kg. However, no data were given for the NIP, so that the selectivity of the MIP could not be demonstrated.

This work deals with the synthesis of a MIP to be used as SPE sorbent for the simultaneous selective extraction of several PAHs from sunflower oils before their chromatographic analysis. In this study, 8 PAHs were targeted: the PAH8 mixture, i.e. those of environmental and food interest. As the exploitation of the results previously described (binding experiments and SPE in aqueous media) does not allow to determine the best conditions to synthesize a MIP for PAH extraction from highly hydrophobic media, several MIPs were synthesized and characterized by studying the retention profile of the 8 PAHs in hydrophobic media. For the first time, NIPs were synthesized and evaluated in parallel to assess the selectivity of the retention mechanism on each MIP. Finally, the most promising MIP was applied to the clean-up of spiked sunflower oils to evaluate its applicability to the selective treatment of real complex samples.

2. Experimental

2.1 Chemicals

Benzo(a)anthracene (> 99.5 %, BaA), benzo(b)fluoranthene (> 99.5 %, BbFA), benzo(a)pyrene (> 99.6 %, BaP), chrysene (> 99.6 %, CHR), and indeno(1,2,3-cd)pyrene (> 99.5 %, IP) at 10 mg/L in acetonitrile (ACN) were purchased from CIL Cluzeau (Sainte-Foy-La-Grande, France). Solid pyrene (> 98.0 %, PYR), 1-methylpyrene (≥ 97.0 %, MePYR), benzo(k)fluoranthene (> 98.0 %, BkFA), benzo(ghi)perylene (> 98.0 %, BghiP), and dibenzo(a,h)anthracene (> 97.0 %, DBaA) were supplied by Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France).

HPLC-grade ACN and methanol (MeOH) were from Carlo Erba (Val de Reuil, France) and HPLC-grade cyclohexane, ethyl acetate, hexane, chloroform, and DCM were purchased from

Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Ammoniac was from Merck. High-purity water was obtained from a Milli-Q purification system (Millipore, Molsheim, France).

Acryloylmorpholine (AMP), benzylmethacrylate (BMA), divinylbenzene (DVB), ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA), methacrylic acid (MAA), trimethylolpropane trimethacrylate (TRIM), tetrahydrofurfurylmethacrylate (THFMA), and 4-vinylpyridine (4-VP) were obtained from Sigma-Aldrich. 2,2'-Azobis (2-isobutyronitrile) (AIBN) was purchased from Fluka. The cross-linker DVB was purified on basic alumina to remove the inhibitor. The monomer 4-VP was distilled before use.

2.2 Instruments and analytical conditions

An Agilent 1200 series (Agilent Technology, Massy, France) HPLC system equipped with an autosampler, a solvent delivery system, and a fluorescence detector (FLD) controlled by Chemstation software was used. The 8 PAHs of interest were separated on the reversed-phase Pursuit 3 PAH column (100 mm x 2.0 mm i.d., 3.0 μ m, Chromoptic, Courtaboeuf, France) maintained at 35°C with a column oven (Croco-cil, Interchim, Montluçon, France). An isocratic mode was used for the analysis consisting of ACN/MeOH/water mixture (40/40/20, v/v/v). The flow rate was set at 0.2 mL/min and the sample injection volume was 5 μ L. The fluorescence detection of the 8 PAHs was performed using the following excitation/emission wavelength program: 260/390 nm from 0 to 10.0 min (determination of BaA and CHR), 255/443 nm from 10.0 to 12.2 min (BbFA), 235/419 nm from 12.2 to 14.5 min (BkFA), 295/413 nm from 14.5 to 17.5 min (BaP), 290/440 nm from 17.5 to 22.0 min (DBaHA), 295/419 nm from 22.0 to 24.2 min (BghiP) and 247/495 nm from 24.2 to 25.5 min (IP).

2.3 Synthesis of the MIPs

For the synthesis of the various MIPs by bulk polymerization, the templates (PYR, MePYR), the monomers (MAA, 4-VP, BMA, BMA/AMP, BMA/THFMA), the cross-linkers (EGDMA, TRIM, DVB), and the initiator (AIBN) were mixed with different porogens (ACN, DCM, chloroform, cyclohexane). The compositions of polymerization mixtures for the different MIPs are described in Table IV-II-2. The polymerization mixture was transferred into a glass tube placed in an ice bath and degassed with nitrogen for 5 min. The tube was sealed and transferred into a thermostated water bath at 60°C for 12 h. After the polymerization, the tube was crushed and the polymer was then ground and manually sieved to obtain particles size

between 25 and 36 μm . A sedimentation with MeOH/water mixture (80/20, v/v) was performed to remove fine particles. 20 mg of each MIP were packed between two frits (20 μm , Sigma-Aldrich) into a 1-mL empty propylene disposable cartridge (Interchim). In order to eliminate reagents from the packed sorbents, particularly the template in the case of MIPs, the following washing steps were carried out: 40 mL of ethyl acetate, 2 mL of MeOH, 2 mL of ethyl acetate, 2 mL of cyclohexane and 2 mL of ethyl acetate. Finally, dried MIPs were kept at 4°C. Non-imprinted polymers (NIPs) were obtained by performing the same procedure in the absence of the template molecule.

Table IV-II-2. Synthesis conditions of MIPs.

MIP	Template	Functional monomer	Cross-linker	Template/monomer/cross-linker molar ratio	Solvent
MIP-1	PYR	MAA	TRIM	1/5/20	DCM
MIP-2	PYR	4-VP	TRIM	1/5/20	DCM
MIP-3	PYR	BMA	TRIM	1/5/20	DCM
MIP-4	PYR	BMA/AMP	TRIM	1/5/2.5/20	DCM
MIP-5	PYR	BMA/THFMA	TRIM	1/5/2.5/20	DCM
MIP-6	PYR	4-VP	DVB	1/8/40	Chloroform
MIP-7	PYR	BMA	DVB	1/8/40	Cyclohexane
MIP-8	PYR	MAA	EGDMA	1/4/80	ACN
MIP-9	MePYR	MAA	TRIM	1/5/20	DCM

ACN: acetonitrile, AMP: acryloylmorpholine, BMA: benzylmethacrylate, DCM: dichloromethane, DVB: divinylbenzene, EGDMA: ethylene glycol dimethacrylate, MAA: methacrylic acid, MePYR: 1-methylpyrene, MIP: molecularly imprinted polymer, PYR: pyrene, THFMA: tetrahydrofurfurylmethacrylate, TRIM: trimethylolpropane trimethacrylate, 4-VP: 4-vinylpyridine

2.4 Characterization of the imprinted sorbents

Before each use, the MIPs/NIPs were conditioned with 4 mL of cyclohexane. 2 mL of cyclohexane spiked with 20 ng of each PAH were percolated through the MIP and NIP cartridges. After a drying step, sorbents were washed using 2 mL of cyclohexane to limit the retention of the analytes by non-specific interactions on the MIP. Once again, the sorbent was dried under vacuum and the analytes were then eluted from the cartridge using 3 mL of ethyl acetate. Before injection in HPLC, percolation, washing, and elution fractions were concentrated to dryness under a gentle stream of nitrogen and reconstituted in 1 mL of a water/ACN mixture (50/50, v/v). After each use, MIPs and NIPs were washed with 2 mL of ethyl acetate and dried under vacuum before their storage.

2.5 Clean-up of oil samples

Sunflower oil samples provided by Lesieur (Coudekerque, France) were spiked at 10 µg/kg with each PAH studied and further diluted by different factors with cyclohexane or hexane. The MIP was first conditioned with 4 mL of cyclohexane. Then, 2 mL of the diluted oil sample were percolated through the cartridge and, after a drying step under vacuum, different washing steps using cyclohexane or hexane were evaluated for their ability to remove lipidic content (e.g. lipids, triglycerides, fatty acids) and to limit the retention of the analytes by non-specific interactions on the MIP. Sorbents were then dried under vacuum and PAHs were eluted using 3 mL of ethyl acetate. Washing and elution fractions were evaporated to dryness, dissolved in different volumes of water/ACN mixture (50/50, v/v) depending on the dilution factor of the oil, and injected in HPLC-FLD. It is worth to note that the high fat content of the percolation fractions prevented their injection.

3. Results and Discussion

3.1 Choice of the MIP synthesis conditions

The selectivity of a MIP depends on the structural and functional complementarities between the cavities and the targeted molecule, i.e. on the type and the strength of the interactions taking place between the analyte and the monomer residues. In a non-covalent imprinting, the interactions involved are weak; therefore targeted analytes possessing multiple functionalities are generally preferred to increase the strength of the interactions established during the extraction procedure and therefore to improve the selective retention. Considering the lack of functional groups in the structure of PAHs, the formation of well-defined and strong interactions with monomers was a real challenge, that is why, different MIPs were synthesized in order to determine in which cases selective interactions could be favored. For the MIP synthesis, a non-covalent approach using PYR as template was chosen. Criteria considered when selecting PYR as structural analogue was its cost, its availability and its size. Indeed, as demonstrated in previous works dealing with the development of imprinted materials for sensors purposes [18, 19], a maximum of selectivity was expected using an imprint molecule smaller than the targeted analytes. Here, as the 8 targeted PAHs contained between 4 and 6 aromatic rings, PYR, composed of four aromatic rings, seemed therefore well adapted. Moreover, if the complete removal of PYR from the MIP was not achieved, any leakage occurring during the characterization study would not affect the quantitation of targeted PAHs. Another advantage of PYR was its lower hydrophobicity compared to the

other 8 PAHs and therefore its higher solubility in the different porogens used for the synthesis of MIPs.

Given the lipophilic properties of oil samples, only non-polar solvents such as cyclohexane or hexane could be used for their dilution before the percolation step. As MIPs were expected to exhibit enhanced selectivity in a solvent close to the one used for the synthesis, MIPs were synthesized in non-protic and moderately to non-polar solvents (ACN, chloroform, DCM, and cyclohexane). Such media were expected to enhance aromatic interactions (π - π , cation- π or electron donor-acceptor interactions) between PAHs, having numerous π electrons plus electron-donor property, and functional monomers. Previous works have already demonstrated the possibility of creating cavities by using MAA or 4-VP as monomers, EGDMA, TRIM or DVB as cross-linkers and ACN, DCM or chloroform as solvents [21-24]. As presented in Table IV-II-2, MIPs 1, 2, 3, 4 and 5 were synthesized using MAA, 4-VP, BMA, BMA/AMP (5/2.5), BMA/THFMA (5/2.5) as monomers, respectively, with PYR as template. A non-protic and non-polar porogen, DCM, was selected to favor the formation of interactions between the monomers and the template. To obtain a highly cross-linked polymer, an excess of TRIM was added to the polymerization mixture. For comparison purposes, a template/monomer/cross-linker molar ratio of 1/5/20 was used for the synthesis of each MIP. Different monomers were tested to evaluate how they could impact the retention of PAHs on the MIPs. 4-VP and BMA were also selected to study their potential to develop supplementary π - π interactions with PAHs. Then, other MIPs (MIPs 6 and 7) were prepared with 4-VP and BMA as monomers, respectively, but using DVB as cross-linking agent to favor π - π interactions with PAHs during the synthesis and the percolation step. For MIP-6, chloroform, whose polarity is similar to DCM, was preferred as a porogen and a template/monomer/cross-linker molar ratio of 1/8/40 was fixed, on the basis of a previous study [20]. MIP-7 was synthesized in cyclohexane, a non polar solvent, to try to enhance interactions between PYR and BMA during the polymerization reaction with again a template/monomer/cross-linker molar ratio of 1/8/40. The effect of a third cross-linker, EGDMA, in combinaison with MAA as a functional monomer was also studied through the synthesis of MIP-8. In this case, the synthesis was carried out in ACN using a template/monomer/cross-linker molar ratio of 1/4/80 as already reported in literature [22]. A last MIP (MIP-9) was prepared by replacing PYR by MePYR, keeping the same conditions of synthesis as for MIP-1, to study the influence of the template on selectivity. In all cases, a NIP was obtained by applying the same procedure of polymerization in the absence of the template, to assess the presence of specific binding sites in the corresponding MIPs.

3.2 Selectivity of the MIPs toward the eight PAHs

As MIP selectivity results from the presence of specific cavities in its network, it was evaluated by comparing the retention of PAHs on the MIP and on the NIP, when applying the same extraction procedure. As regards to the development of the SPE procedure, the cyclohexane was chosen as percolation solvent since it is one of the few solvents able to dilute oils. Moreover, this non-protic solvent is less polar than the porogens used for the synthesis (ACN, chloroform, and DCM), thus favoring the establishment of aromatic interactions with PAHs during the percolation step. It is worthy to note that it would have been better to adapt the percolation solvent to each type of monomer, nevertheless, the targeted matrix (edible oils) required to use cyclohexane for its dilution. Cyclohexane (2 mL) spiked with 20 ng of each PAH was percolated onto 20 mg of the MIPs and the NIPs. A washing solution, composed of 2 mL of cyclohexane, was applied to remove the non-specific interactions, i.e. to disrupt interactions formed out of the cavities. Indeed, the aim was to develop a selective SPE procedure by limiting the retention on the NIP through non-specific interactions, without affecting the retention within the cavities of the MIP. Finally, to recover PAHs from the cartridges, 3 mL of ethyl acetate was used to totally disrupt the interactions between PAHs and the polymers.

Resulting extraction recoveries of the 8 priority PAHs on MIPs and NIPs are reported in Table IV-II-3. As can be seen, the application of this SPE procedure to MIPs 3, 4 and 5 led to poor extractions recoveries of about 10 % for the lightest PAHs (namely BaA and CHR), 30-50 % for the intermediate PAHs (BbFA, BkFA, and BaP) and superior to 55 % for the heaviest PAHs (DBahA, BghiP and IP). The same behavior was noticed with the corresponding NIPs, thus proving the poor selectivity of those MIPs. The low retention combined with the poor selectivity of these three MIPs could be explained by the weakness of the interactions formed between the monomers and the PAHs, thus preventing the formation of well-designed cavities during the synthesis. Concerning results obtained with 4-VP as monomer (MIP-2), a more polar monomer than BMA (logP of 1.55 and 2.53 for 4-VP and BMA, respectively) with acido-basic properties, a low selectivity was demonstrated for all PAHs since a slightly higher retention was obtained for the 8 PAHs on the MIP than on the NIP. However, the retention of the low molecular weight PAHs was rather low. A higher strength of interactions between PAHs and MIP-1, which was obtained by replacing 4-VP by MAA, an even more polar monomer (logP 0.93), was observed. Indeed, the 8 PAHs were strongly retained on the MIP-1 with extraction recoveries of around 80 % for CHR and BaA and 100 % for heavier PAHs. For all PAHs, a lower retention was obtained on the corresponding NIP; extraction recoveries were only 25 % for CHR and BaA, between 50-

55 % for BbFA, BkFA and BaP, and between 60-85 % for DBahA, BghiP and IP, thus demonstrating also a higher selectivity than with MIP-2. These results prove that cavities formed with MAA allowed selective retention of PAHs, as already evidenced [24], and that electron donor-acceptor interactions seem to prevail over π - π interactions.

What could be the nature of the interactions between PAHs and the monomers? Since PAHs are unsubstituted by polar groups, only Van der Waals and aromatic interactions are likely to be involved. In the case of PAHs, Van der Waals forces are mainly dipole-induced/dipole interactions (Debye forces) and dipole-induced/dipole-induced interactions (Heitler-London dispersion forces). These interactions are the weakest of all molecular interactions and they arise because at any instant, molecules have unsymmetric electronic distribution which creates small dipoles which can induce complementary dipoles in the neighboring surface. Electron transfer from PAHs to some monomers is also consistent with the well-known donor character of PAHs. As opposed to Van der Waals forces that are energetically weak and non-specific, aromatic interactions are specific, directed, and energetically stronger. Both types of interactions are consistent with the fact that retention on MIPs is enhanced by increasing molecular size. Indeed, within the PAH series, the larger the molecular size, the larger the Van der Waals and aromatic interactions developed with the monomers inside the specific cavities.

MIP-6 was synthesized with 4-VP as monomer and DVB as cross-linker; others conditions of polymerization being the same as those described before [20]. The resulting extraction recoveries were lower than those obtained on MIP-2, prepared with the same monomer (4-VP) but with TRIM as cross-linker, thus confirming that π - π interactions with DVB did not strongly contribute to the retention mechanism. Moreover, the use of DVB did not allow the formation of specific cavities since the degree of selectivity obtained with MIP-6 was low, especially for light PAHs. The highest retention and selectivity of MIP-2 could also be explained by the structure of TRIM, a “three-arm” cross-linker which was supposed to create a highly cross-linked polymer, thus improving the definition of its specific cavities. Similar behaviors are observed by comparing extraction recoveries of PAHs on MIP-3 and MIP-7, both synthesized with BMA as monomer with TRIM and DVB as cross-linker, respectively: the very low amounts of PAHs recovered in the elution fraction of MIP-7 (recoveries between 7 and 47 %) proved the difficulty to develop interactions between DVB and the targeted analytes.

To further study the effect of the nature of the cross-linker, a third one, EGDMA, was tested in combinaison with MAA by synthesizing MIP-8 in the same conditions as in previously published works [22]. As opposed to MIP-1, prepared with TRIM as cross-linker, poor retention and selectivity were observed on MIP-8. In fact, extraction recoveries did not

exceed 60 % for the 8 PAHs and no difference in retention between the MIP and the NIP was noted, thus evidencing that EGDMA was not able to create specific binding sites in the polymeric structure. Once again, the better performances of the extraction achieved with TRIM were probably due to its three methacrylate functions favoring the creation of well-designed cavities. This difference of behavior between the two MIPs could also come from the porogen used for the synthesis of MIP-8, i.e. ACN which is more polar than DCM and therefore does not favor the formation of donor-acceptor interactions between the template and the MAA monomer.

The impact of the template was then investigated through the study of MIP-9 which was synthesized in the same conditions as MIP-1 but by replacing PYR with MePYR. Using MePYR as template, the strength of retention and the selectivity were lower than those achieved using PYR. It is also worthy to note that the extraction procedure performed on MIP-9 had a bad repeatability, leading to recoveries with RSD values between 7 and 34 %. In this study, the structure of the template was therefore found to be essential to create highly specific cavities.

For all 8 PAHs, best results in terms of extraction recoveries and selectivity were therefore obtained using MAA as monomer and TRIM as cross-linker (MIP-1). Most of PAHs had recoveries in the elution fraction of the MIP around 100 % and a high selectivity was also achieved with recoveries lower than 55 % for most PAHs in the elution fraction of the NIP, thus demonstrating that the extraction procedure was able to efficiently disrupt non-specific interactions formed between PAHs and the NIP. Moreover, after applying the extraction procedure in three replicates, the repeatability of the extraction on MIP-1 was found satisfactory with RSD values lower than 9 %.

Table IV-II-3. Extraction recoveries of the 8 priority PAHs obtained on the different MIPs, prepared according to conditions in Table IV-II-2, and on their corresponding NIPs; percolation: 2 mL of cyclohexane spiked with 20 ng of the 8 PAHs; washing: 2 mL of cyclohexane; elution: 3 mL of ethyl acetate (average value $\pm$ standard deviation shown as percentages, n = 3, except for MIPs 2 and 3 (n = 2) and for MIPs 4 and 5 (n = 1)).

PAH	SPE cartridge																	
	MIP-1	NIP-1	MIP-2	NIP-2	MIP-3	NIP-3	MIP-4	NIP-4	MIP-5	NIP-5	MIP-6	NIP-6	MIP-7	NIP-7	MIP-8	NIP-8	MIP-9	NIP-9
BaA	78 $\pm$ 6	25 $\pm$ 6	52	37	8	10	10	14	11	11	20 $\pm$ 3	16 $\pm$ 3	7 $\pm$ 0	1 $\pm$ 2	23 $\pm$ 5	26 $\pm$ 4	33 $\pm$ 7	19 $\pm$ 11
CHR	83 $\pm$ 6	27 $\pm$ 5	54	37	9	11	12	15	12	12	28 $\pm$ 5	19 $\pm$ 3	10 $\pm$ 1	1 $\pm$ 2	26 $\pm$ 5	27 $\pm$ 5	33 $\pm$ 7	19 $\pm$ 10
BbFA	103 $\pm$ 8	56 $\pm$ 4	89	68	39	40	51	65	49	44	70 $\pm$ 9	43 $\pm$ 5	20 $\pm$ 3	2 $\pm$ 3	35 $\pm$ 8	36 $\pm$ 7	60 $\pm$ 25	43 $\pm$ 23
BkFA	104 $\pm$ 7	51 $\pm$ 6	85	63	30	32	42	53	42	38	48 $\pm$ 7	32 $\pm$ 3	10 $\pm$ 1	2 $\pm$ 2	32 $\pm$ 7	33 $\pm$ 6	54 $\pm$ 21	38 $\pm$ 19
BaP	103 $\pm$ 8	49 $\pm$ 7	89	64	36	34	46	56	46	40	85 $\pm$ 13	42 $\pm$ 13	33 $\pm$ 5	3 $\pm$ 3	35 $\pm$ 7	34 $\pm$ 7	52 $\pm$ 26	38 $\pm$ 18
DBahA	108 $\pm$ 7	86 $\pm$ 2	99	86	81	79	82	115	71	68	81 $\pm$ 12	60 $\pm$ 6	15 $\pm$ 1	4 $\pm$ 4	60 $\pm$ 12	63 $\pm$ 9	79 $\pm$ 22	64 $\pm$ 24
BghiP	104 $\pm$ 7	63 $\pm$ 4	95	74	55	53	63	84	61	54	96 $\pm$ 9	64 $\pm$ 8	47 $\pm$ 8	4 $\pm$ 4	31 $\pm$ 7	30 $\pm$ 7	61 $\pm$ 23	46 $\pm$ 18
IP	107 $\pm$ 9	74 $\pm$ 10	99	94	71	27	78	72	56	52	72 $\pm$ 45	34 $\pm$ 35	43 $\pm$ 11	0	53 $\pm$ 12	53 $\pm$ 13	36 $\pm$ 34	29 $\pm$ 26

3.3 Extraction of PAHs from oil samples

The MIP-1 was next applied to the clean-up of sunflower oil samples spiked with the 8 priority PAHs at 10 µg/kg each. For the first extractions, oils were only diluted by a factor of 2 with cyclohexane before being percolated on the MIP. Unfortunately, in these conditions, almost 100 % of PAHs were lost during the percolation step, thus indicating that the retention of PAHs was highly affected by the matrix components. To get closer to the conditions in pure media and therefore to improve the retention of PAHs on the MIP, the dilution factor of sunflower oils was increased. Experiments were carried out with samples diluted by factors of 5, 10, and 20 with cyclohexane. Best results were obtained with a dilution factor of 10, since an increase in the dilution factor to 20 did not improve the amounts of PAHs retained on the MIP during the percolation step. The selectivity of MIP-1 was therefore tested by percolating 2 mL of diluted oil, first spiked with the 8 PAHs at 10 µg/kg and then diluted by a factor of 10 with cyclohexane, and by applying the extraction procedure previously described. The resulting elution profiles are presented in Figure IV-II-1.

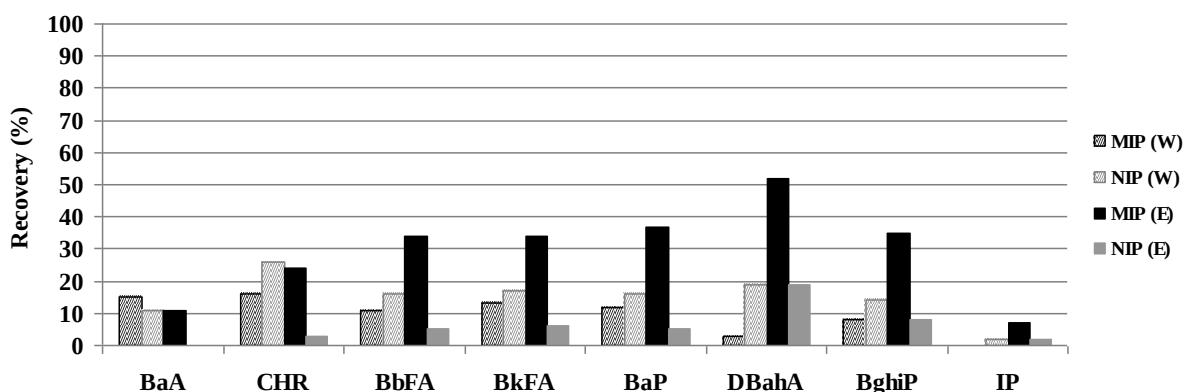


Figure IV-II-1. Elution profiles of the 8 studied PAHs from MIP-1 and from its corresponding NIP after the percolation of a 2 mL of a diluted sunflower oil (oil first spiked with the 8 PAHs at 10 µg/kg each and then diluted by a factor of 10 in cyclohexane). Washing and elution conditions are similar to those of Table IV-II-1. W, washing; E, elution.

Only washing and elution fractions are represented since the percolation ones could not be analyzed due to its high fat content (lipids, triglycerides, fatty acids) leading to bi-phasic media. Upon increasing the dilution factor of oils from 2 to 10, although higher amounts of PAHs were retained on the imprinted sorbent, losses above 45 % of PAHs were still observed during the percolation step, thus confirming the important matrix effect on the extraction efficiency. Indeed, for all 8 PAHs, the recoveries obtained on the MIP-1 were noticeably lower (only 10-25 % for BaA, CHR, and IP, around 35 % for BbFA, BkFA, BaP, and BghiP, and 50 % for DBahA) than those obtained by percolating pure cyclohexane.

However, the selectivity of the procedure was maintained since low recoveries, between 0 and 19 %, were obtained on the corresponding NIP. Owing to this high selectivity, after a purification on the MIP, no co-elution between PAHs and interfering compounds, that could interfere the quantitation, was noticed (Figure IV-II-2).

The whole analytical method that includes a purification on MIP-1 of a spiked sunflower oil and the analysis of the elution fraction by HPLC/FLD gave rise to preliminary estimations of the limits of detection (LOD) between 0.3 and 3.0 $\mu\text{g/kg}$ of oil (except IP for which a LOD of 5.1 $\mu\text{g/kg}$ was obtained). Those limits were estimated by considering a signal-to-noise ratio of 3 using the HPLC/FLD chromatogram corresponding to the analysis of a sunflower oil spiked with 8 PAHs at 10 $\mu\text{g/kg}$ each, diluted by a factor of 10 in cyclohexane, and purified on the MIP (Figure IV-II-2).

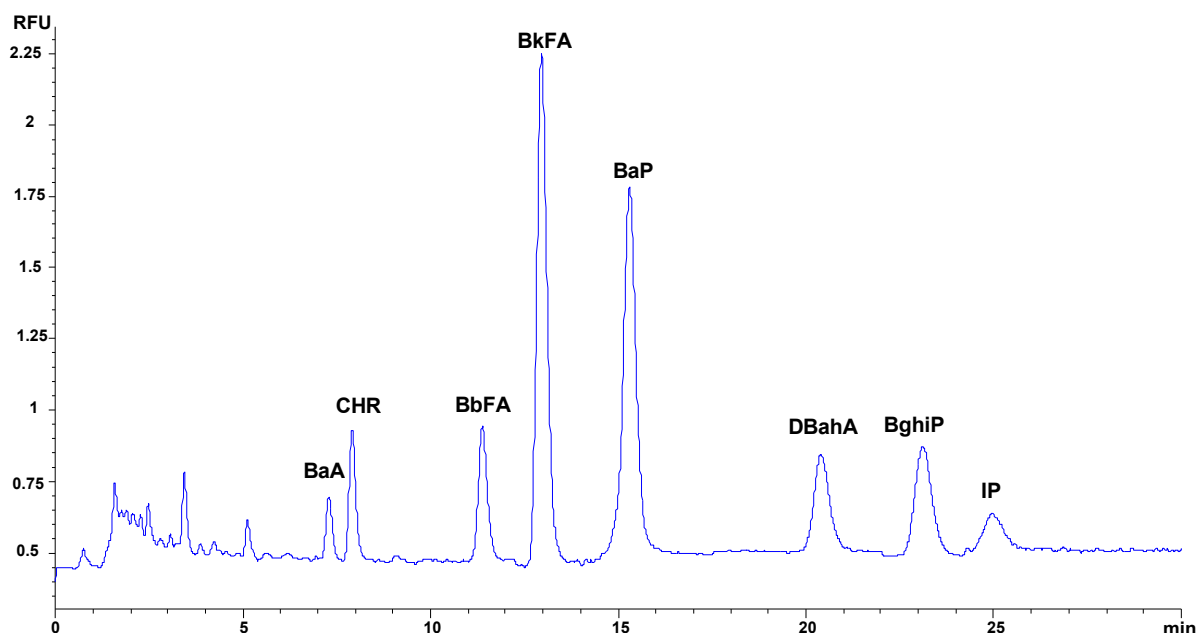


Figure IV-II-2. Chromatogram corresponding to the HPLC/FLD analysis of the elution fraction obtained after percolation on MIP-1 of 2 mL of a diluted sunflower oil (oil first spiked with 8 PAHs at 10 $\mu\text{g/kg}$ each and then diluted by a factor of 10 in cyclohexane). Other conditions: see experimental section.

An attempt of improvement of the extraction procedure was made by replacing cyclohexane with hexane, an even less polar solvent, for the dilution of oils to favor PAH retention on MIP. Nevertheless, the same elution profiles were obtained and the retention of PAHs on the MIP was not improved. Then, as losses between 5 and 15 % of PAHs occurred during the washing step, the eluting power of the washing solution was decreased by percolating 1 mL of hexane followed by 1 mL of cyclohexane instead of the 2 mL of cyclohexane as previously used, but results were not improved.

4. Conclusions

In this study, several MIPs have been investigated for the simultaneous selective extraction of 8 PAHs from sunflower oil samples. The MIP synthesized with MAA as monomer and TRIM as cross-linker in DCM demonstrated the best results in terms of retention and selectivity. This sorbent allowed the selective extraction of all 8 PAHs with high extraction recoveries (> 80 %) from pure cyclohexane media. Its cross-reactivity towards the 8 PAHs was an important aspect for their analysis in oil samples since they are listed as priority pollutants by the European Food Safety Authority. Finally, the extraction of the 8 PAHs from a real oil sample spiked at low levels was performed on the MIP and extraction recoveries lower than those obtained in pure media were recorded, evidencing the high matrix effect in this case. However, a high degree of selectivity was maintained for all PAHs, thus proving that the use of such MIP is promising for the selective extraction of PAHs from oil samples. However, the optimization of the MIP synthesis or/and of extraction procedure, will undoubtedly improve the extraction recoveries of PAHs on the MIP.

References

- [1] R. Simon, J.A. Gómez Ruiz, C. von Holst, T. Wenzl, E. Anklaam, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 1397.
- [2] T. Wenzl, R. Simon, E. Anklaam, J. Kleiner, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 716-725.
- [3] D.L. Poster, M.M. Schantz, L.C. Sander, S.A. Wise, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 859.
- [4] M. Rojas, B. Marie, J.M. Vignaud, N. Martinet, J. Siat, G. Grosdidier, I. Cascorbi, K. Alexandrov, *Cancer Lett.* 207 (2004) 157-163.
- [5] Polycyclic aromatic hydrocarbons, scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain, *EFSA J.* 724 (2008) 1.
- [6] D.H. Phillips, *Mutat. Res-Gen. Tox. En.* 443 (1999) 139-147.
- [7] W. Moreda, M.C. Pérez-Camino, A. Cert, *J. Chromatogr. A* 936 (2001) 159-171.
- [8] United States Environmental Protection Agency, Appendix A to 40 CFR Part 423, Available on: <http://www.epa.gov/region1/npdes/permits/generic/prioritypollutants.pdf>.
- [9] European Commission, Opinion of the Scientific Committee on Food on the Risks to Human Health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food SCF/CS/CNTM/PAF/29/Final, 4 December 2002.
- [10] Summary and Conclusions of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, in: Sixty-Fourth meeting, Rome, 2005 (JECFA/64/SC).
- [11] P. Plaza-Bolaños, A.G. Frenich, J.L.M. Vidal, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 6303-6326.
- [12] V. Pichon, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 195-215.
- [13] M.-C. Hennion, V. Pichon, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 29-52.
- [14] K. Haupt, *Anal. Chem.* 75 (2003) 376 A-383 A.
- [15] V. Pichon, *J. Chromatogr. A* 1152 (2007) 41-53.
- [16] V. Pichon, F. Chapuis-Hugon, *Anal. Chim. Acta* 622 (2008) 48-61.
- [17] C. He, Y. Long, J. Pan, K. Li, F. Liu, *J. Biochem. Bioph. Methods* 70 (2007) 133-150.
- [18] F.L. Dickert, M. Tortschanoff, W.E. Bulst, G. Fischerauer, *Anal. Chem.* 71 (1999) 4559-4563.
- [19] F.L. Dickert, P. Achatz, K. Halikias, *Fresenius J. Anal. Chem.* 371 (2001) 11-15.
- [20] C. Baggiani, L. Anfossi, P. Baravalle, C. Giovannoli, G. Giraudi, *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 413-422.
- [21] J.-P. Lai, R. Niessner, D. Knopp, *Anal. Chim. Acta* 522 (2004) 137-144.
- [22] R.J. Krupadam, M.S. Khan, S.R. Wate, *Water Res.* 44 (2010) 681-688.
- [23] R. Krupadam, B. Bhagat, M. Khan, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 3097-3106.
- [24] W.-L. Ho, Y.-Y. Liu, T.-C. Lin, *Environ. Eng. Sci.* 28 (2011) 421-434.
- [25] L. Drabova, M. Tomaniova, K. Kalachova, V. Kocourek, J. Hajslova, J. Pulkrabova, *Food Control* 33 (2013) 489-497.

CONCLUSION

L'objectif de ces travaux était de développer un polymère à empreintes moléculaires (MIP) en vue d'une extraction sélective de huit HAP à partir d'huiles de tournesol. Pour cela, plusieurs MIP ont, tout d'abord, été synthétisés par notre partenaire (l'équipe Génie Enzymatique et Cellulaire de l'UTC de Compiègne). Un criblage des conditions de polymérisation a été réalisé en faisant varier la nature du monomère et de l'agent réticulant dans le but de former des cavités spécifiques vis-à-vis des HAP.

En milieu pur, les différents supports ont ensuite été caractérisés au laboratoire à travers l'étude de leurs profils d'élution en extraction sur phase solide (SPE). Le pouvoir rétentif de chaque MIP a été évalué en étudiant les rendements d'extraction. Leur sélectivité a quant à elle été estimée en appliquant, en parallèle, la même procédure d'extraction sur le polymère non imprimé (NIP), i.e. synthétisé en absence de molécule modèle.

Parmi les neuf MIP organiques testés, le MIP synthétisé dans le dichlorométhane à partir de l'acide méthacrylique comme monomère et du triméthylolpropane triméthacrylate comme agent réticulant s'est montré le plus prometteur en termes de capacité de rétention et de sélectivité. En effet, les taux de récupération obtenus pour la fraction d'élution atteignent 100 % sur le MIP (à l'exception du BaA et du CHR pour lesquels les rendements d'extraction sont d'environ 80 %) et sont inférieurs à 55 % sur le NIP (excepté pour DBahA, BghiP et IP dont les rendements d'extraction sont compris entre 60 et 85 %). La rétention des HAP sur le support est alors probablement due au développement d'interactions de type Van der Waals ou transfert de charge.

Enfin, ce MIP a été appliqué à l'extraction d'une huile de tournesol dopée. Des rendements d'extraction plus faibles que ceux calculés en milieu pur ont été obtenus (inférieurs à 40 % excepté pour DBahA (50 %)), dénotant un fort effet de matrice sur la rétention des HAP. Toutefois, la sélectivité de l'extraction a été maintenue puisque les rendements d'extraction sur le NIP n'excédaient pas 10 % (excepté pour DBahA (19 %)). Cela a permis une bonne purification de l'échantillon puisque aucune co-élution de composés interférents n'a été identifiée. Les huit HAP ont ainsi pu être détectés avec en première estimation des limites de détection (LOD) allant de 0,3 à 3,0 µg/kg d'huile (à l'exception de IP (5,1 µg/kg)).

Ce travail a donc démontré le réel potentiel de l'utilisation d'un MIP pour une extraction sélective et simultanée de plusieurs HAP à partir de milieux hydrophobes. Cependant, une optimisation de la procédure d'extraction et/ou de la synthèse du MIP permettra certainement d'augmenter les rendements d'extraction et, par conséquent, d'améliorer les LODs. La répétabilité de la synthèse du MIP devra alors être impérativement vérifiée. Enfin, il sera intéressant de procéder à des extractions sur des supports SPE conventionnels dans

le but de démontrer le réel apport du MIP pour la purification d'échantillons complexes de type huiles alimentaires.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Dans le cadre de ce travail de thèse, de nouvelles méthodes analytiques ont été développées, en vue de leur intégration dans un système portable d'analyse des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dans les huiles alimentaires. Dans une première partie, des méthodes de séparation de mélanges inédits d'HAP ont été développées en électrophorèse capillaire de zone modifiée par des cyclodextrines, couplée à une détection de fluorescence induite par laser. La première étape a consisté à déterminer les conditions opératoires permettant d'optimiser la répétabilité des analyses. L'ajout de modificateurs organiques dans l'électrolyte et l'échantillon, l'utilisation de flacons en verre, l'optimisation de la séquence de rinçage et l'ajout d'un étalon interne sont autant de paramètres qui y ont contribué. Finalement, les coefficients de variation calculés pour six analyses consécutives sont respectivement inférieurs à 2% et 5% pour les temps de migration et les aires corrigées normalisées. Ensuite, les séparations de deux mélanges d'intérêt ont été optimisées en suivant des stratégies multivariées basées sur les plans d'expériences. Un premier mélange, constitué des huit HAP communs aux listes de polluants prioritaires établies par l'agence de protection de l'environnement des Etats-Unis et l'agence européenne de sécurité sanitaire des aliments, a été analysé en moins de 7 min. Un second mélange, composé de dix-neuf HAP également listés par ces deux organismes, a été séparé en moins de 18 min. Enfin, ces méthodes de séparation ont été appliquées avec succès à des extraits d'huiles alimentaires dopés.

Dans une deuxième partie, il a été question de transférer la méthode de séparation des huit HAP au format microsystème. La prise en main des étapes d'injection, de séparation et de détection a été facilitée par l'étude d'un composé modèle dans un tampon borate, l'ombelliférone. Il a tout d'abord été question de déterminer l'intensité de retrait minimale à appliquer pendant l'analyse pour éviter toute fuite de l'échantillon dans le canal de séparation. Etant donné la faible sensibilité du système de détection sur puce disponible au laboratoire (microscope inversé équipé d'une lampe à mercure et d'une caméra CCD), il a ensuite fallu améliorer la limite de quantification de l'ombelliférone. Dans cette optique, les quantités d'échantillon injectées en mode dynamique et la sensibilité de la détection ont été optimisées. Chacun des dix-neuf HAP a ensuite été analysé avec l'électrolyte de séparation optimisé grâce au plan d'expériences. Cependant, seuls quatre HAP ont été détectés par la lampe à mercure et les différents paramètres expérimentaux tels que la mobilité électroosmotique, les efficacités de pics, etc, se sont trouvés modifiés en présence de

l'électrolyte à base de cyclodextrines. De plus, étant donné la faible mobilité électroosmotique associée à l'électrolyte optimisé, le retrait de l'échantillon est devenu plus sensible aux écoulements hydrodynamiques parasites, avec, comme principale conséquence, l'apparition régulière de fuites d'échantillon dans le canal de séparation. Ainsi, les étapes d'injection et de détection devront être ré-optimisées mais le point critique restera, sûrement, la sensibilité du système de détection. Toutefois, dans les conditions optimales prédites, ces quatre composés ont été séparés en moins de 4 min en présence de l'ombelliférone.

Dans une dernière partie, l'étude a porté sur la synthèse d'un polymère à empreintes moléculaires (MIP) permettant d'extraire les huit HAP prioritaires d'huiles alimentaires. En s'inspirant de la littérature, plusieurs MIP ont tout d'abord été synthétisés par notre partenaire de l'UTC en modifiant la nature des monomères et agents réticulant. La sélectivité de chaque MIP a ensuite été évaluée par comparaison des rendements d'extraction des huit HAP obtenus sur le MIP et sur le polymère non-imprimé correspondant. Ces premières caractérisations ont été réalisées en milieu pur apolaire. Un MIP synthétisé à partir d'acide méthacrylique et de triméthacrylate de triméthylolpropane a donné les meilleurs résultats en termes de capacité de rétention et de sélectivité. Il a donc été testé pour l'extraction des huit HAP contenus dans des échantillons d'huile de tournesol après dopage. En milieu réel, bien que la sélectivité d'extraction ait été maintenue, les rendements d'extraction sont devenus insuffisants, démontrant ainsi un important effet de matrice.

Ces différents travaux ouvrent de nombreuses perspectives. Concernant le développement des microsystèmes, il sera nécessaire de coupler un système de détection plus sensible et portable. Une première solution consisterait à coupler le laser He/Cd ($\lambda_{\text{exc}} = 325 \text{ nm}$) à la puce. Cela permettrait d'améliorer la sensibilité de détection des HAP et donc de poursuivre le travail initié au laboratoire. La mise en œuvre d'un laser de taille réduite sera essentielle pour répondre à la problématique de portabilité de l'industriel. Une deuxième possibilité serait d'utiliser une diode électroluminescente (LED), bien plus compacte que le laser He/Cd. Cependant, pour une même longueur d'onde, la LED présente un rayonnement incident plus diffus que celui d'un laser, ce qui dégrade la sensibilité de la détection.

Ensuite, il serait également intéressant de retravailler la géométrie des canaux et des réservoirs de la puce, en vue de minimiser les écoulements hydrodynamiques interférents. En effet, la présence de tels écoulements parasites dégrade la répétabilité des analyses. Ce phénomène pourrait être réduit par un accroissement de la résistance hydraulique des

canaux, via une augmentation de leur longueur ou une diminution de leur section, et un élargissement des réservoirs. De plus, la conception de canaux plus étroits aurait pour avantage supplémentaire d'améliorer la dissipation de la chaleur générée par le champ électrique appliqué lors de l'analyse. Les phénomènes d'échauffement peuvent en effet être responsables de la dégradation des efficacités des pics. De même, les variations de température entraînent des modifications des constantes de complexation des HAP avec les cyclodextrines, ce qui dégrade la répétabilité des analyses. Un dispositif de thermostatisation devra donc être envisagé.

Concernant les polymères à empreintes moléculaires, il sera nécessaire d'optimiser davantage les procédures d'extraction (natures et volumes des solvants utilisés) pour en améliorer les rendements. Si les résultats restent insatisfaisants avec le MIP retenu pour cette étude, il faudra continuer le criblage des conditions de synthèse jusqu'à obtenir un MIP capable d'extraire les HAP de l'huile avec de bons rendements et une bonne sélectivité. Ce MIP devra enfin être miniaturisé pour une future utilisation hors ligne voire, in fine, en ligne avec les étapes de séparation et de détection.

ANNEXES

Annexe A – L'électrophorèse capillaire de zone

A.1. Principe de l'électrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire est une technique d'analyse qui permet la séparation de composés ionisés ou ionisables par différence de vitesses de migration sous l'influence d'un champ électrique.

A.2. Phénomènes de transport

La séparation de composés en électrophorèse capillaire est régie par deux mécanismes de transport : la migration électrophorétique (électromigration) et l'écoulement électroosmotique (électroomose).

A.2.1. Mobilité électrophorétique

La migration électrophorétique provient du déplacement d'espèces présentant une charge effective globale lorsqu'elles sont soumises à un champ électrique. La vitesse électrophorétique (v_{ep}) d'une espèce est alors fonction du champ électrique (E) et de sa mobilité électrophorétique (μ_{ep}) :

$$v_{ep} = \mu_{ep} E \quad (\text{eq.1})$$

La migration électrophorétique s'effectue dans le sens du champ électrique lorsque l'espèce est chargée positivement et dans le sens opposé lorsqu'elle est chargée négativement.

La mobilité électrophorétique d'un ion (μ_{ep}) est proportionnelle à son rapport charge/taille :

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta R} \quad (\text{eq.2})$$

avec : q , la charge de l'ion ; η , la viscosité du solvant et R , le rayon hydrodynamique de l'ion solvaté (modèle de Stokes).

Un ion sera donc d'autant plus mobile que sa charge sera élevée et que son rayon hydrodynamique sera faible.

Expérimentalement, la mobilité électrophorétique d'un ion dépend du pH, de la force ionique, de la viscosité et de la composition de l'électrolyte (ajout de solvant ou d'espèces complexantes) et de la température.

A.2.2. La mobilité électroosmotique

A un pH supérieur à 2, les groupements silanol présents sur les parois du capillaire de silice sont partiellement sous forme déprotonée, tapissant alors la surface du capillaire de charges négatives. Lorsque le capillaire est rempli d'un électrolyte, les cations solvatés qui y sont présents, viennent alors former par interactions électrostatiques une double couche électrique à l'interface silice/électrolyte, caractérisée par un potentiel électrocinétique ou potentiel zéta (ζ) :

$$\zeta = \frac{\delta\sigma}{\varepsilon_0\varepsilon_r} \quad (\text{eq.3})$$

avec : ε_0 , la permittivité du vide ; ε_r , la constante diélectrique du solvant ; δ , l'épaisseur de la double couche électrostatique et σ , la densité de charge de surface.

Cette double couche électrostatique est constituée d'une couche dite compacte et d'une couche dite diffuse (Figure A-1).

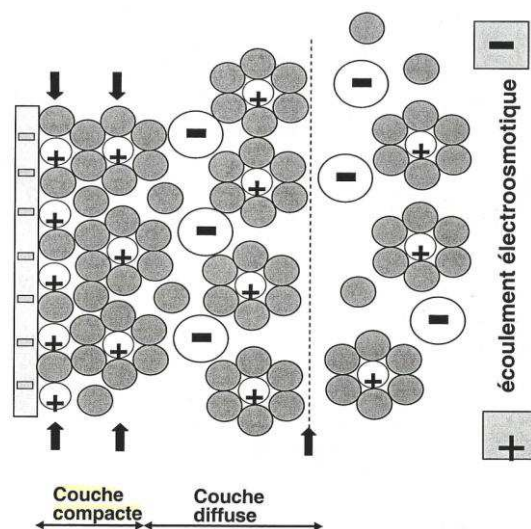


Figure A-1. Double couche électrostatique à l'interface silice/électrolyte.

Lors de l'établissement d'un champ électrique tangentiel à l'interface silice/électrolyte, les cations présents en excès dans la couche diffuse migrent vers la cathode avec leur sphère de solvation, créant ainsi un écoulement de toutes les espèces présentes au sein du capillaire. L'écoulement ainsi généré est nommé écoulement électroosmotique ou électroosmose et est caractérisé par un profil de vitesse plat permettant d'atteindre des efficacités de pics élevés. La vitesse de cet écoulement (v_{eof}) dépend alors du champ électrique appliqué (E) et de la mobilité électroosmotique (μ_{eof}) :

$$v_{eof} = \mu_{eof} E \quad (\text{eq.4})$$

La mobilité électroosmotique (μ_{eof}) s'exprime aussi comme :

$$\mu_{eof} = -\frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r \zeta}{\eta} = -\frac{\delta\sigma}{\eta} \quad (\text{eq.5})$$

L'écoulement électroosmotique dépend de nombreux paramètres comme le potentiel zéta, la viscosité et la constante diélectrique de l'électrolyte. De plus, la densité de charge de surface dépend du taux d'ionisation des groupements silanol et donc du pH et de la force ionique de l'électrolyte mais également de la nature des cations du tampon. Enfin, l'ajout de solvants organiques dans l'électrolyte modifie l'écoulement électroosmotique puisqu'ils impactent la viscosité et le potentiel zéta.

L'écoulement peut être modifié ou inversé en ajoutant des tensioactifs dans l'électrolyte qui, par interaction avec les groupements silanol, réduisent ou inversent la charge de surface. Dans certains cas, notamment pour l'analyse de composés susceptibles de s'adsorber aux parois du capillaire chargées positivement (composés basiques ou protéines), il peut être avantageux de supprimer totalement l'écoulement électroosmotique en utilisant des capillaires greffés chimiquement par des polymères neutres de type polyacrylamide par exemple.

A.3. L'électrophorèse capillaire de zone

A.3.1. Principe

L'électrophorèse capillaire de zone est le mode le plus simple à mettre en œuvre et donc le plus utilisé de l'électrophorèse capillaire. Le principe de cette technique est de séparer les

espèces en fonction de leur vitesse apparente (v_{app}), égale à la somme algébrique de la vitesse électrophorétique de l'espèce (v_{ep}) et de la vitesse de l'écoulement électroosmotique (v_{eof}) :

$$\vec{v}_{app} = \vec{v}_{ep} + \vec{v}_{eof} = (\mu_{eof} + \mu_{ep}) \vec{E} = \mu_{app} \vec{E} \quad (\text{eq.6})$$

avec : μ_{app} , la mobilité apparente de l'espèce qui est la somme des mobilités électroosmotique et électrophorétique.

La Figure A-2 représente une séparation en mode zone réalisée en polarité positive : l'anode est située à l'entrée du capillaire tandis que la cathode est située en sortie. Dans le cas des cations, les mobilités électroosmotique et électrophorétique étant de même signe, ils ont donc une grande mobilité apparente et se dirigent rapidement vers le détecteur. En revanche, pour les anions, leur mobilité électrophorétique est de signe opposé à celui de l'écoulement électroosmotique. Si leur mobilité électrophorétique est plus faible en valeur absolue que la mobilité électroosmotique, ils sont bien détectés à la cathode mais sortent plus tard que les cations. Dans le cas contraire, ils peuvent être détectés à l'anode en inversant le signe de la tension de séparation. Concernant les molécules neutres, elles migrent toutes à la même vitesse, égale à celle de l'écoulement électroosmotique, et sont donc détectées en un seul pic après les cations mais avant les anions. Pour pouvoir séparer les composés neutres entre eux, il est alors nécessaire de leur conférer une charge apparente soit par complexation avec des anions ou des cations, soit en les incorporant dans des micelles chargées ou des molécules dites cages telles que des cyclodextrines chargées.

Parmi les cations, les plus mobiles, c'est-à-dire les plus petits et les plus chargés, migrent en premier. A l'opposé, les anions migrent dans l'ordre inverse de leur mobilité électrophorétique : les plus petits et les plus chargés migrent en dernier. Ce mode de fonctionnement pour les anions est appelé mode contre-électroosmotique.

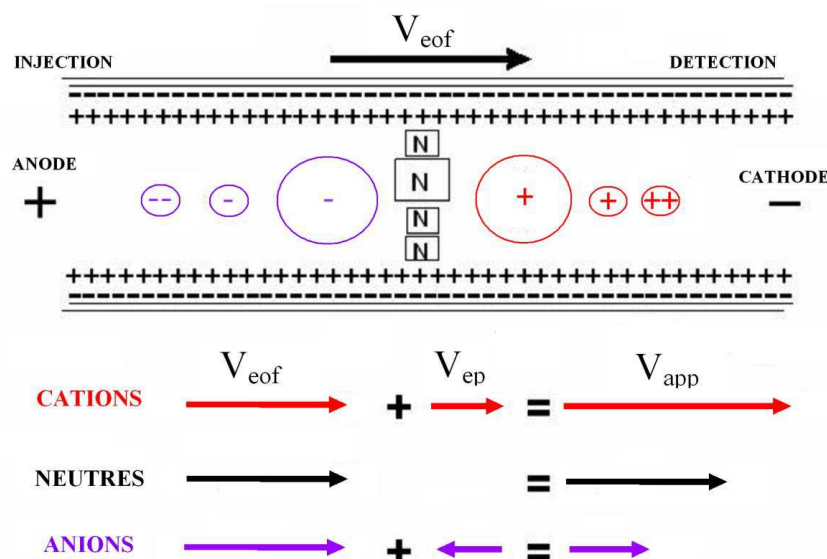


Figure A-2. Principe de séparation en électrophorèse capillaire de zone.

La mobilité apparente de chaque espèce peut être calculée à partir des équations suivantes :

$$\mu_{app} = \frac{v_{app}}{E} = \frac{L_{tot} L_{eff}}{t_M V} \quad (\text{eq.7})$$

avec : t_M , le temps de migration du composé ; V , la tension appliquée ; L_{tot} , la longueur totale du capillaire et L_{eff} , la longueur effective du capillaire, c'est-à-dire de l'injection à la détection.

A.3.2. Grandeurs fondamentales et effets dispersifs

La qualité d'une séparation peut être caractérisée par deux grandeurs que sont l'efficacité (N) et la résolution (R_s).

En électrophorèse capillaire, le profil d'écoulement plat généré par l'écoulement électroosmotique permet d'atteindre de grandes efficacités contrairement au profil d'écoulement parabolique rencontré en chromatographie en phase liquide. Par ailleurs, les mécanismes de dispersion des bandes échantillon sont beaucoup moins nombreux en électrophorèse capillaire étant donnée l'absence de phase stationnaire. Il n'y a donc pas de résistance au transfert de masse en phase stationnaire ou d'anisotropie d'écoulement. Ainsi, dans des conditions opératoires optimisées d'électrophorèse capillaire de zone, la source de dispersion majoritaire des bandes de solutés est la diffusion axiale dont la variance spatiale est σ_L^2 :

$$\sigma_L^2 = 2D_M t_M \quad (\text{eq.8})$$

avec : D_M , le coefficient de diffusion du composé.

Par conséquent, le nombre de plateaux théoriques N , est donné par la relation suivante :

$$N = \frac{L_{eff}^2}{\sigma_L^2} = \frac{(\mu_{eof} + \mu_{ep}) L_{eff} V}{2D_M L_{tot}} \quad (\text{eq.9})$$

Ainsi, plus la tension appliquée aux bornes du capillaire est grande et plus l'efficacité de séparation augmente. En effet, plus la tension appliquée est grande, plus les espèces migrent rapidement, ce qui diminue leur temps de séjour dans le capillaire et donc leur diffusion. De plus, l'efficacité d'un pic est inversement proportionnelle au coefficient de diffusion de l'espèce. Ainsi, pour des espèces très mobiles tels que les petits ions, l'efficacité des pics qui est généralement élevée sera limitée par leur plus grand coefficient de diffusion.

La résolution R_s , entre deux pics gaussiens de temps de migration t_{M1} et t_{M2} , est donnée par l'expression suivante :

$$R_s = \frac{t_{M2} - t_{M1}}{2(\sigma_2 + \sigma_1)} \quad (\text{eq.10})$$

avec : σ , l'écart type exprimé en unité de temps de la bande de soluté considérée.

Dans le cas où $\sigma_1 \approx \sigma_2$, la résolution en électrophorèse capillaire de zone entre deux pics gaussiens est définie de la façon suivante :

$$R_s = \frac{1}{4} \frac{\Delta\mu_{ep}}{\mu_{eof} + \bar{\mu}_{ep}} \sqrt{N} \quad (\text{eq.11})$$

avec : $\Delta\mu_{ep}$, la différence des mobilités électrophorétiques des deux espèces et $\bar{\mu}_{ep}$, la moyenne arithmétique des deux mobilités électrophorétiques.

Ainsi, les résolutions entre deux pics peuvent être améliorées en augmentant $\Delta\mu_{ep}$ (en modifiant la composition du tampon) mais aussi en minimisant la somme $(\mu_{eof} + \bar{\mu}_{ep})$.

Par exemple, dans le cas de séparations difficiles d'anions (μ_{ep} très proches), c'est la somme ($\mu_{eof} + \bar{\mu}_{ep}$) qu'il faudra minimiser au détriment du temps d'analyse. L'électrolyte devra donc être modifié de sorte à atteindre une valeur absolue de μ_{eof} proche de celle de μ_{ep} .

A.4. Mise en œuvre expérimentale

Le schéma de principe de l'électrophorèse capillaire est présenté en Figure A-3. Les capillaires utilisés sont en silice vierge, de diamètre interne compris entre 10 et 100 μm et de longueurs variables comprises entre 30 et 100 cm. Durant l'analyse, les extrémités du capillaire et deux électrodes, reliées à une alimentation électrique, plongent dans deux flacons d'électrolyte de séparation de force ionique comprise entre 5 et 150 mM. Une des électrode est reliée à l'anode (pôle +) et l'autre est reliée à la cathode (pôle -).

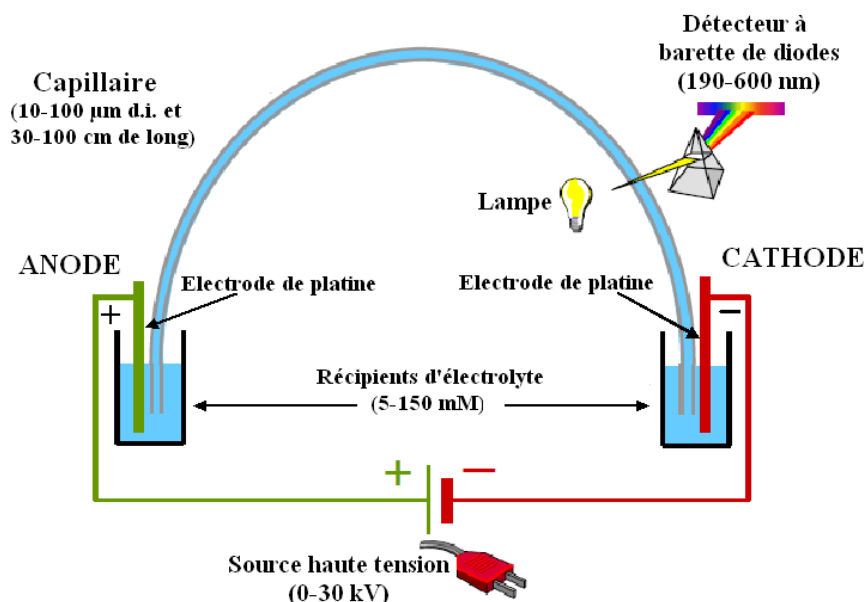


Figure A-3. Schéma de principe de l'électrophorèse capillaire en polarité normale.

Deux modes d'injection des analytes existent :

- l'injection hydrodynamique : elle est réalisée en appliquant une différence de pression entre le flacon rempli d'échantillon, positionné à l'entrée du capillaire, et le flacon rempli d'électrolyte ou d'eau en sortie de capillaire. Le volume d'échantillon injecté est, dans ce cas, directement proportionnel à la valeur de la surpression et du temps pendant lequel elle est maintenue.
- l'injection électrocinétique : elle est réalisée en appliquant une différence de potentiels aux bornes du capillaire de quelques kV. Ainsi, les quantités injectées sont

fonction de la mobilité apparente des composés (mobilité électrophorétique + mobilité électroosmotique). Un composé de plus grande mobilité apparente sera donc injecté en plus grande proportion qu'un composé de plus faible mobilité apparente. La quantité injectée d'un analyte dépend alors de la tension appliquée, de la durée d'application de cette tension, de la mobilité électrophorétique du composé et la mobilité électroosmotique.

Annexe B – Présentation des équipements utilisés lors des analyses sur microsystèmes

B.1. Les microsystèmes

Les analyses ont été réalisées sur des microsystèmes commerciaux en verre borosilicaté provenant de la société Micralyne (Edmonton, Alberta, Canada). Des microsystèmes de géométrie d'intersection double-T ont été utilisés. Sur ce type de microsysteme, les deux branches du canal d'échantillonnage étaient décalées de 100 μm le long de l'axe du canal de séparation. Le format d'un microsysteme était de 16 mm de largeur, 95 mm de longueur et 2,2 mm d'épaisseur. Chaque plaque en verre avait une épaisseur de 1,1 mm. Les canaux avaient une largeur de 50 μm et une profondeur de 20 μm . La longueur du canal d'échantillonnage était de 0,96 cm et celle du canal de séparation de 9,03 cm (8,09 cm entre l'intersection des deux canaux et le réservoir BW) (Figure B-1). Le diamètre des puits était de 2,0 mm $\pm$ 0,1 mm.

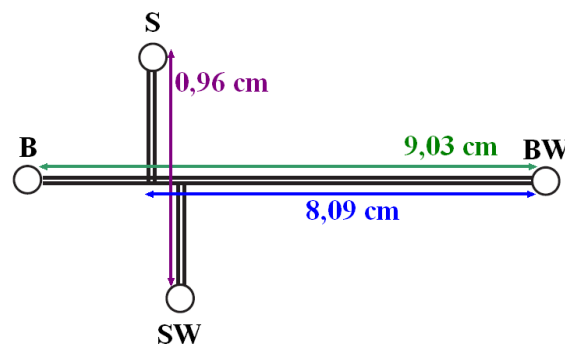


Figure B-1. Dimensions des microsystèmes double-T utilisés.

B.2. Le dispositif d'analyse

Le dispositif expérimental utilisé pour mettre en œuvre les analyses sur microsystèmes était composé d'un microscope inversé (IX-71, Olympus, France), équipé d'une lampe à vapeur de mercure d'une puissance de 100 W, de 2 filtres optiques : (i) excitation : passe-bande 330 – 385 nm et émission : passe-haut 420 nm ; (ii) excitation : passe-bande 460 – 495 nm et émission : passe-haut 510 nm et de 3 objectifs : 4x, 10x, 40x. Une deuxième source lumineuse a fait l'objet d'un prêt (Metal Halide Illumination System, X-cite® 120Q, Olympus, France) afin de comparer sa sensibilité de détection avec celle de la lampe à mercure. Cette lampe avait une puissance de 120 W et était caractérisée par un spectre d'émission plus riche que celui de la lampe à mercure (Figure B-2).

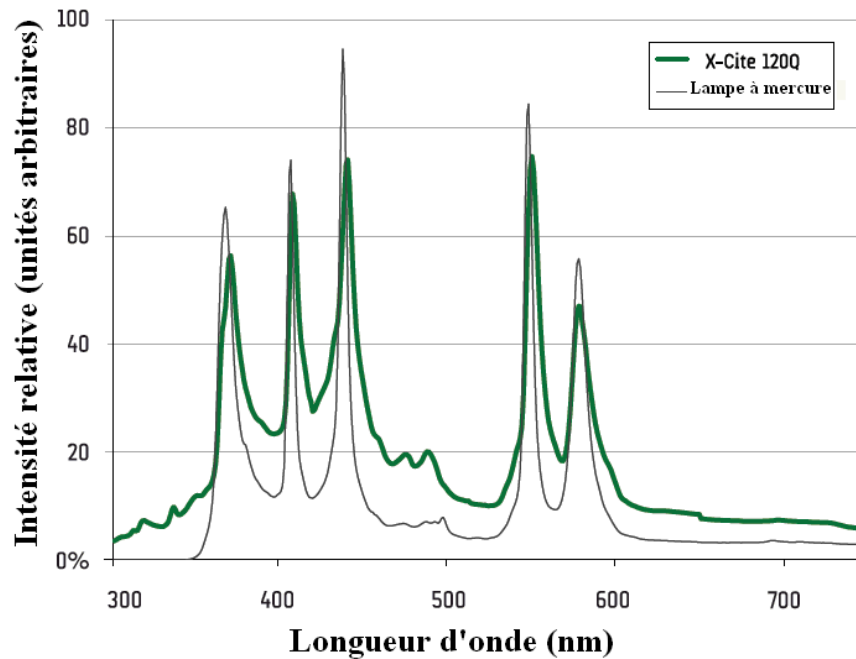


Figure B-2. Comparaison des spectres d'émission des deux lampes utilisés au laboratoire : lampe à mercure et lampe Metal Halide X-Cite 120Q.

Une caméra CCD montée sur le microscope a permis l'acquisition du signal de fluorescence (Pike F-145B/C, Allied Vision Technologies, Stadtroda, Allemagne). Le logiciel HIRIS (R&D Vision, Saint-Maur-des-Fossés, France) a été utilisé à la fois pour le contrôle de la caméra et pour l'acquisition et le traitement des séquences d'images. Le microsysteme était positionné sur la platine du microscope, il était donc possible de faire varier la position de la fenêtre de détection le long du canal de séparation. Ainsi les longueurs effectives (L_{eff}), c'est-à-dire les distances entre l'intersection des canaux et la fenêtre de détection, ont pu être variées entre 10 et 70 mm. En effet, de part la présence d'adhésif fluorescent autour du réservoir « électrolyte poubelle » (BW), il était impossible expérimentalement de détecter à plus de 70 mm de l'intersection des canaux. Pour l'ensemble des analyses sur microsysteme, une fenêtre de détection de 250 μm de longueur, le long du canal de séparation, et de largeur environ égale à celle du canal (50 μm) a été définie à l'aide du logiciel HIRIS.

Le générateur de tension de type Labsmith HVS 448 (Labsmith, Livermore, USA) à huit voies pouvant appliquer des différences de potentiel entre 0 et 6000 V, a été utilisé pour générer les champs électriques au sein du microsysteme via des électrodes insérées dans chacun des puits. Ces électrodes étaient constituées de fils de platine de 500 μm de diamètre externe. Le logiciel Sequence (Labsmith, Livermore, USA) a permis d'imposer les tensions souhaitées sur chaque voie en fonction du temps. Enfin, un générateur de pression de type Fluigent MFCS-100-4C (Fluigent, Paris, France) contrôlé par le logiciel Maesflo

(Fluigent, Paris, France) a permis d'appliquer des pressions entre 7 mbars et 7 bars pour les étapes de rinçage et de conditionnement hydrodynamiques des canaux.

Les logiciels Azur (DATALYS, Le Touvet, France) et Excel 2007 (Microsoft Corporation, Courtaboeuf, France) ont été utilisés pour le retraitement des données.

Annexe C – Etude des écoulements hydrodynamiques

Un des principaux avantages d'une analyse électrocinétique est le profil d'écoulement plat généré par l'électroosmose. En effet, ce front plat permet de limiter la dispersion de la bande échantillon et donc d'atteindre de plus grandes efficacités de séparation par rapport à un profil de vitesse parabolique obtenu avec des écoulements hydrodynamiques. Les écoulements hydrodynamiques doivent donc être évités que ce soit en électrophorèse capillaire ou lors d'une analyse sur microsysteme. Cependant, au cours d'une séquence d'analyses, les écoulements électroosmotiques conduisent à une évolution des niveaux des liquides dans les réservoirs. Or, des différences de niveaux des réservoirs induisent des différences de pression aux bornes des canaux et génèrent donc des écoulements hydrodynamiques parasites. Ces écoulements ont pour effet de dégrader la répétabilité de l'injection et des temps de migration et d'augmenter la variance des pics électrophorétiques. Ils peuvent également avoir des conséquences sur le retrait de l'échantillon en se superposant aux écoulements électroosmotiques établis lors de l'étape de séparation. Il est donc important de limiter l'apparition de ce type d'écoulements interférents lors de la mise en œuvre des microsystemes.

L'écoulement laminaire d'un fluide incompressible provoqué par une différence de pression est appelé écoulement de Poiseuille. Dans ce cas, la relation entre la différence de pression ΔP aux extrémités du canal et le débit du fluide est donnée par la loi de Hagen-Poiseuille :

$$\Delta P = R_{hyd} Q \quad (\text{eq.1})$$

avec Q , le débit du liquide et R_{hyd} , la résistance hydraulique de la portion du canal.

En effet, la notion de la résistance hydraulique est centrale lors de la caractérisation et de la conception de micro-canaux dans des microsystemes.

La vitesse du fluide, v_{hyd} , induite par une différence de pression ΔP aux extrémités d'un canal de section S_c peut donc être estimée par la relation :

$$v_{hyd} = \frac{\Delta P}{S_c R_{hyd}} \quad (\text{eq.2})$$

Pour un canal de section rectangulaire, il existe une expression exacte en série de Fourier de la résistance hydraulique [1] qu'il est possible de remplacer par l'expression approchée [2] :

$$R_{hyd} = \frac{12\eta L}{h^3 l (1 - \frac{192h}{\pi^5 l})} \quad (\text{eq.3})$$

avec η , la viscosité du fluide ; L , la longueur du canal ; h , la profondeur du canal et l , la largeur du canal.

Cette expression est précise à moins de 10 % d'erreur lorsque le rapport de forme du canal h/l est inférieur à 0,7 (0,4 pour cette étude).

De plus, la relation entre la différence de niveaux des liquides dans les réservoirs Δh et la différence de pression alors engendrée ΔP est la suivante :

$$\Delta h = \frac{\Delta P}{\rho g} \quad (\text{eq.4})$$

avec ρ , la masse volumique du liquide et g , la constante gravitationnelle.

En associant les équations (2) et (4), on en déduit que :

$$\Delta h = \frac{v_{hyd} S_c R_{hyd}}{\rho g} \quad (\text{eq.5})$$

La différence de niveaux des liquides dans les réservoirs correspond également au rapport entre le volume de fluide écoulé pendant un temps t sur la surface S_R des réservoirs :

$$\frac{\Delta h}{2} = v \frac{t S_c}{S_R} \quad (\text{eq.6})$$

avec v , vitesse globale du fluide, i.e. la différence entre la vitesse de l'écoulement électroosmotique et celle de l'écoulement hydrodynamique.

En combinant les équations (5) et (6), la relation suivante est obtenue :

$$\frac{v_{hyd}}{v} = \frac{\rho g t}{2 R_{hyd} S_R} \quad (\text{eq.7})$$

Ce rapport entre la vitesse hydrodynamique et la vitesse globale du fluide permet d'évaluer l'importance des écoulements hydrodynamiques. Afin de diminuer l'intensité de ces écoulements, on comprend donc qu'il est nécessaire de diminuer le temps des analyses, d'augmenter la résistance hydraulique du canal et la section des réservoirs. Les écoulements hydrodynamiques seront donc d'autant plus faibles que le canal sera long et étroit et que les réservoirs seront larges. Néanmoins, ces expressions s'appliquent

uniquement dans le cas d'un canal rectiligne. Sur microsystemes, lors de l'étape de séparation, il paraît donc difficile d'évaluer la part de l'écoulement hydrodynamique existant entre le réservoir S et le réservoir BW, le canal alors considéré n'étant pas rectiligne.

References

- [1] P. Tabeling, Introduction à la microfluidique, Belin, 2003.
- [2] H.A. Stone, A.D. Stroock, A. Adjari, Annu. Rev. Fluid Mech. 36 (2004) 381-411.

Annexe D – Méthodes de calcul des champs électriques sur microsystemes

L'objectif de cette partie est d'expliquer les méthodes de calcul des champs électriques et des potentiels à appliquer lors des étapes d'injection et de séparation dans un microsysteme. Les calculs suivants sont basés sur l'hypothèse que les différentes branches des micro-canaux sont remplies avec un électrolyte de conductivité uniforme, i.e. que la résistance par unité de longueur de chaque portion du canal est identique.

D.1. Echantillonnage pincé

D.1.1. Calculs de champs électriques

En appliquant les lois de Kirchhoff au point d'intersection (I) lors de l'étape d'échantillonnage pincé du mode d'injection dynamique (Figure D-1), on obtient les relations suivantes :

$$E_{SW} = E_S + E_B + E_{BW} \quad (\text{eq.1})$$

$$E_{SW} = \gamma_S \phi_I \quad (\text{eq.2})$$

$$E_S = \gamma_S (\phi_S - \phi_I) \quad (\text{eq.3})$$

$$E_B = \gamma_B (\phi_B - \phi_I) \quad (\text{eq.4})$$

$$E_{BW} = \gamma_{BW} (\phi_{BW} - \phi_I) \quad (\text{eq.5})$$

avec E_i , le champ électrique appliqué dans le canal entre l'intersection I et le réservoir i ; ϕ_i , le potentiel appliqué au réservoir i ; $\gamma_i = \frac{1}{L_i}$ et $L_s = L_{sw}$ où L_i représente la longueur du canal entre l'intersection I et le réservoir i.

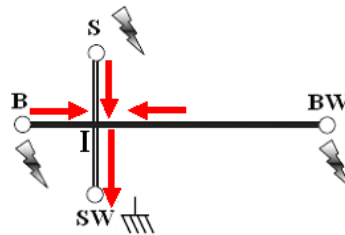


Figure D-1. Représentation schématique des potentiels appliqués et du sens de l'écoulement des fluides lors de l'étape d'échantillonnage pincé.

D.1.2. Calcul du potentiel à l'intersection des canaux

Afin de déterminer les valeurs des champs électriques dans les différents canaux, il est nécessaire de calculer la valeur du potentiel à l'intersection des canaux ϕ_I .

Lorsque le pincement est symétrique :

$$E_B = E_{BW} \quad (\text{eq.6})$$

En combinant les équations (1), (2), (3), (4) et (6) le potentiel ϕ_I peut s'exprimer par l'égalité suivante :

$$\phi_I = \frac{\gamma_S \phi_S + 2\gamma_B \phi_B}{2\gamma_S + 2\gamma_B} \quad (\text{eq.7})$$

D.1.3. Calcul de l'intensité de pincement (R_1)

Durant l'étape d'échantillonnage pincé, l'intensité de pincement est définie par l'expression suivante :

$$R_1 = \frac{E_B}{E_S} \quad (\text{eq.8})$$

En insérant les équations (3) et (4) on obtient :

$$R_1 = \frac{\gamma_B(\phi_B - \phi_I)}{\gamma_S(\phi_S - \phi_I)} \quad (\text{eq.9})$$

D.2. Retrait de l'échantillon pendant l'étape de séparation

D.2.1. Calculs de champs électriques

En appliquant les lois de Kirchoff au point d'intersection (I) lors du retrait de l'échantillon (Figure D-2), on obtient les relations suivantes :

$$E_B = E_S + E_{SW} + E_{BW} \quad (\text{eq.10})$$

$$E_{SW} = \gamma_{SW}(\phi_I - \phi_{SW}) \quad (\text{eq.11})$$

$$E_S = \gamma_S(\phi_I - \phi_S) \quad (\text{eq.12})$$

$$E_B = \gamma_B(\phi_B - \phi_I) \quad (\text{eq.13})$$

$$E_{BW} = \gamma_{BW}\phi_I \quad (\text{eq.14})$$

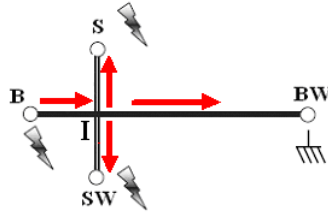


Figure D-2. Représentation schématique des potentiels appliqués et du sens de l'écoulement des fluides lors du retrait de l'échantillon pendant l'étape de séparation.

D.2.2. Calcul du potentiel à l'intersection des canaux

Lorsque le retrait est symétrique :

$$E_S = E_{SW} \quad (\text{eq.15})$$

En combinant les équations (10), (12), (13), (14) et (15) le potentiel ϕ_I peut s'exprimer par l'égalité suivante :

$$\phi_I = \frac{\gamma_B\phi_B + 2\gamma_S\phi_S}{2\gamma_S + \gamma_B + \gamma_{BW}} \quad (\text{eq.16})$$

D.2.3. Calcul de l'intensité de retrait (R_2)

Durant l'étape de séparation avec retrait de l'échantillon, l'intensité de retrait est définie par l'expression suivante :

$$R_2 = \frac{E_S}{E_{BW}} \quad (\text{eq.17})$$

En insérant les équations (12) et (14) on obtient :

$$R_2 = \frac{\gamma_S(\phi_I - \phi_S)}{\gamma_{BW}\phi_I} \quad (\text{eq.18})$$

Annexe E – Influence de la force ionique de l'électrolyte sur la mobilité électroosmotique

E.1. Calculs des forces ioniques

La force ionique (I) d'un électrolyte est donnée par la relation suivante :

$$I = \frac{1}{2} \sum_i z_i^2 c_i \quad (\text{eq.1})$$

avec z_i , la charge de l'ion i et c_i , la concentration de l'ion i .

E.1.1. Calcul de la force ionique d'un tampon borate de sodium à 5 mM (électrolyte 1)

La concentration totale en borate, présent sous les formes acide (H_3BO_3) et basique (BO_2^-) étant égale à 5 mM, les contributions de BO_2^- et Na^+ à la force ionique étaient donc de 1,25 mM chacune. La force ionique totale de cet électrolyte a donc été estimée à 2,5 mM.

E.1.2. Calcul de la force ionique d'un tampon borate de sodium à 10 mM composé de 600 mM d'urée, de 14,8 mM de SBE- β -CD, de 20,4 mM de Me- β -CD et de 11,2 % de MeOH (électrolyte 2)

En faisant l'hypothèse que le taux de neutralisation de la cyclodextrine SBE- β -CD (degré de substitution moyen de 6,2), fournie sous la forme de sel de sodium, était approximativement de 50 %, une charge effective de 3 a été fixée pour la cyclodextrine anionique.

Ainsi, la contribution à la force ionique était de 66,6 mM pour la SBE- β -CD et de 22,2 mM pour Na^+ (provenant du sel de la cyclodextrine anionique). Quant à la force ionique apportée par le tampon borate de sodium, elle était alors, dans ce cas, de 5 mM. La force ionique totale de cet électrolyte a donc été estimée à 93,8 mM.

E.2. Effets de la force ionique de l'électrolyte sur l'écoulement électroosmotique

La mobilité électroosmotique (μ_{eof}) est définie comme suit :

$$\mu_{eof} = -\frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r \xi}{\eta} \quad (\text{eq.2})$$

avec ε_0 , la permittivité du vide ; ε_r , la constante diélectrique de l'électrolyte ; η , la viscosité de l'électrolyte et ξ , le potentiel zéta ou le potentiel électrocinétique déterminé par l'expression suivante :

$$\xi = \frac{\delta \sigma}{\varepsilon_0 \varepsilon_r} \quad (\text{eq.3})$$

où σ est la densité de charge de surface et δ est l'épaisseur de la double couche électrostatique ou longueur de Debye définie par la relation ci-après :

$$\delta = \sqrt{\frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r RT}{2IF^2}} \quad (\text{eq.4})$$

avec R, la constante des gaz parfaits ; T, la température absolue ; I, la force ionique et F, la constante de Faraday.

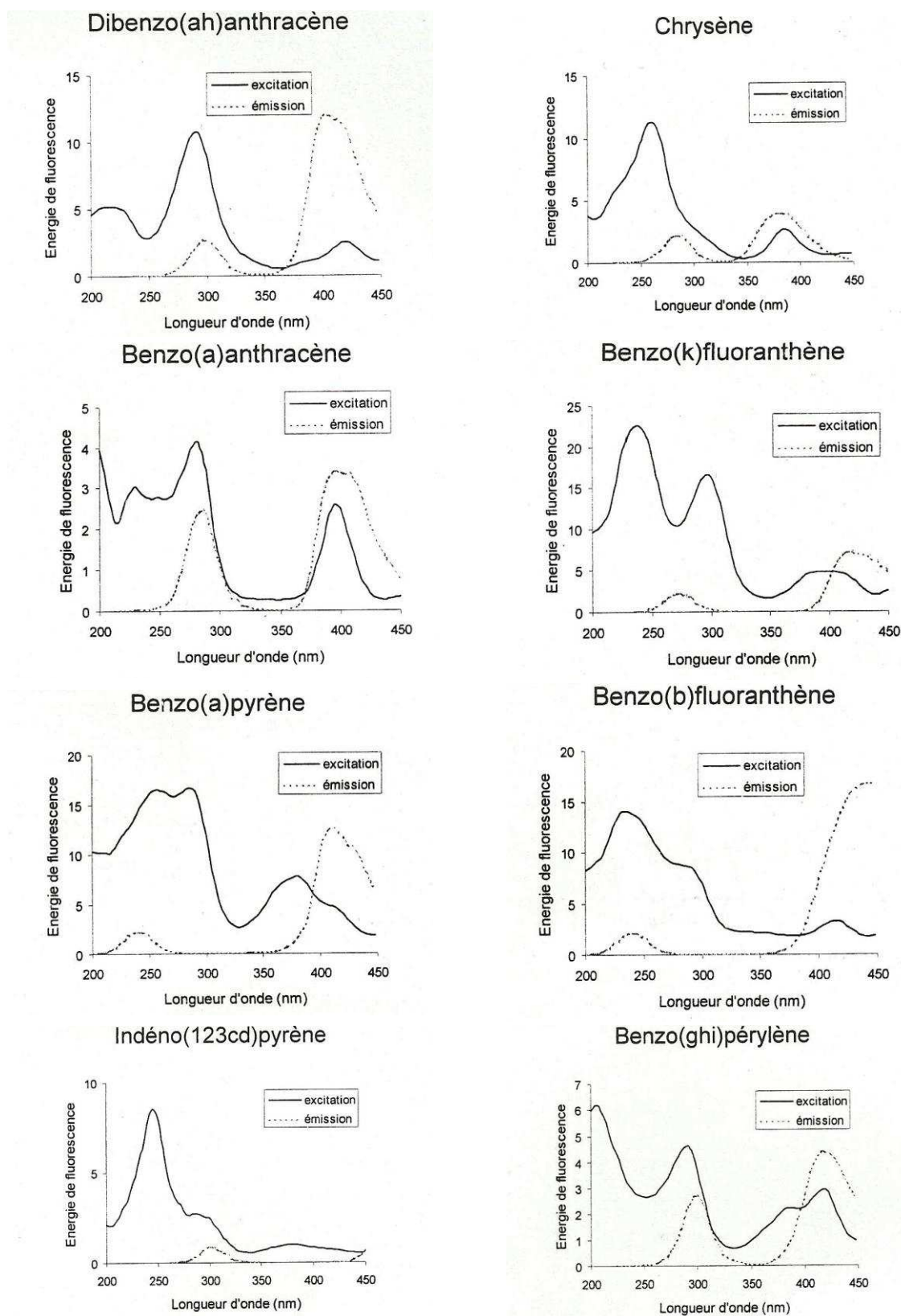
Comme montré dans les équations 2, 3 et 4, μ_{eof} est proportionnelle à ξ , ξ est proportionnel à la longueur de Debye, δ , qui est inversement proportionnelle à la racine carrée de la force ionique, $\sqrt{I}$ et par conséquent μ_{eof} est proportionnelle à $1/\sqrt{I}$.

Finalement, le rapport des mobilités électroosmotiques attendu entre l'électrolyte 2 et l'électrolyte 1 peut être estimé de la façon suivante :

$$\frac{\mu_{eof}(BGE2)}{\mu_{eof}(BGE1)} = \sqrt{\frac{I(BGE1)}{I(BGE2)}} = \sqrt{\frac{2,5}{93,8}} = 0,16 \quad (\text{eq.5})$$

ce qui signifie qu'en passant à l'électrolyte optimisé, l'augmentation de la force ionique a conduit à une diminution de la mobilité électroosmotique estimée à environ 84 %.

Annexe F – Spectres de fluorescence des 8 HAP prioritaires



Mise au point d'un microsystème électrophorétique pour l'analyse des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les huiles alimentaires

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des contaminants de notre environnement et de notre alimentation. En raison de leur toxicité, la Commission européenne a réglementé leur teneur dans les denrées alimentaires et notamment dans les huiles. Les industriels des corps gras ont donc pour obligation de vérifier la conformité de leurs produits. Dans ce contexte, le groupe Lesieur souhaiterait développer un nouvel outil analytique rapide et portable. Ainsi, ce vaste projet de recherche vise à concevoir un microsystème électrophorétique capable d'analyser les HAP dans les huiles alimentaires. Première étude à s'inscrire dans ce projet, ce travail de thèse a donc consisté à développer de nouveaux protocoles analytiques.

Dans une première partie, des méthodes de séparation des HAP ont été développées en électrophorèse capillaire (CE) modifiée par des cyclodextrines couplée à un détecteur de fluorescence induite par laser. En suivant des stratégies multivariées basées sur les plans d'expériences, deux méthodes de séparation ont été optimisées. Les huit HAP communs aux listes établies par l'agence de protection de l'environnement des Etats-Unis et l'agence européenne de sécurité sanitaire des aliments ont été séparés en moins de 7 min et dix-neuf HAP, également classés par ces deux organismes, ont été analysés en moins de 18 min. Ces méthodes de séparation ont été appliquées avec succès à des extraits d'huile dopés.

Dans une deuxième partie, il a été question de transférer la méthode d'analyse des huit HAP au format microsystèmes. La principale difficulté rencontrée a été le manque de sensibilité du système de détection couplé aux puces. Le premier objectif a donc été d'optimiser les quantités d'échantillon injectées et les paramètres de la détection avec un composé modèle dans un tampon borate. Cependant, seulement quatre HAP sur les dix-neuf étudiés précédemment en CE ont pu être détectés. Toutefois, dans les conditions optimisées par le plan d'expériences, ils étaient séparés en moins de 4 min.

Enfin, différents polymères à empreintes moléculaires (MIP) ont été synthétisés en vue d'extraire sélectivement les HAP des huiles. Après un criblage des conditions de synthèse, la sélectivité de chaque MIP a été évaluée en milieu pur en comparant sa capacité de rétention avec celle d'un polymère non-imprimé. Les huit HAP communs aux deux listes ont finalement pu être extraits sélectivement à partir d'huiles de tournesol, mais avec des rendements d'extraction encore insuffisants et qui nécessitent une amélioration de la procédure d'extraction.

Mots clés : *hydrocarbures aromatiques polycycliques, électrophorèse capillaire, microsystèmes, polymères à empreintes moléculaires, huiles alimentaires*

Development of a capillary electrophoresis microchip for polycyclic aromatic hydrocarbons analysis in edible oils

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are widespread contaminants in the environment and food products. Given their toxicity, their concentrations are regulated by the European Commission in food products and especially in edible oils. Consequently, manufacturers of fat products have to verify the conformity of their products. In this context, Lesieur wants to develop a rapid and portable new analytical tool. Hence, this ambitious research project aims at developing a capillary electrophoresis microchip for PAH analysis in edible oils. This PhD study, first one involved in this project, consisted in developing new analytical protocols.

In a first part, PAH separation methods were developed by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis (CE) with laser-induced fluorescence detection. Using experimental design-based strategies, two separation methods were optimized. The 8 PAHs in common between the United States Environmental Protection Agency and the European Food Safety Authority lists of priority pollutants were separated in less than 7 min, while 19 PAHs, also targeted by these institutions, were separated in less than 18 min. These CE separation methods were successfully applied to the analysis of spiked edible oil extracts.

The second part aimed at transferring the electrophoretic separation method of the 8 PAHs from the capillary to the microsystem format. The lack of sensitivity of the detection system hyphenated with chips was the main difficulty encountered. Thus, injected sample amounts and detection parameters were first optimized with a model compound in a borate buffer. However, only 4 out of the 19 PAHs, previously studied in CE, could be detected. Nevertheless, under conditions predicted by the design of experiments, they were baseline resolved in less than 4 min.

Finally, several molecularly imprinted polymers (MIPs) were synthesized for the selective extraction of PAHs from oils. After a screening of synthesis conditions, the selectivity of each MIP was evaluated in pure media by comparing the extraction recoveries obtained on MIP with those obtained on a non-imprinted polymer. Finally, the 8 PAHs in common between the two lists were selectively extracted from sunflower oils, but with low recoveries. Improvements in extraction procedures are still required.

Keywords: *polycyclic aromatic hydrocarbons, capillary electrophoresis, microchips, molecularly imprinted polymers, edible oils*