HAL
open science

Développement de microsystèmes électrochromatographiques en copolymère d'oléfine cyclique

Yoann Ladner

To cite this version:

Yoann Ladner. Développement de microsystèmes électrochromatographiques en copolymère d'oléfine cyclique. Autre. Université Claude Bernard - Lyon I, 2012. Français. NNT : 2012LYO10227 . tel-00976744

HAL Id: tel-00976744

https://theses.hal.science/tel-00976744v1

Submitted on 10 Apr 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.

N° d'ordre : 227-2012 Année 2012

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE DE CHIMIE

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le

par

Mr Yoann LADNER

TITRE :

Développement de microsystèmes électrochromatographiques en copolymère d'oléfine cyclique (COC)

JURY :

Mme Marie-Claude MILLOT Mme Myriam TAVERNA	Rapporteurs
Mr Hervé COTTET Mr Abdelhamid ERRACHID	Examinateurs
Mr Gérard Crétier Mme Karine Faure	Directeurs de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	**M. François-Noël GILLY**
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe LALLE
Vice-président du Conseil Scientifique	M. le Professeur Germain GILLET
Secrétaire Général	M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Administrateur provisoire : M. le Professeur G. KIRKORIAN
UFR d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA.
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : M. le Professeur P. FARGE

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. le Professeur F. De MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. FLEURY
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme le Professeur H. PARROT
Département GEP	Directeur : M. N. SIAUVE
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : Mme S. FLECK
Département Sciences de la Terre	Directeur : Mme la Professeure I. DANIEL
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. C. COLLIGNON
Observatoire de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. P. FOURNIER
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. C. VITON
Institut Universitaire de Formation des Maîtres	Directeur : M. R. BERNARD
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : Mme la Professeure V. MAUME-DESCHAMPS

Remerciements

J'exprime toute ma gratitude à Mesdames Marie-Claude MILLOT (Institut de Chimie et des matériaux, Paris) et Myriam TAVERNA (Faculté de Pharmacie de l'université Paris Sud) pour avoir accepté de rapporter ce travail.

Je remercie en outre monsieur Hervé Cottet (Institut des Biomolécules Max Mousseron, Montpellier) pour avoir consenti à examiner ce manuscrit.

Je voudrais remercier Monsieur Abdelhamid ERRACHID, professeur à l'université Claude Bernard, d'avoir accepté de présider ce jury.

Mes plus sincères remerciements s'adressent à Monsieur Gérard CRETIER, ingénieur de recherche CNRS, pour m'avoir fait l'honneur de diriger ce projet de recherche, pour ses précieux conseils et commentaires et son soutien permanent tout au long de ces trois années d'étude. Je remercie également madame Karine FAURE qui a co-dirigé cette thèse, pour sa présence permanente, ses conseils, son soutien et son précieux travail pour la rédaction du brevet.

Je tiens à associer à ce manuscrit mes collègues et amis : monsieur Anthony BRUCHET pour son amitié et son aide précieuse dans la réalisation de l'innovation obtenue durant cette thèse, monsieur Nazim MEKAOUI pour sa gentillesse, son attention et son soutien très important au quotidien, madame Thuy THANH NGUYEN BOISSE pour sa gentillesse, sa joie de vivre et les nombreux fou rire partagés avec elle et monsieur Richard ROUX pour ses précieux conseils et pour m'avoir entraîné à la course à pied.

Un grand merci à l'ensemble des personnels et co-équipiers du laboratoire des sciences analytiques: mesdames sabine HEINISH, Nicole GILON, Florence LAGARDE, Maryline BONNEFOI, claire DEMESMAY, Evelyne BONHOMME et messieurs Alain BERTHOD, Vincent DUGAS, Jérôme RANDION, Hervé DELEPINE et Bernard HERBRETEAU.

Je tiens tout particulièrement à remercier mes chers amis et collègues Laurent VIO, Joseph CHAMIEH, Amélie D'ATTOMA, Racha EL DEBS, Maguy ABI JAOUDÉ, Amélie LEVET, Florian TRICHARD, ainsi que tous les stagiaires qui sont passés dans le laboratoire, pour leur fraternité et les nombreux moments agréables partagés ensemble au quotidien.

Enfin, je dédie cet ouvrage a ma famille et en particulier à mes parents et à ma sœur qui m'ont énormément soutenu et qui m'ont permis de surmonter mon handicap. Grâce à eux, j'ai pu réaliser les études que je voulais. Je remercie également Camille pour son soutien au quotidien et pour avoir supporté mes périodes de doutes et de stress.

TITRE en français : **Développement de microsystèmes électrochromatographiques en copolymère d'oléfine cyclique (COC)**

RESUME en français :
Ce manuscrit est consacré à l'élaboration de phases stationnaires monolithiques organiques pour les microsystèmes électrochromatographiques plastiques. La partie bibliographique situe d'abord l'intérêt des techniques électrocinétiques en microsystème. Ensuite, l'état de l'art sur l'utilisation des monolithes dans ces techniques séparatives est présenté en portant une attention particulière à la description du processus de photopolymérisation. La fonctionnalisation de surface du copolymère d'oléfine cyclique (COC) est ensuite détaillée afin d'envisager l'ancrage du monolithe aux parois du canal.

La partie expérimentale a porté tout d'abord sur le développement et la caractérisation de deux monolithes acrylates dédiés à la chromatographie à polarités des phases inversées. Le travail expérimental s'est ensuite orienté vers le développement d'un nouveau procédé permettant la synthèse et l'ancrage du monolithe dans les microcanaux en COC, ceci en une seule étape et à partir des photoinitiateurs de type I. Ce protocole permet l'obtention d'efficacités intéressantes qui restent cependant inférieures à celles obtenues en capillaire. Des adaptations des conditions d'irradiation ont alors été apportées pour la synthèse de ces monolithes à l'intérieur des microsystèmes afin d'obtenir des efficacités de l'ordre de 250 000 plateaux/m. Pour terminer, les domaines d'applications et la longévité du dispositif ont été illustrés par la séparation de différentes familles de solutés (PAH, mycotoxines, catécholamines, acides aminés, amines biogènes) et l'analyse d'échantillons réels tels que les vins (pour déterminer la teneur en certaines amines biogènes : histamine et tyramine).

TITRE en anglais : **Development of electrochromatography in cyclic olefin copolymer microsystems**

RESUME en anglais
This manuscript is dedicated to the synthesis of organic monolithic stationary phases in plastic electrochromatographic microchips. The bibliography part shows the benefit of electrokinetic techniques for microsystems. After an overview on the use of monoliths in separation techniques, the manuscript is focused on the description of photopolymerization process. Finally, a detailed review of the different protocols of functionnalization of cyclic olefin copolymer (COC) surface to allow anchoring of the monolith to the channel walls is produced.

The experimental study firstly deals with the development and characterization of two acrylate monoliths dedicated to the reversed phase mode in chromatography. Then, the experimental part focus on a new one-step method for the simultaneous synthesis and anchoring of organic monolith inside COC microchip channel, thanks to the use of type I photoinitiators. This protocol improves efficiencies which nevertheless stay below those obtained in capillary. Further, the adjustment of the irradiation conditions allows to reach up to 250 000 plates/m. Finally, the field of applications and the durability of microsystem have been illustrated by the separation of different kinds of solutes (HAP, mycotoxins, catecholamines, biogenic amines) and the analysis of real matrices such as wine samples (for the quantitative determination of two biogenic amines : histamine and tyramine).

DISCIPLINE : **Chimie Analytique**

MOTS-CLES : **Monolithe, photopolymérisation, électrochromatographie, miniaturisation, copolymère d'oléfine cyclique (COC), préconcentration.**

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE : **Institut des Sciences Analytiques, Université Lyon 1, Bâtiment Curien, Domaine scientifique de la Doua, 43 Boulevard du 11 Novembre, 69622 Villeurbanne cedex**

Principaux Acronymes

AA : acides aminés

ACN: acétonitrile

AIBN : 2,2-azobisisobutyronitrile

AFM : microscopie à force atomique

AMPS : 2-acrylamido-2-méthylpropanesulfonique

APTES : 3-aminopropyltriethoxysilane

BuMA : butyl méthacrylate

BDDA : 1,3-butanediol diacrylate

BME : benzoin méthyl éther

BP : benzophénone

BPO : dibenzoyl peroxyde

COC : copolymère d'oléfine cyclique

COMOSS : collocated monolith support structures

COV : composés organiques volatiles

CV : coefficient de variation

CZE : électrophorèse de zone libre

DC : degré de conversion

DMPAP : 2,2-diméthoxy-2-phénylacetophénone

DVB : divinylbenzène

EC : électrochromatographie

ECC : électrochromatographie capillaire

EDMA : éthylène diméthacrylate

EHMA : éthyl hexyl méthacrylate

EtOH : éthanol

GABA : acide γ-aminobutyrique

GMA : glycidyl méthacrylate

FEO : flux électroosmotique

FES : facteur d'enrichissement en signal

γ-MAPS : 3-(triméthoxysilyl)propyl méthacrylate

2-HA : 2-hydroxyéthyl acrylate

HA : hexyl acrylate

HAP : hydrocarbure aromatique polycyclique

HILIC : chromatographie d'interactions hydrophiles

HPLC : chromatographie en phase liquide à haute performance

IDA : acide iminodiacétique

ISC : conversion inter-système

ITP : isotachophorèse

LC : chromatographie liquide

LiDS : dodécyl sulfate de lithium

LMA : lauryl méthacrylate

LPO : lauroyl peroxyde

MEB : microscopie électronique à balayage

MEKC : chromatographie électrocinétique micellaire

META : chlorure de méthacryloyloxyéthyl triméthylammonium

MTMPP : 2-methyl-4’-(methylthio)-2-morpholinopropiophenone

NDA : naphatalène-2,3-dicarboxaldéhyde

ODA : octadécyl acrylate

PC : polycarbonate

PE : polyéthylène

PDMS : poly(diméthysiloxane)

PEDAS : pentaerythritol diacrylate monostearate

PEEK : polyétherétherkétone

PEGMA : polyéthylène glycol méthacrylate

PETA : pentaerythritol triacrylate

PMMA : polyméthacrylate de méthyle

SPM : sulfopropyl méthacrylate

TMPTA : triméthylolpropane triacrylate

UV : ultraviolet

XPS : X-ray Photoelectron Spectroscopy

Symboles

α : sélectivité entre deux composés

γ : facteur de tortuosité

γ_{SL} : tension interfaciale solide-liquide

γ_{SG} : tension interfaciale solide-gaz

γ_{LG} : tension interfaciale liquide-gaz

δ : épaisseur de la double couche

ε : coefficient d'extinction molaire du photoinitiateur

ε_o : permittivité du vide

ε_r : constante diélectrique du milieu

ε_t : porosité totale du monolithe

η : viscosité

θ : angle de contact

λ : longueur d'onde d'irradiation

λ_c : longueur d'onde de coupure

λ_{ex} : longueur d'onde d'excitation

λ_{em} : longueur d'onde d'émission

σ : densité de charges par unité de surface

$\sigma^2{}_{adsorption}$: contribution de l'adsorption sur la variance totale

$\sigma^2{}_{détection}$: contribution de la détection sur la variance totale

$\sigma^2{}_{détection,v}$: contribution de la détection sur la variance totale en unité de volume

$\sigma^2{}_{électrodispersion}$: contribution de l'électrodispersion sur la variance totale

$\sigma^2{}_{inj}$: contribution de l'injection sur la variance totale

$\sigma^2{}_{ext}$: contribution des effets externes sur la variance totale

$\sigma^2{}_{ext,v}$: variance de la dispersion externe en unité de volume

$\sigma^2{}_{joule}$: contribution de l'effet joule sur la variance totale

$\sigma^2{}_{sep}$: contribution du processus de séparation sur la variance totale

$\sigma^2{}_{tot}$: variance totale

μ_{eo} : mobilité électroosmotique

$\mu_{ep,i}$: mobilité électrophorétique de l'espèce i

$\bar{u}$: vitesse de la phase mobile

ζ : potentiel zêta

Υ : force ionique

φ : flux de photons

ϕ_a : rendement quantique des espèces amorceuses

χ : paramètre qui tient compte des irrégularités de remplissage de la colonne

τ : constante de temps du détecteur

a : arête du canal en microsystème

A : terme de remplissage

A_{bs} : absorbance

$A_{i,dop}$: aire du pic correspondant au soluté d'intérêt i de concentration connue

$A_{i,ech}$: aire du pic correspondant au soluté d'intérêt i à doser dans l'échantillon

B : terme de diffusion

B : réservoir contenant l'éluant

BW : réservoir contenant la poubelle de l'éluant

C : terme de résistance au transfert de masse

$C_{i,dop}$: concentration connue du soluté i

$C_{i,ech}$: concentration du soluté d'intérêt i à doser dans l'échantillon

D : débit de la phase mobile

D_M : coefficient de diffusion moléculaire du soluté dans la phase mobile

d_p : diamètre des particules constituant la phase stationnaire

E : champ électrique

F : constante de Faraday

FES : facteur d'enrichissement en signal

h_o : signal obtenu en injection classique

h : signal obtenu après préconcentration

H : hauteur équivalente à un plateau théorique

I : intersection des deux canaux

[I] : concentration en photoinitiateur

k_a : constante cinétique de l'étape d'initiation

k_c : constante cinétique de l'étape de combinaison

k_d : constante cinétique de l'étape de dissociation

k_i : facteur de rétention de l'espèce i

k_p : constante cinétique de l'étape de propagation

k_t : constante cinétique de l'étape de terminaison

l : épaisseur de l'échantillon irradié

L_{ac} : longueur occupée par le volume de soluté s'accumulant en tête de colonne

L_i : longueur occupée par le volume injecté de matrice d'injection

L_{eff} : longueur du canal

L_{fen} : largeur de la fenêtre de détection

N : efficacité

N_d : bruit au noir

N_r : bruit de lecture

P : intensité d'irradiation de la lumière incidente

P_a : intensité du rayonnement absorbé

Q_E : efficacité quantique

Q_m : quantité de soluté en phase mobile

Q_s : quantité de soluté en phase stationnaire

R : constante des gaz parfaits

R_i : vitesse d'initiation

R_p : vitesse de polymérisation

R_{pr} : vitesse de propagation

R_t : vitesse de terminaison

S/N : rapport signal/bruit

S : réservoir contenant l'échantillon

SW : réservoir contenant la poubelle de l'échantillon

t : temps de polymérisation

t_i : temps d'intégration

t_o : temps mort

t_p : temps nécessaire à l'obtention d'un courant stabme

T : température

T_g : température de transition vitreuse

$t_{m,i}$: temps de migration de l'espèce i

$v_{app,i}$: vitesse apparente de l'espèce i

v_{eo} : vitesse électroosmotique

$v_{ep,i}$: vitesse électrophorétique de l'espèce i

W : énergie d'irradiation

Table des matières

Introduction générale 1

Chapitre I : Bibliographie générale 5

I.1. Etat de l'art sur les microsystèmes séparatifs 7

I.1.1. Les différents substrats utilisés pour la fabrication des microsystèmes 8

I.1.2. Les différents fluides utilisés en microsystèmes séparatifs 16

I.1.3. Les microsystèmes à force centrifuge 19

I.1.4. Les microsystèmes séparatifs à flux hydrodynamique 20

I.1.5. Les microsystèmes séparatifs à flux électrocinétique 23

I.2. Description théorique de l'électrochromatographie 26

I.2.1. Flux électroosmotique 26

I.2.2. Electromigration 28

I.2.3. Rétention chromatographique 29

I.2.4. Nombre de plateaux théoriques 30

I.2.5. Préconcentration des échantillons en électrochromatographie 32

I.2.6. Modes d'injection en microsystème 36

I.3. Etat de l'art sur les phases stationnaires en microsystème 37

I.3.1. Fonctionnalisation des canaux 37

I.3.2. Structures COMOSS 39

I.3.3. Phases stationnaires particulaires 41

I.3.4. Vers les nouvelles phases stationnaires monolithiques 44

I.3.4.1. Les colonnes monolithiques inorganiques 45

I.3.4.2. Les colonnes monolithiques organiques adaptées à l'électrochromatographie 50

I.4. Principes de la polymérisation sous rayonnement UV 57

I.4.1. Les systèmes cationiques 59

I.4.2. Les systèmes radicalaires 61

I.4.2.1. L'initiation 61

I.4.2.2. La propagation 64

I.4.2.3. La terminaison 64

I.4.2.4. Vitesse de photopolymérisation en chaîne par voie radicalaire 65

I.4.3. Description de la polymérisation radicalaire d'un point de vue "pratique" 68

I.5. Fonctionnalisation du substrat COC 78

I.5.1. Fonctionnalisation par dépôt en phase vapeur 78

I.5.2. Fonctionnalisation du COC par l'intermédiaire d'un plasma 80

I.5.3. Fonctionnalisation par voie photochimique 82

I.6. Conclusion 88

I.7. Références bibliographiques 89

Chapitre II : Etudes préliminaires : choix d'un monolithe adapté à son support et mise en évidence des verrous technologiques 101

II.1. Matériels et méthodes 103

II.1.1. Synthèse des monolithes organiques en capillaire et en microsystème 103

II.1.1.1. Préparation du mélange de polymérisation 103

II.1.1.2. Synthèse des monolithes organiques photopolymérisés en capillaire 104

II.1.1.3. Synthèse des monolithes organiques photopolymérisés en microsystème COC 106

II.1.2. Evaluation des performances séparatives des monolithes organiques par électrochromatographie 107

II.1.2.1. Electrochromatographie en capillaire 107

II.1.2.1.1. Instrument utilisé 107

II.1.2.1.2. Etape de rinçage post-synthèse 108

II.1.2.1.3. Evaluation des performances électrochromatographiques du monolithe 108

II.1.2.2. Electrochromatographie en microsystème 109

II.1.2.2.1. Instrument utilisé 109

II.1.2.2.2. Etape de rinçage post-synthèse 111

II.1.2.2.3. Evaluation des performances électrochromatographiques du monolithe 111

II.1.3. Caractérisations morphologiques des monolithes organiques 112

II.2. Synthèse d'une phase stationnaire monolithique à base de porogènes organiques : monolithe LMA/EDMA 113

II.2.1. Article 1 : Electrochromatography in cyclic olefin copolymer microchips : a step towards field portable analysis 113

II.2.2. Optimisation de la synthèse du monolithe LMA/EDMA en capillaire 122

II.2.2.1. Effet du rapport massique monomères/porogènes 122

II.2.2.2. Effet de la proportion massique en photoinitiateur 124

II.2.2.3. Effet du rapport massique LMA/EDMA 127

II.2.2.4. Effet de la teneur en 1-propanol 128

II.2.2.5. Effet de la teneur en AMPS 129

II.2.2.6. Conclusion et perspectives 130

II.3. Synthèse d'une phase stationnaire monolithique à base de porogène aqueux : monolithe HA/BDDA 131

II.3.1.Caractérisation électrochromatographique du monolithe HA/BDDA 132

II.3.1.1. Test de la robustesse de la synthèse en capillaire 132

II.3.1.2. Influence de la durée d'irradiation 133

II.3.1.3. Influence de la composition de la phase mobile 135

II.3.1.4. Préconcentration de solutés apolaires en capillaire 136

II.3.2. Transfert de la synthèse en microsystème 137

II.4. Conclusion et perspectives 138

II.5. Références bibliographiques 138

Chapitre III : Fonctionnalisation du substrat COC....141

III.1. Matériels et méthodes 144

III.1.1. Fonctionnalisation de surfaces en COC via des initiateurs de type II 144

III.1.2. Suivi du taux de greffage par mesure d'angle de contact sur surface plane et dans un microcanal 145

III.1.3. Protocole d'ancrage du monolithe dans un canal en COC fonctionnalisé via la benzophénone 147

III.2. Fonctionnalisation du COC à l'aide de photoinitiateur de type II 147

III.2.1. Mesure de l'angle de contact sur des plaques COC fonctionnalisées PEGMA 147

III.2.2. Fonctionnalisation d'un canal COC par du PEGMA et observation de l'interface air/eau 149

III.2.3. Synthèse et ancrage du monolithe HA/BDDA dans un canal COC fonctionnalisé EDMA 150

III.3. Synthèse et ancrage simultanés du monolithe dans des microcanaux en COC à l'aide de photoinitiateur de type I 152

III.3.1. Article 2 : New "one-step" method for the simultaneous synthesis and anchoring of organic monolith inside COC microchip channel 152

III.3.2. Comparaison des performances du monolithe HA/BDDA en microsystème et capillaire 159

III.4. Conclusion 161

III.5. Références bibliographiques 161

Chapitre IV : Optimisation de la synthèse du monolithe acrylate en microsystème COC..165

IV.1. Matériels et méthodes 167

IV.1.1. Caractérisation du four UV 168

IV.1.2. Evaluation de la mobilité électroosmotique et de la rétention en microsystème 169

IV.2. Optimisation de la composition du mélange de polymérisation 170

IV.2.1. Influence du rapport massique monomères/porogènes 171

IV.2.1.1. Influence sur la structure monolithique 171

IV.2.1.2. Influence sur les performances séparatives du monolithe 173

IV.2.2. Influence du rapport massique HA/BDDA 175

IV.2.2.1. Influence sur la structure monolithique 176

IV.2.2.2. Influence sur les performances séparatives du monolithe 177

IV.3. Optimisation des conditions d'irradiation 178

IV.3.1. Article 3 : Fabrication of acrylate monolithe using photopolymerization : Effect of light intensity on electrochromatographic performance 179

IV.3.2. Correction de l'article 3 188

IV.3.3. Compléments d'information 188

IV.4. Conclusion 191

IV.5. Références bibliographiques 192

Chapitre V : Applications du dispositif analytique miniaturisé 195

V.1. Matériels et méthodes 197

V.1.1. Dérivation des amines primaires avant injection 197

V.1.2. Optimisation de la détection par fluorescence 199

V.2. Séparation de solutés sous forme neutre 201

V.3. Séparation de solutés sous forme ionisée 206

V.4. Préconcentration 208

V.5. Analyse d'échantillons réels : les vins 212

V.6. Conclusion 217

V.7. Article 4 : Electrochromatography on acrylate-based monolith in cyclic olefin copolymer microchip : a cost-effective and easy-to-use technology 217

V.8. Références bibliographiques 225

Conclusion générale et perspectives 227

Annexes 231

Annexe 1 : Les différents monomères utilisés 233

Annexe 2 : Les différents solutés séparés 234

Annexe 3 : Influence de la nature et de la concentration en monomères hydrophiles pour la modification chimique des parois en COC à partir des photoinitiateurs de type I 237

Annexe 4 : Comparaison BME-BP 239

Introduction générale

Depuis quelques années, le développement de l'analyse chromatographique sur site constitue un des axes de développement de la chimie analytique [1]. L'objectif de l'opérateur est l'analyse sur place d'un échantillon recueilli sur le terrain. Les systèmes analytiques doivent être portables donc miniaturisés, simples d'utilisation et éventuellement jetables pour une utilisation optimale lors de l'analyse sur le terrain [2]. Cette évolution a conduit, au début des années 90, à l'essor des microsystèmes séparatifs. Il s'agit de structures d'une dizaine de cm^2 comportant un réseau de canaux dont les dimensions sont typiquement de l'ordre de quelques micromètres ou dizaines de micromètres, au sein desquels une étape d'injection, une étape de séparation et une étape de détection sont successivement mises en œuvre.

Pour l'analyse de milieux liquides, les microsystèmes électrochromatographiques plastiques remplissent parfaitement les trois critères requis, à savoir portabilité, simplicité et usage unique. En effet, l'électrochromatographie est une technique analytique combinant la présence d'une phase stationnaire et la mise en mouvement d'un fluide par électroosmose [3, 4]. Elle allie ainsi les avantages de la chromatographie et de l'électrophorèse, c'est à dire une faible dispersion des solutés en raison du profil plat de vitesse du flux électroosmotique, la séparation de composés neutres grâce à l'interaction avec la phase stationnaire et l'apport d'une sélectivité supplémentaire pour les molécules chargées. De plus, l'injection et la séparation des solutés sont conduites sous un champ électrique généré par un générateur de tension et des électrodes, ce qui facilite la miniaturisation du dispositif par comparaison à l'utilisation des systèmes de pompage de la Chromatographie Liquide à Haute Performance (CLHP).

De nombreux microsystèmes électrochromatographiques en verre ont été développés durant ces dernières années mais le coût élevé du matériau lui-même et de la technologie de fabrication ne permet pas d'envisager la conception d'analyseurs jetables. Des microsystèmes réalisés à partir de matériaux polymériques tels que le polyméthacrylate de méthyle (PMMA) ou le polydiméthylsiloxane (PDMS) ont également été développés pour permettre de limiter les coûts de fabrication. Cependant, une adsorption très importante des molécules (protéines, monomères) dans le cas du PDMS et une faible résistance aux solvants organiques pour le PMMA ont été constatées. En revanche, le copolymère d'oléfine cyclique (COC) s'est avéré être un matériau de choix pour la fabrication des microsystèmes. Ce plastique possède en effet de bonnes propriétés optiques, une haute résistance chimique face aux solvants organiques et permet la fabrication de microsystèmes analytiques à des coûts relativement faibles.

La mise en œuvre de phases stationnaires dans des microcanaux en COC nécessite que ces phases présentent des caractéristiques séparatives en adéquation avec ce format. Les étapes d'introduction et d'immobilisation d'une phase stationnaire particulaire, déjà délicates à réaliser dans le cas d'un capillaire, le sont encore plus dans le cas d'un microcanal. Les phases stationnaires monolithiques organiques, qui sont des structures polymériques, continues, poreuses, synthétisées

in-situ par photopolymérisation, proposent une réelle solution à tous les niveaux : simplicité de mise en œuvre, possibilité de localiser la synthèse sur une longueur définie du microcanal et qualité des performances séparatives. De plus, de par leur mode de synthèse, leur fonctionnalité peut être adaptée à un large domaine de séparations. Ces phases stationnaires monolithiques organiques semblent réunir toutes les caractéristiques nécessaires à l'obtention de systèmes miniaturisés bien adaptés à l'électrochromatographie. Si l'apport de ces phases a largement été démontré en capillaire de silice, leur synthèse a rarement été exploitée dans des microsystèmes plastiques. Partant de ces constats, l'objectif de ce travail est de réaliser la synthèse sous rayonnement UV d'un monolithe organique robuste et performant dans un microsystème en COC, ceci afin de développer un dispositif analytique miniaturisé compatible avec l'analyse sur site. Ce dispositif implique l'intégration dans un même microsystème de différentes étapes analytiques que sont l'injection de l'échantillon, la préconcentration des analytes, la séparation et la détection des solutés. Les travaux présentés ici portent sur le développement des étapes d'injection et de séparation. Par défaut, le mode de détection utilisé est la fluorescence et les solutés d'intérêts sont naturellement fluorescents ou dérivés avant injection pour les rendre fluorescents.

Dans le premier chapitre de ce manuscrit, l'évolution des techniques séparatives miniaturisées est décrite pour justifier l'intérêt des microsystèmes électrochromatographiques face aux besoins actuels de la chromatographie. L'état de l'art sur l'utilisation des phases stationnaires monolithiques organiques en microsystème est ensuite établi en exposant particulièrement leur mode de synthèse par photopolymérisation. Pour terminer, les voies de modification chimique de la surface du COC permettant l'ancrage du monolithe sur les parois du microcanal sont présentées.

Le deuxième chapitre est d'abord dédié à l'élaboration et à la mise en œuvre des monolithes acrylates en capillaire. L'ensemble des paramètres influençant la structure et les performances séparatives du monolithe sont décrits. Ensuite, la transposition de la synthèse du format capillaire vers le format microsystème permet de mettre en évidence un certain nombre de verrous technologiques qui sont levés dans la suite de l'étude.

Dans le troisième chapitre, un nouveau procédé de synthèse et d'ancrage des monolithes acrylates à l'intérieur des microsystèmes en COC est développé. Ce procédé se déroule en une seule étape et utilise des photoinitiateurs de type I. Ces photoamorceurs sont à l'origine d'un mécanisme majoritaire générant des radicaux libres pouvant initier la polymérisation et d'un mécanisme minoritaire permettant d'abstraire des atomes d'hydrogène à la surface du matériau pour y greffer des monomères. L'ancrage du monolithe aux parois du microsystème conduit à des efficacités trois fois plus importantes que celles obtenues avec un monolithe non ancré.

Le quatrième chapitre est consacré à l'optimisation des conditions d'irradiation dans le but d'améliorer encore sensiblement les performances électrochromatographiques du monolithe, de manière à ce qu'elles soient comparables à celles observées en capillaire. L'influence de l'intensité d'irradiation sur la structure et les performances séparatives du monolithe est particulièrement discutée.

Enfin, le dernier chapitre décrit des applications potentielles du dispositif analytique miniaturisé. La possibilité de mettre en œuvre une étape de préconcentration en tête du canal de séparation afin d'obtenir des facteurs d'enrichissement très élevés sur des composés tests d'intérêt environnemental, est démontrée. Par ailleurs, des exemples de séparations de mycotoxines, neurotransmetteurs et catécholamines sont présentés. Enfin, l'intérêt de l'outil analytique miniaturisé est illustré par des séparations électrochromatographiques de matrices réelles issues de la fermentation du raisin et de la pomme (vin, cidre,…) dans le but de quantifier la concentration de certaines amines biogènes (histamine et tyramine).

[1] Li, H. F., Lin, J. M., Anal. Bio. Chem. 2009, 393, 555-567.

[2] Throckmorton, D. J., Shepodd, T. J., Singh, A. K., Anal. Chem 2002, 74, 784-789.

[3] Bartle, K. D., Myers, P., J. Chromatogr. A. 2001, 916, 3-23.

[4] Smith, N. W., Carter-Finch, A. S., J. Chromatogr. A 2000, 892, 219-255.

Chapitre I

Bibliographie générale

I.1. Etat de l'art sur les microsystèmes séparatifs

Depuis quelques années, l'analyse sur site constitue l'un des développements majeurs de la chimie analytique [1]. Il s'agit d'une technique où l'expérimentateur analyse directement sur place un échantillon recueilli sur le terrain. L'objectif est de pouvoir identifier rapidement des composés issus d'un mélange complexe, comme par exemple des traces de vie sur Mars [2] ou des polluants dans l'eau [3]. Les systèmes analytiques doivent être portables, simples d'utilisation et éventuellement jetables pour une utilisation optimale lors de l'analyse sur le terrain (**Figure I.1**) [4].

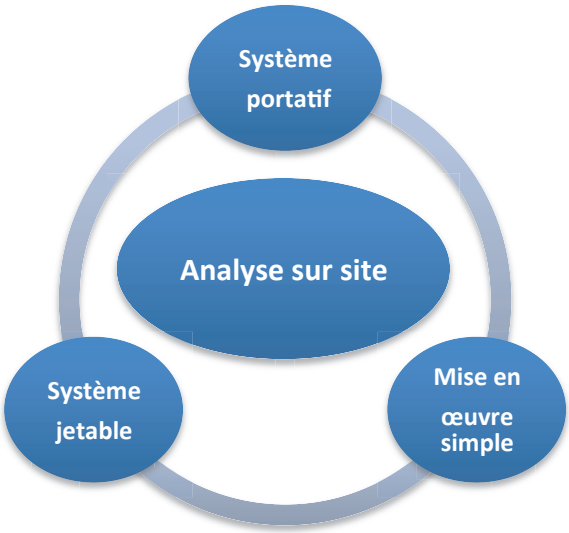


Figure I.1 : Critères requis pour la mise en œuvre de l'analyse sur site.

Il s'est avéré rapidement que les microsystèmes permettaient de satisfaire ces 3 critères. Un microsystème séparatif est une structure d'une dizaine de cm^2 comportant un réseau de canaux dont les dimensions sont typiquement de l'ordre de quelques micromètres ou dizaines de micromètres, au sein desquels une étape d'injection, suivie d'une étape de séparation et enfin d'une étape de détection sont mises en œuvre.

Ces microsystèmes séparatifs utilisent majoritairement des techniques électrophorétiques et offrent la possibilité de réaliser des analyses dans des délais très courts en consommant de faibles quantités d'échantillon. La diminution des quantités nécessaires de réactifs permet la mise en œuvre de réactions spécifiques tout en maintenant des coûts d'analyse relativement bas. Un des objectifs des microsystèmes analytiques est d'intégrer les différentes étapes de la chaîne analytique, du prétraitement des analytes à leur séparation et leur détection, dans un très petit volume, de manière entièrement automatisée. La miniaturisation des différentes étapes d'analyse a permis de minimiser les dispersions et d'accroître rapidement les performances des méthodes analytiques en terme de potentiel de séparation, de qualité de séparation, de durée d'analyse et par conséquent de coût d'analyse [5-8]. De plus, l'utilisation de matériaux peu chers pour la fabrication des microsystèmes

permet de diminuer les coûts de fabrication, procurant un caractère jetable à ces systèmes analytiques.

Le concept des microsystèmes séparatifs a été élaboré par A. Manz, qui a démontré la séparation des constituants d'échantillons de faibles volumes, en des temps très brefs [9]. Plusieurs revues ont régulièrement fait le point sur le développement des microsystèmes séparatifs qui présentent en plus de l'aspect miniaturisé une forte capacité de traitement en parallèle et une remarquable aptitude à l'automatisation [10, 11]. Ces aspects permettent d'envisager des analyses à haut-débit.

I.1.1. Les différents substrats utilisés pour la fabrication des microsystèmes

Les premiers microsystèmes dédiés à la séparation de solutés ont été fabriqués en silicium [9, 12] car les techniques de gravure de ce matériau étaient maîtrisées dans l'industrie de la microélectronique (Micro ElectroMechanicalSystems ou MEMS). C'est l'élément le plus abondant dans la croûte terrestre après l'oxygène, soit 25,7 % de sa masse. Il n'existe pas à l'état libre, mais sous forme de composés tels que le dioxyde de silicium (SiO_2) appelé silice (dans le sable, le quartz, la cristobalite, etc.), ou d'autres silicates (dans les feldspaths, la kaolinite...).

Ce matériau présente l'avantage d'être inerte chimiquement et de présenter une excellente stabilité thermique. Cependant, le silicium est opaque à la lumière visible, ne permet pas le transport de solutions alcalines et manque d'isolation électrique. L'utilisation de techniques séparatives électrocinétiques (sous champ électrique) couplée à une détection par absorption UV ou par fluorescence est donc impossible avec ce type de matériau.

Le silicium a donc été progressivement remplacé par le verre qui, en plus d'être un matériau transparent pour la détection optique, permet de fabriquer des microcanaux de différentes tailles (de 10 à 300 µm) et de différentes compositions chimiques (pyrex et silice fondue). De plus, le verre est un conducteur ionique à très faible conduction et est très résistant aux agressions chimiques. Les coûts de fabrication sont réduits bien que les techniques de gravure restent identiques à celles utilisées pour le silicium. Le dépôt d'une couche de résine photosensible sur le substrat est d'abord réalisé. L'insolation de cette résine au travers d'un masque permet de transférer le motif présent sur le masque vers la résine par photolithographie UV. Une étape de gravure est ensuite appliquée permettant de définir la forme et la profondeur des microcanaux. Les deux types de gravure les plus utilisés sont :

- la gravure humide qui utilise des solutions chimiques (HF, HNO_3, NH_3, H_3PO_4) pour dissoudre le silicium ou le verre par réaction d'oxydo-réduction [13, 14].
- la gravure ionique réactive anisotrope par plasma (ou DeepReactive Ion Etching (DRIE)), qui fait intervenir à la fois les effets d'un bombardement ionique et d'une réaction chimique. Un plasma d'espèces dissociées (électrons et radicaux ionisés) est généré dans le réacteur [15, 16]. Les plasmas employés sont à base de fluor (SF_6, CF_4 ou CHF_3).

Les deux types de gravure peuvent avoir soit un caractère isotrope si le profil de la gravure est symétrique dans toutes les directions de la région attaquée, soit un caractère anisotrope si une direction donnée (plans cristallographiques) est privilégiée permettant ainsi d'obtenir des profils de gravure directionnels. Il semblerait que la gravure humide permette de graver des structures plus profondes que la gravure ionique (20 µm au lieu de 5 µm), à des vitesses plus élevées (1.2 µm/min au lieu de 0.11 µm/min) et de meilleure qualité (rugosité de 5 nm soit 10 fois plus faible qu'en DRIE).

Le microsystème est ensuite fermé par collage des deux plaques. Il existe plusieurs techniques de collage [15, 17-20] :

- ✓ le collage par fusion thermique est la méthode la plus répandue. Lors du chauffage à une température supérieure à la température de transition vitreuse du matériau (celui-ci se ramollit), l'eau présente à l'interface entre les plaques est évaporée de telle sorte que deux groupes silanols forment un pont siloxane covalent entre les substrats.
- ✓ le collage anodique est une technique de fermeture thermique assistée par un champ électrique. Cette méthode combine la formation de ponts siloxanes et la création d'interactions électrostatiques.
- ✓ le collage par adhésion utilise une couche intermédiaire (colle ou dérivé polymérique) pour sceller les deux substrats. Par exemple, la société Invenios a mis au point un procédé de collage de deux plaques de verre qui se réalise à température ambiante et qui ne nécessite pas un appareillage complexe [21], simplifiant ainsi la fabrication des microsystèmes en verre. Ce protocole, breveté en 2012, utilise une encre de grande résistance chimique et thermique pour coller les plaques en verre.

Bien que les techniques de gravures de ces matériaux soient maîtrisées et permettent d'obtenir des microcanaux de dimensions 10 µm × 10 µm, le processus de fabrication est long, coûteux et nécessite des équipements tels qu'une salle blanche et un savoir-faire adéquat. Dolomite et Micronit sont les deux sociétés leaders dans la fabrication et la vente de microsystèmes en verre. Leurs catalogues produits renferment un grand nombre de microsystèmes de différentes géométries dont le prix unitaire minimal est de l'ordre de 250 euros (**Figure I.2**) [22].

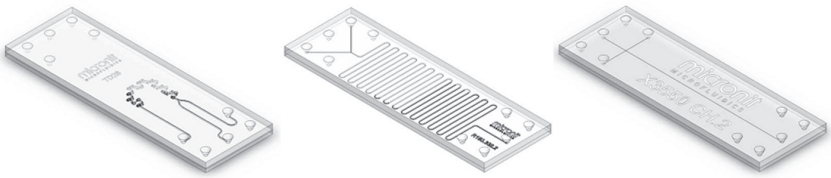


Figure I.2 : Photographies de quelques microsystèmes en verre fabriqués par Micronit [22].

Durant ces dix dernières années, le développement de nouvelles techniques de microfabrication a permis la mise en œuvre de matériaux polymériques. Un polymère est une substance généralement organique ou semi-organique, caractérisée par la répétition d'un ou plusieurs types de motifs

monomères. Le procédé de polymérisation est déclenché par une substance initiatrice et/ou un changement des paramètres physiques (lumière, température, pression). Deux caractéristiques physico-chimiques sont particulièrement importantes pour la mise en forme des polymères :

- ✓ la température de transition vitreuse (T_g) : lorsque la température d'une masse polymère est au dessus de son T_g, elle est dans un état caoutchouteux proche d'un liquide très visqueux.
- ✓ la température de fusion (T_m) qui correspond au passage de l'état solide à l'état liquide.

La liste des polymères utilisés pour la fabrication des microsystèmes est longue. Chacun d'entre eux présente des avantages physicochimiques, optiques ou mécaniques très intéressants ainsi que des coûts de production faibles. Le polyétherétherkétone (PEEK), par exemple, supporte des températures de 250°C et est très résistant chimiquement. Certains polymères (**Tableau I.1**) comme le polydiméthylsiloxane (PDMS), le polyméthylméthacrylate (PMMA), le polycarbonate (PC) et le copolymère d'oléfine cyclique (COC) présentent une grande transparence. Ces matériaux sont aussi des isolants électriques qui peuvent être chargés avec des poudres appropriées pour les rendre conducteurs ou encore pour changer leurs propriétés magnétiques.

Tableau I.1 : Liste des principaux polymères utilisés pour la microfabrication.

Polymères	Structure chimique	Monomères	Tg (°C)
PDMS		diméthylsiloxane	-184
PMMA		Méthacrylate de méthyle	105
PC		bisphénol A (BPA) carbonate	150
COC		norbonène ethylène	136 (COC Topas 5013)

Le PDMS est aujourd'hui le matériau le plus utilisé pour la fabrication des microsystèmes polymériques [23-27]. Son utilisation dans le domaine des microtechnologies a été initiée par l'équipe de Whitesides [63] puis, du fait des nombreuses qualités de ce polymère, elle s'est généralisée pour les applications microfluidiques. En effet, le PDMS est très simple à manipuler et permet de répliquer parfaitement par moulage des motifs micrométriques. Sa manipulation nécessite peu de matériel : une enceinte sous vide pour éliminer les bulles formées lors du mélange et un four pour déclencher la réticulation. En plus de la simplicité de manipulation, le PDMS a les propriétés suivantes [23, 24, 28] :

- ➢ c'est un polymère hyper élastique. A l'instar du caoutchouc, il peut donc subir de très grandes déformations sans se dégrader et constitue donc un matériau de choix pour la réalisation de membranes déformables.

- il est biocompatible et donc utilisable dans le domaine médical.
- il est naturellement hydrophobe, mais il existe des traitements permettant de le rendre hydrophile lorsque cela s'avère nécessaire [26, 29].
- il est poreux aux gaz, mais pas aux liquides.

Actuellement, le COC est le matériau le plus en vogue pour la fabrication des microsystèmes [22, 24, 30-32]. Il remplace de plus en plus le PDMS dans les laboratoires de recherche car les phénomènes d'adsorption rencontrés lors de l'analyse de l'ADN ou de protéines y sont moins importants [18]. Le COC absorbe 4 à 10 fois moins d'eau que le PMMA, le PDMS ou le PC [18]. De plus, il est résistant à l'hydrolyse, aux acides, aux agents alcalins ainsi qu'aux solvants polaires tels que le méthanol. D'une manière générale, le COC possède une meilleure résistance chimique que les autres matériaux polymériques (**Tableau I.2**) [18] mais des propriétés mécaniques similaires au PMMA et au PC. De plus, le COC est un très bon isolant possédant une résistivité supérieure à 10^{16} Ω.cm. Il est donc envisageable d'appliquer de forts champs électriques pour la mise en mouvement des fluides par électroosmose dans des microcanaux en COC.

Tableau I.2 : Résistance chimique des différents substrats polymériques utilisés en microsystème. (+) résistant, (°) peu résistant et (-) aucune résistance [18].

	COP	PMMA	PC	PS
Acids, dilute or weak	+	°	+	+
Acids, strong and conc.	+	–	–	°
Alcohols, aliphatic	+	–	°	+
Aldehydes	°	°	°	–
Bases	+	°	–	+
Esters	+	–	–	–
Hydrocarbons, aliphatic	–	°	°	–
Hydrocarbons, aromatic	–	–	–	–
Ketones	°	–	–	–

Enfin, le COC possède de bonnes propriétés optiques proches du verre, ce qui permet d'envisager des détections optiques (**Figure I.3**) [18].

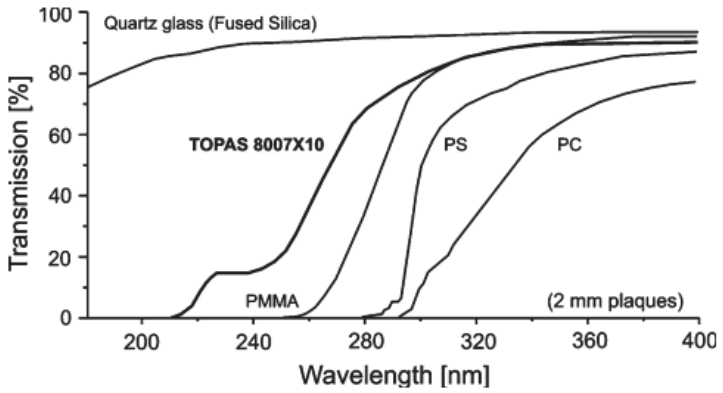


Figure I.3 : Transmittance des principaux matériaux polymériques dans le domaine UV [18].

La société Microfluidic Chipshop est la société leader dans la fabrication des microsystèmes en COC dont le prix est inférieur à 30 euros pièce (**Figure I.4**) [33].

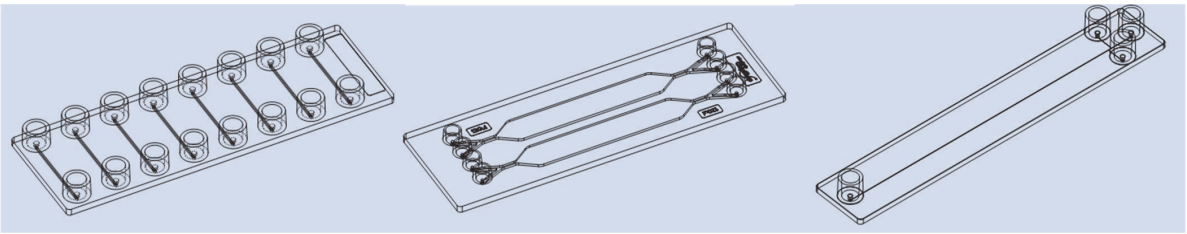


Figure I.4 : Schéma de quelques microsystèmes en COC fabriqués par Microfluidic Chipshop [33].

Il existe deux voies de polymérisation du COC : soit par copolymérisation d'un monomère cyclique (norbornène) avec de l'éthylène (appelé TOPAS®), soit par polymérisation du norbornène par ouverture de cycle suivi d'une hydrogénation (appelé ZEONOR©) (**Figure I.5**) [18].

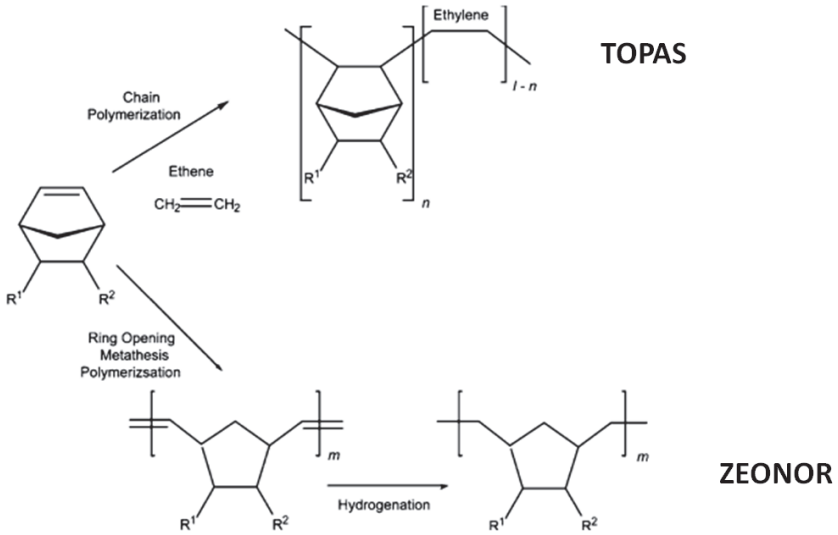


Figure I.5 : Les voies de polymérisation du copolymère d'oléfine cyclique (COC) [18].

Le monomère norbornène est synthétisé à partir du cyclopentadiène et de l'éthylène suivant la réaction de Diels-Alder [34]. Le pourcentage de norbornène présent dans la composition du mélange de polymérisation a un impact important sur les propriétés physiques du COC TOPAS® et peu sur ses propriétés optiques [34]. Ainsi, les différentes catégories (nommées "qualité") du COC TOPAS peuvent être établies en fonction du pourcentage de norbornène, qui influe directement sur la température de transition vitreuse T_g (**Tableau I.3**).

Tableau I.3 : Variation de la température de transition vitreuse T_g en fonction de la qualité du COC [34, 35]

Qualité du TOPAS©	Tg (°C)	Norbonène (% wt)
8007	78	65
5013	136	75
6013	138	76
6015	160	79
6017	178	82

Dernièrement, Carlborg *et al.* ont développé le matériau thiol-ène (OSTE®) afin de palier au manque de réactivité des substrats polymériques [36]. Ce matériau présente l'avantage d'avoir quasiment les mêmes propriétés physiques que le COC mais avec une chimie de surface plus accessible. Des fonctionnalisations de surface de l'OSTE® peuvent être réalisées directement sur des groupements thiol ou des groupements allyliques présents à la surface du matériau. La densité de ces groupements dépend de la composition initiale en triallyl et en tétrathiol du mélange de polymérisation. L'OSTE est développé et vendu par la société MerceneLabs depuis Avril 2012 [37] et peut réellement être considéré comme un matériau d'avenir.

Deux techniques de micro-structuration sont majoritairement utilisées pour la fabrication de microsystèmes polymériques [18, 38]:

- L'emboutissage à chaud ou *hot embossing* (**Figure I.6**) est une technique de réplication dans laquelle une surface thermoplastique est chauffée par l'outil à une température supérieure à sa température de transition vitreuse T_g et pressée sur un moule possédant la géométrie des micro-canaux souhaitée [27].

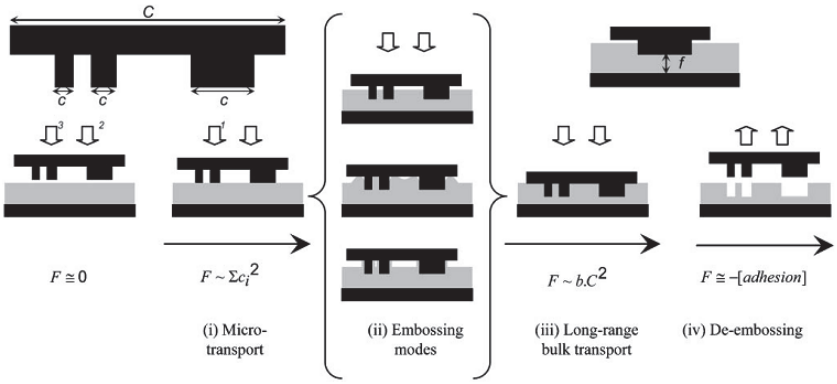


Figure I.6 : Représentation schématique de la technique hot embossing [39].

- Le moulage par injection ou *injection molding* (**Figure I.7**) est une technique plus largement utilisée dans l'industrie [40-42]. Dans un premier temps, l'enceinte renfermant la matrice est fermée, puis chauffée au-dessus de la température de transition vitreuse T_g du polymère et mise sous vide.

L'injection du polymère préalablement chauffé peut alors débuter. Après refroidissement, la pièce est démoulée. L'avantage de cette technique est qu'elle permet de réduire les temps de fabrication d'un facteur 10 par rapport à la technique de hot embossing.

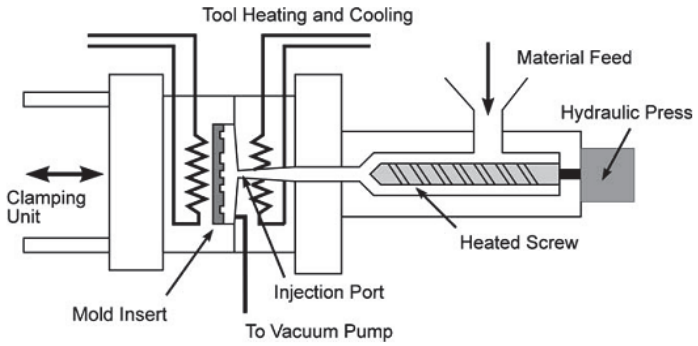


Figure I.7 : Représentation schématique de la technique de moulage par injection [43].

D'autres techniques de microfabrication telles que l'ablation laser [43], l'emboutissage à chaud sur rouleau [44] ou le micro-usinage [18] sont actuellement en cours de développement. La société Aremac [45] utilise le micro-usinage pour la fabrication des microsystèmes COC car cette technique permet de fabriquer facilement et rapidement des prototypes de géométrie variée sans avoir recours à un moule de coût élevé. Les techniques de collage à base d'un mélange de solvant, d'un plasma UV, d'une élévation de température ou d'une couche polymérique intermédiaire introduite par irradiation UV permettent de sceller de manière irréversible deux substrats polymériques [18, 27, 32, 35, 38, 46]. La liaison irréversible entre les deux morceaux après un traitement au plasma d'oxygène est due à la formation de groupements hydroxyles et à la conformalité du contact du fait des propriétés élastomères du matériau, ce qui conduit à la formation de liaison Si-O-Si dans le cas du PDMS. Une rugosité trop importante risque de diminuer l'efficacité de ce contact, et donc de l'adhérence.

L'ensemble de ces technologies de micro-fabrication permet l'élaboration d'un microsystème en quelques heures, à faible coût pour ce qui est de la matière première et ne nécessitant pas un environnement de type salle blanche. Les polymères sont donc aujourd'hui des matériaux de choix pour la réalisation de microsystèmes dans les laboratoires de recherche.

Une étude réalisée en 2010 par la société Yole Developpement SA montre la répartition des matériaux utilisés pour la fabrication des microsystèmes en fonction du domaine d'application (**Figure I.8**)[47].

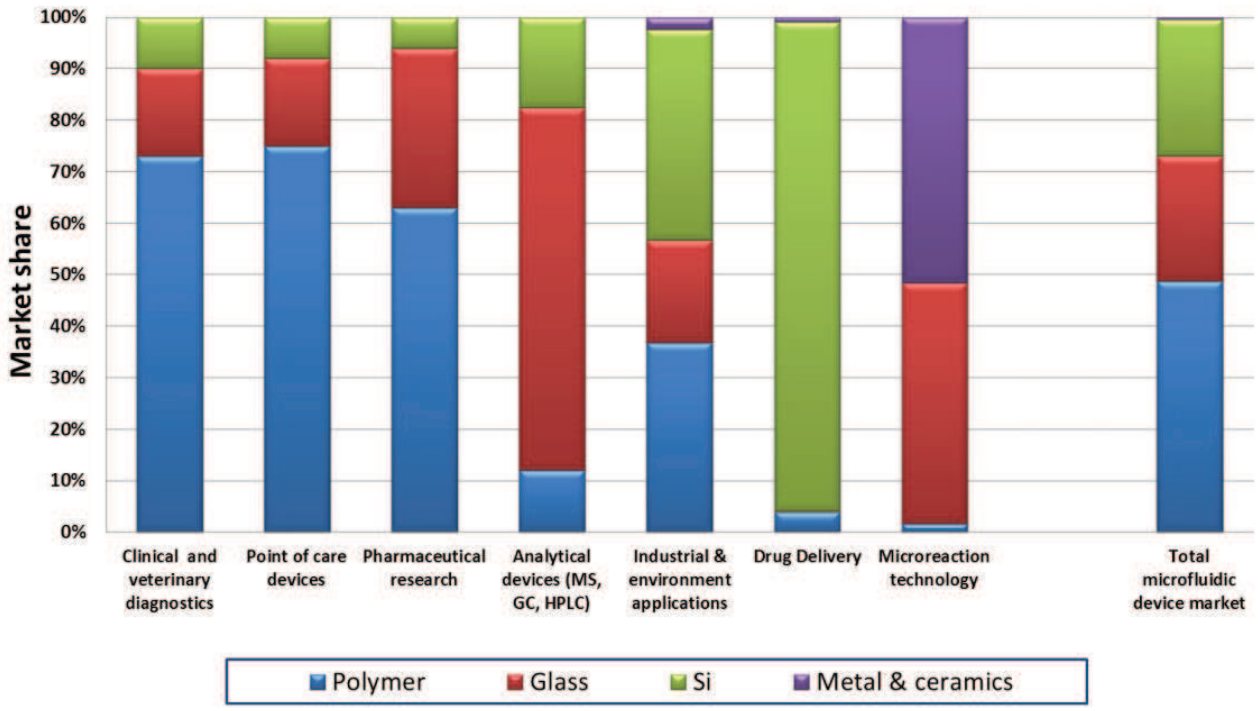


Figure I.8 : Répartition des différents matériaux utilisés pour la fabrication des microsystèmes en fonction des domaines d'application [47].

Nous remarquons rapidement que le choix du matériau dépend fortement du domaine d'application. Les polymères sont principalement utilisés dans le domaine des diagnostics cliniques/vétérinaires et dans la recherche pharmaceutique (screening) pour leur caractère jetable (usage unique) permettant d'éviter toute contamination croisée entre différentes analyses ainsi que pour leur biocompatibilité avec les échantillons biologiques. A contrario, le verre et le silicium sont très utilisés pour les dispositifs d'administration de médicaments (drug delivery) pour éviter les phénomènes d'adsorption. Ces matériaux permettent également d'obtenir des dimensions de canaux plus faibles qu'avec les polymères.

Pour les systèmes analytiques, les microsystèmes verre sont très utilisés car ce matériau a une chimie de surface proche de celle des phases stationnaires classiquement utilisées en chromatographie, ce qui facilite donc leur intégration. De plus, le verre est un matériau transparent compatible avec la détection optique, ce qui simplifie fortement la miniaturisation des systèmes analytiques classiques. Cependant, de nombreux développements sont actuellement réalisés pour intégrer les matériaux polymériques dans les systèmes analytiques afin de réduire les coûts de fabrication [25].

Au total, les microsystèmes polymériques représentent plus de 50% du marché. Cette part devrait augmenter dans les 10 prochaines années grâce à leurs atouts indéniables.

I.1.2. Les différents fluides utilisés en microsystèmes séparatifs

Les premiers microsystèmes dédiés aux sciences séparatives ont utilisé un gaz comme fluide et sont apparus en 1979, année où la première micro-colonne chromatographique en phase gazeuse a été réalisée sur un wafer de silicium par Terry *et al.* [12]. Les micro-colonnes utilisées mesurent généralement entre 2 et 5 m de longueur avec une section carrée de 50 µm × 50 µm [48]. Les parois des micro-colonnes sont recouvertes d'un film de phase stationnaire pour permettre la séparation de composés gazeux.

Il existe un certain nombre de phases stationnaires dont les principales sont le phényl-tris(dimethylsiloxy)silane [49], le tétrafluoroethylene [50], le diméthylpolysiloxane [51] et le trifluoropropylméthylpolysiloxane [51]. Ces deux dernières phases stationnaires ont permis la séparation de 20 solutés de polarités différentes en moins de 10 minutes (**Figure I.9**).

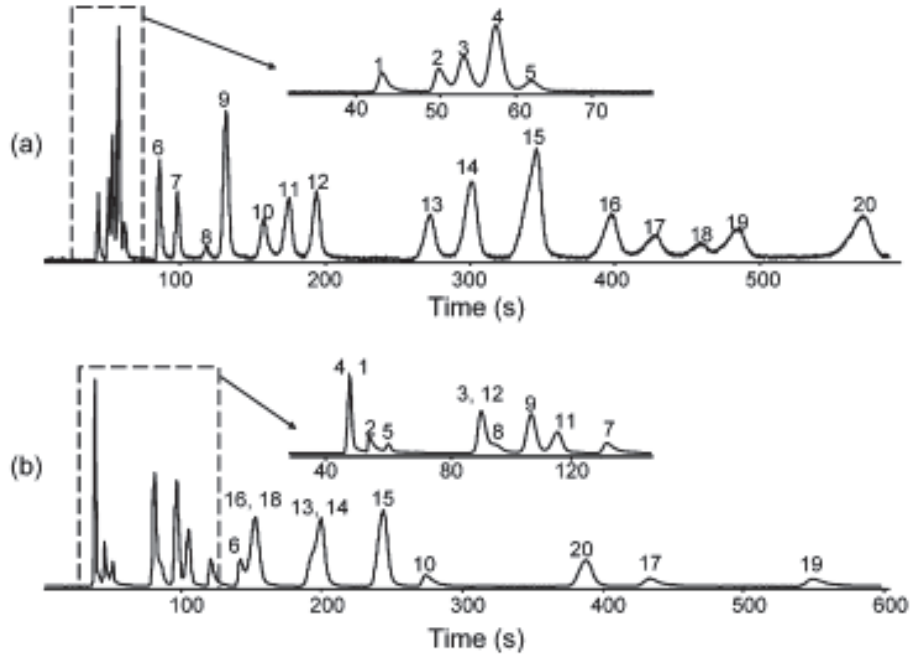


Figure I.9 : Séparation de 20 solutés à 22°C avec une phase stationnaire (a) non-polaire dimethylpolysiloxane et (b) polaire trifluoropropylmethylpolysiloxane [51].

La circulation du gaz dans les canaux micrométriques est difficile à réaliser et nécessite une géométrie adaptée. Un grand nombre de géométries de microcolonnes chromatographiques en silicium sont référencées dans la littérature (**Figure I.10**): spirale circulaire, spirale carrée et serpentin [49]. Il a été démontré que les micro-colonnes chromatographiques en serpentin permettaient d'obtenir un nombre de plateaux théoriques plus important, donc une meilleure séparation en minimisant la dispersion des solutés. De plus, cette géométrie permettait une meilleure répartition du gaz dans tout le volume des microcanaux, facilitant ainsi sa circulation.

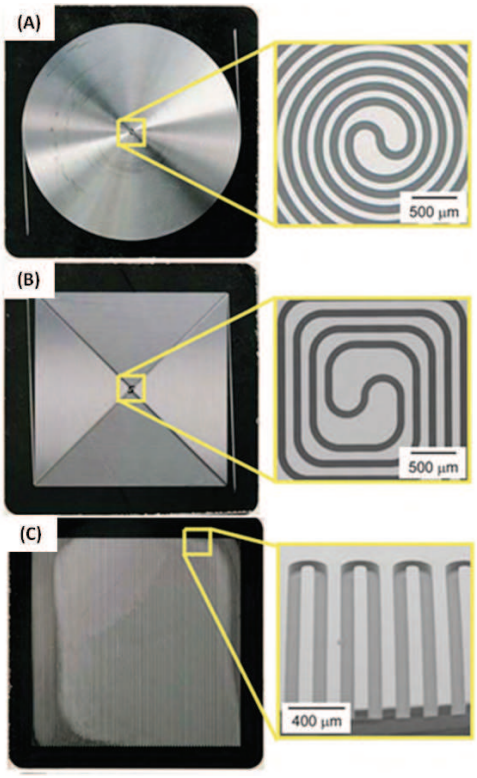


Figure I.10 : Différentes géométries des micro-colonnes chromatographiques.
(a) spirale circulaire, (b) spirale carrée et (c) serpentin [49].

Pour l'alimentation en gaz vecteur, les premières colonnes chromatographiques développées utilisaient des capillaires d'accès positionnés perpendiculairement au micro-canal [12, 49-54]. L'inconvénient majeur avec ce type de connexion réside dans l'apparition de pertes de charges non négligeables engendrant au final des fuites sous l'effet de la pression d'entrée du gaz vecteur et de la température. Récemment, une nouvelle géométrie a été développée, utilisant les techniques d'usinage du silicium. Ces nouvelles micro-colonnes présentent des connections réalisées dans l'axe du micro-canal afin de limiter les pertes de charges en entrée [45]. Ces micro-colonnes chromatographiques sont généralement placées en amont d'un capteur semi-conducteur de type SnO_2 permettant de détecter sélectivement les composés organiques volatiles (COV) dans l'atmosphère tels que le benzène, le toluène ou le fluorure d'hydrogène [55]. Une étape de préconcentration sur charbon placé en amont de la micro-colonne chromatographique a ainsi permis d'améliorer les limites de détection des COV [45].

Les microsystèmes séparatifs en phase liquide ont également été très développés. Manz *et al.* ont réalisé le premier microsystème en silicium/pyrex pour la chromatographie liquide en 1990 [9] (**Figure I.11**).

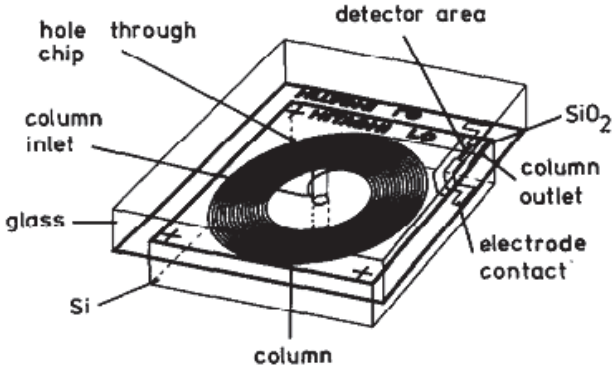


Figure I.11 : Schéma général du microsystème séparatif en silicium développé par Manz *et al.* [9].

Ceci a eu pour effet de dynamiser la recherche dans le secteur des microsystèmes séparatifs, comme en atteste l'augmentation exponentielle du nombre de publications dans le domaine de la microfluidique depuis 1990 (**Figure I.12**) [56].

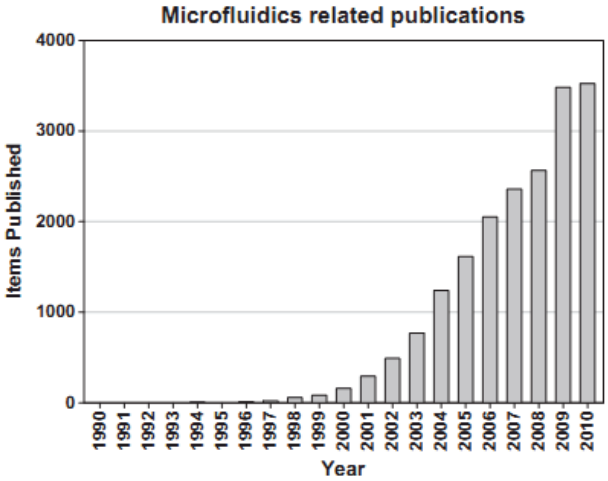


Figure I.12 : Augmentation du nombre annuel de publications dans le domaine de la microfluidique depuis 1990 [56].

Les microsystèmes à flux segmenté (*segmented-flow microfluidcs* ou *digital microfluidics* ou *droplet-basedmicrofluidics*) sont un bon exemple de la formidable capacité d'utilisation de ces microsystèmes [56]. Ils permettent par l'intermédiaire de deux liquides non miscibles de générer un flux de gouttelettes à l'intérieur du micro-canal sous l'action de micropompes [57] ou de lumière [58]. Chaque gouttelette, agissant comme un microréacteur, est produite à haute fréquence (de l'ordre de quelques kHz) et à des volumes allant jusqu'au femtolitre [59]. L'avantage indéniable de cette technologie est de pouvoir réaliser un grand nombre d'expériences simultanément étant donné la formation rapide des gouttelettes, et donc de réduire les durées d'expérience. Par exemple, il est possible, par l'intermédiaire d'un gradient de trouver très rapidement les conditions de cristallisation des protéines (300 000 échantillons peuvent-être étudiés en 100 s sous une fréquence de 3 kHz)[59].

La génération de gouttelettes peut être réalisée passivement en utilisant la géométrie du canal ou activement par l'intermédiaire d'un champ électrique (**Figure I.13**). Diverses opérations ont été

réalisées en utilisant ce procédé telles que la fragmentation [60], la fusion [61], le mixage [62] ou la sélection de gouttelettes [63].

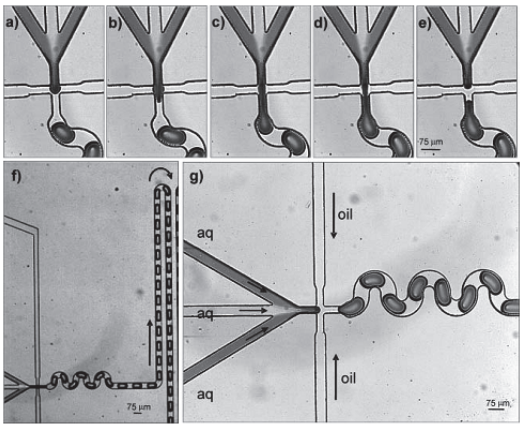


Figure I.13 : Utilisation d'un microsystème à flux segmenté pour mélanger deux liquides sous forme de gouttelettes [59].

Ce genre d'utilisation des microsystèmes est assurément prometteur comme en atteste le très grand nombre de publications scientifiques qui paraissent chaque année dans le journal "Lab on a Chip". Cependant, ils ne sont encore pas utilisés comme outil de séparation de solutés.

Trois modes de mise en mouvement des liquides à l'intérieur des microsystèmes séparatifs sont référencés :

- ✓ le flux hydrodynamique généré par centrifugation
- ✓ le flux hydrodynamique généré par pression
- ✓ le flux électroosmotique

I.1.3. Les microsystèmes à force centrifuge

Etant donné l'omniprésence de la centrifugation dans les techniques macroscopiques de séparation sanguine, la miniaturisation de cette technique est devenue une option évidente en microsystème [64, 65]. L'utilisation de la force centrifuge comme moyen de mise en mouvement des liquides est utilisée depuis la fin des années 60 [53]. La vitesse des fluides au sein du microsystème dépend de la vitesse de rotation ainsi que de la résistance hydrodynamique. Des débits variant de quelques $nL.s^{-1}$ à 1 $mL.s^{1}$ peuvent-être générés avec ce type de microsystème [53].

Parmi les différents microsystèmes fondés sur la centrifugation, on distingue ceux concernant l'adaptation de la centrifugation standard sur un CD en rotation (chip CD). Cette configuration a été utilisée par la société Abaxis afin de commercialiser un analyseur clinique jetable au début des années 1990 (**Figure I.14**) [66]. Ce système, permettant le diagnostic des maladies dans le sang, est constitué d'un microsystème plastique en forme de CD et de plusieurs cartouches contenant des

réactifs sous forme de poudre et introduits dans des réservoirs usinés dans le microsystème. Madou *et al.* ont développé un microsystème similaire permettant de réaliser 24 tests ELISA en même temps [67]. Chaque étape du test ELISA est contrôlée par la vitesse de rotation du microsystème.

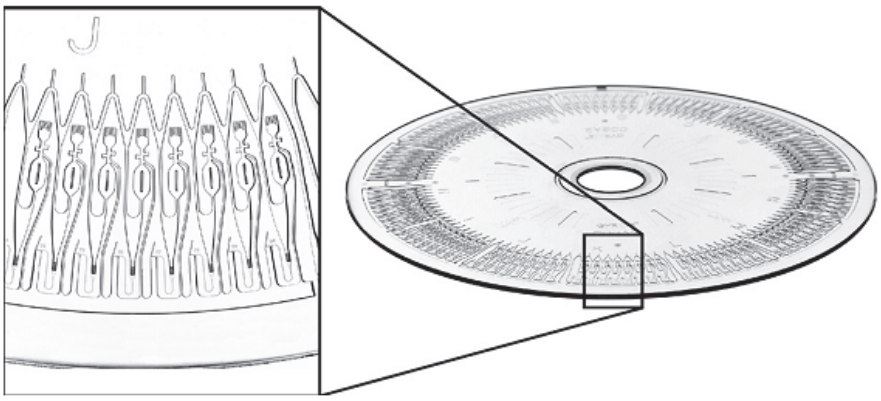


Figure I.14 : Représentation schématique d'un microsystème utilisant la force centrifuge comme un moyen de mise en mouvement des fluides dans les microcanaux [53].

Sur le même principe, l'analyse d'anticorps a été réalisée par immunoaffinité en immobilisant des métaux à la surface du verre [64].

Ces microsystèmes sont actuellement très développés dans le domaine médical car ils permettent de diminuer considérablement le temps des analyses ainsi que la quantité d'échantillon injectée.

Cependant, ces microsystèmes à force centrifuge ont été très peu utilisés pour la séparation de solutés. Ainsi, un seul groupe de recherche a travaillé en 2004 dans ce domaine et a pu obtenir l'analyse d'une digestion de BSA [68]. Ils ont couplé une puce CD avec un spectromètre de masse (MALDI) afin de pouvoir analyser quasi-simultanément 96 échantillons. Le canal de séparation contient des microstructures de type COMOSS pour retenir et préconcentrer la BSA avant qu'elle soit nettoyée, cristallisée et envoyée dans le MALDI pour la détection.

I.1.4. Les microsystèmes séparatifs à flux hydrodynamique

La mise en mouvement des liquides par l'application d'une pression générée par des pompes mécaniques (externe ou interne) a été très utilisée dans le domaine de la miniaturisation des sciences séparatives [69]. La technique NanoLC qui consiste à mettre en œuvre la chromatographie liquide par le biais d'une pompe externe dans des colonnes capillaires de diamètre interne variant de 10 à 100 µm, a très rapidement trouvé sa place dans les laboratoires. La société Agilent Technologies (Santa Clara, Etats-Unis) a développé une approche "top-down" en intégrant la boucle d'injection et la colonne de séparation dans un microsystème en polyimide (**Figure I.15**) [70] appelé chip LC-MS. Ce dispositif a permis d'améliorer considérablement la robustesse de l'instrumentation, sa facilité d'utilisation et la réduction des risques de fuites. En termes de performances, il a été démontré que

l'intégration d'une partie de l'injecteur dans le microsystème minimise les phénomènes de dispersion externe et permet donc d'améliorer les séparations (**Figure I.16**) [70].

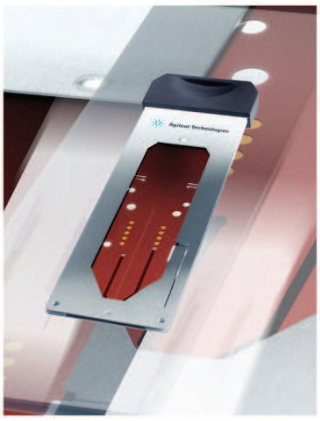


Figure I.15 : Photographie de la chip LC-MS d'Agilent [56].

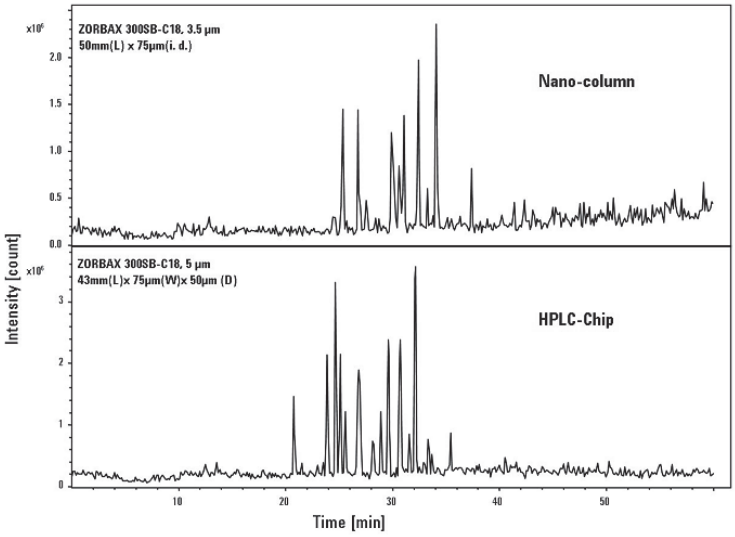


Figure I.16 : Séparation d'une digestion tryptique de BSA par l'intermédiaire d'une phase stationnaire particulaire C18 introduite (a) dans un capillaire et (b) dans la chip LC-MS d'Agilent [71].

Un autre microsystème chromatographique, appelé cHiPLC, a récemment été mis sur le marché par la société californienne Eksigent (Dublin, Etats-Unis) [72]. La puce en verre pouvant contenir des particules de silice fonctionnalisées C_{18} de différentes tailles est positionnée sur une station d'accueil permettant sa connexion sans volume mort au système d'injection.

Le système de pompage constitue une composante instrumentale essentielle des microsystèmes LC. Dans de nombreux cas, il consiste en un jeu de pompes classiques externes qui sont connectées à la puce chromatographique par l'intermédiaire d'un diviseur de débit [71, 73, 74] ce qui anéantit complètement l'argument de l'économie de solvant. Il a donc été important de développer des micropompes externes, capables de délivrer des débits de l'ordre du nanolitre par minute, tout en conservant des gammes de pressions de quelques centaines de bars [75, 76]. Le système cHiPLCNanoflex de la société Eksigent [72] présente deux micropompes pneumatiques externes

munies de capteurs de débit permettant de mettre en mouvement la phase mobile en amont de la chambre de mélange. La régulation de très faibles débits au niveau de chacune des pompes en début et en fin de gradient est cependant difficile à obtenir. Il est nécessaire de miniaturiser la chambre de mélange pour minimiser le temps de délai du gradient.

Lors de la mise en œuvre de gradient en microsystème, un autre point critique peut être le volume de délai. En effet, les débits étant extrêmement faibles, le temps de délai résultant est important. Brennen *et al*. [77] ont résolu ce problème en intégrant également la chambre de mélange sur la puce. Dans cette approche, le gradient est préparé et stocké en amont, si bien que la durée de délai est significativement réduite, avec un volume de délai de quelques nanolitres. En contrepartie, cela signifie que le volume de gradient (volume nécessaire entre la composition initiale et la composition finale du gradient) devient fixé par l'architecture de la puce.

Cette approche top-down consistant en la miniaturisation des instruments classiques de chromatographie liquide est intéressante mais complique la mise en œuvre de ces systèmes analytiques. Ces chip-LC ne sont donc pas envisageables pour l'analyse-sur-site.

Les micro-pompes électrochimiques intégrées dans le microsystème permettent de contourner ce problème. Elles sont basées sur la production d'un gaz par électrolyse à l'intérieur d'un réservoir en utilisant une faible tension de 20 V. Sous une tension faible, elles permettent d'appliquer des pressions de 15 – 20 bars et de générer des débits de phase mobile de l'ordre de 80 nL/min dans des micro-canaux partiellement [78] ou totalement remplis [15].

Les pompes électroosmotiques sont également un autre moyen d'appliquer une pression dans des dispositifs miniaturisés. Elles permettent de générer des débits de l'ordre de quelques centaines de nL/min par l'application d'un champ électrique. Plusieurs groupes de recherche ont utilisé le principe d'électro-osmose (détaillé dans la partie I.2.1) pour mettre en mouvement un liquide dans des micro-canaux. Lazar *et al.* ont conçu un réseau de 200 nano-canaux dans une puce en verre afin de générer un flux électrosmotique et ainsi permettre l'application d'une perte de charge dans un micro-canal de 2 cm de long rempli de particules de silice C_{18} 5 µm [17]. Le groupe de Collins a, quant à lui, utilisé le flux électroosmotique généré par une phase stationnaire particulaire de silice pour mettre en mouvement le liquide dans une deuxième phase stationnaire placée en aval [79] (**Figure I.17**). Un champ électrique de 670 V/cm est appliqué entre les réservoirs PI (contenant l'électrolyte) et PO (poubelle) afin de mettre en mouvement le liquide dans la seconde phase stationnaire. L'application d'un champ électrique entre le réservoir SI, qui contient l'échantillon, et PO permet de réaliser des injections dans la deuxième colonne.

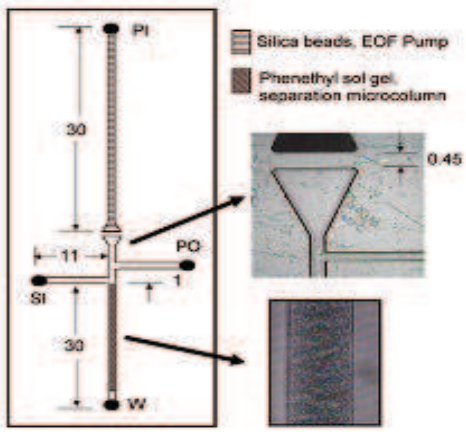


Figure I.17 : Schéma du dispositif de Collins qui utilise une première phase stationnaire pour la mise en mouvement d'un liquide dans une seconde phase stationnaire [79].

Ces micro-pompes électrochimiques ou électroosmotiques permettent de miniaturiser au maximum l'instrumentation pour le rendre portatif mais ne permettent pas de générer des débits suffisamment importants et sont encore à l'état de prototype.

I.1.5. Les microsystèmes séparatifs à flux électrocinétique

L'utilisation de champs électriques appliqués aux bornes des espaces de travail est à ce jour le moyen le plus simple pour miniaturiser toutes les étapes nécessaires à l'analyse (injection, élution, ...). La mise en mouvement des espèces est alors due au flux électroosmotique et/ou au flux électrophorétique qui s'établissent dans les canaux (ces flux sont détaillés dans la partie I.2). Les champs électriques sont délivrés par un générateur de tension via des électrodes plongées dans les réservoirs à l'extrémité des canaux.

L'utilisation de cette instrumentation facilite la miniaturisation des systèmes analytiques, à la différence des systèmes de pompage utilisés en LC. De plus, l'un des points forts du flux électroosmotique est de présenter un profil de vitesse plat (contrairement au profil parabolique observé en flux hydrodyamique) permettant de minimiser la dispersion des solutés dans les micro-canaux.

Les séparations électrocinétiques en microsystème ont été très développées comme en attestent les revues de Wu [80] ou de Karlinsey [81]. Ces séparations sont réalisées par électrophorèse de zone libre (CZE), par isotachophorèse (ITP), par chromatographie électrocinétique micellaire (MEKC) ou par électrochromatographie (EC).

L'électrophorèse de zone libre (CZE) est la technique électrocinétique la plus simple à mettre en œuvre et la plus utilisée dans les microsystèmes [28]. Le principe de cette technique consiste à séparer les espèces chargées positivement ou négativement. Par l'application d'un champ électrique, ces espèces acquièrent une vitesse apparente ($v_{app,i}$) qui est la somme algébrique de la vitesse électrophorétique de l'espèce ($v_{ep,i}$) et de la vitesse électroosmotique du milieu (v_{eo}).

$$v_{app,i} = v_{ep,i} + v_{eo} = (\mu_{ep,i} + \mu_{eo}).E \quad \textbf{(I.1)}$$

$\mu_{ep,i}$ et μ_{eo} sont respectivement la mobilité électrophorétique de l'espèce et la mobilité électroosmotique du milieu. E est le champ électrique appliqué entre les extrémités du canal. La **Figure I.18** montre la séparation de 4 acides aminés réalisée dans un microsystème en PDMS/verre à un pH où les solutés sont chargés.

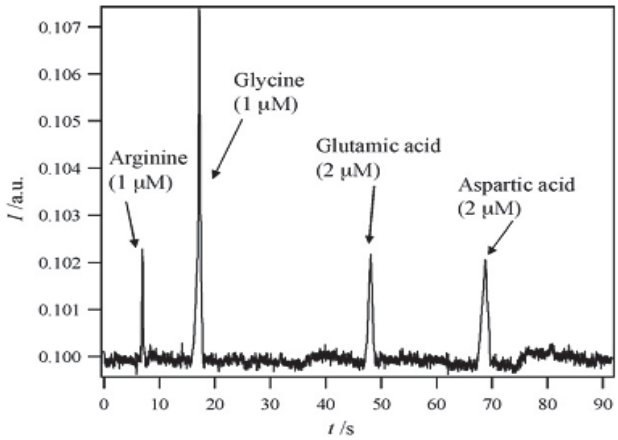


Figure I.18 : Electrophérogramme d'un mélange de 4 acides aminés dérivés par le naphthalène-2,3-dicarboxyaldéhyde (NDA) sur un microsystème en PDMS/verre [28]. Tampon borate de sodium 75 mM pH 9.2.

La CZE a aussi connu un développement considérable dans le domaine biologique et biomédical avec notamment les séparations électrophorétiques d'ADN [82]. L'inconvénient majeur est que l'électrophorèse de zone ne permet pas la séparation des solutés neutres. Ces espèces ont, en effet, une mobilité électrophorétique nulle et migrent toutes à la vitesse électroosmotique.

L'isotachophorèse (ITP) est également un moyen simple de séparer des solutés chargés en microsystème. Dans cette technique, le canal est rempli d'un électrolyte constitué d'un ion ayant une mobilité supérieure à celle de tous les ions à séparer (électrolyte leader). Les ions à séparer sont ensuite injectés dans le canal, puis l'extrémité du canal est remplie d'un électrolyte constitué d'un ion ayant une mobilité inférieure à celle de tous les ions à séparer (électrolyte terminal). Sous l'influence du champ électrique, tous les ions s'organisent progressivement en bandes adjacentes dans l'ordre de leur mobilité décroissante, entre l'électrolyte leader qui ne peut être dépassé et l'électrolyte terminal qui ne peut dépasser les ions à séparer. Après une période transitoire de séparation, un état stable est atteint dans lequel tous les ions, quelle que soit leur mobilité, migrent à une vitesse identique imposée par l'électrolyte leader. La concentration des ions est également imposée par la concentration de l'électrolyte leader et ceci indépendamment de leur concentration dans l'échantillon. L'ITP est donc un moyen de séparation et de préconcentration.

Les excellentes revues de Gebauer [83, 84] résument l'utilisation de la technique ITP en capillaire. Grâce à cette technique, Bodo *et al.* ont par exemple proposé une méthode simple de dosage de l'acide glutamique, l'acide benzoïque et les parabènes dans des aliments (viande, soupe, ketchup,

confiture..) [85]. Récemment, Vio *et al.* ont réalisé la séparation par ITP de 13 lanthanides en microsystème COC couplé à l'ICP/MS pour la détermination des rapports isotopiques des espèces (**Figure I.19**)[86].

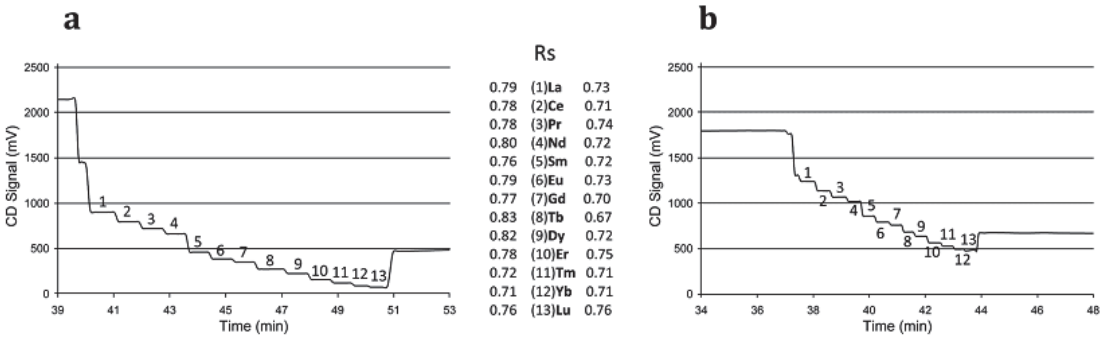


Figure I.19 : Séparation de 13 lanthanides par ITP (a) en capillaire et (b) en microsystème COC [86].

Pour permettre la séparation des solutés neutres et élargir la sélectivité de la CZE ou de l'ITP, il est nécessaire d'introduire un mécanisme de séparation de type chromatographique, faisant intervenir des interactions des espèces avec une phase stationnaire [87].

En chromatographie électrocinétique micellaire (MEKC), l'introduction d'un tensioactif dans le milieu séparatif permet la séparation de solutés de mobilités identiques grâce à leur distribution différente entre les micelles et le milieu aqueux. La séparation de 18 acides aminés dérivés par le naphtalène-2,3-dicarboxaldehyde (NDA) a par exemple été réalisée sur un microsystème en verre en présence de 30 mM de SDS (**Figure I.20**) [88].

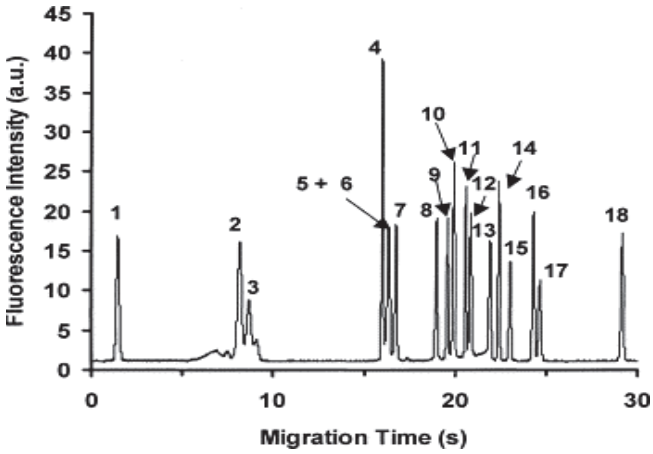


Figure I.20 : Séparation par MEKC de 18 AA dérivés par le naphthalène-2,3-dicarboxyaldéhyde (NDA) sur un microsystème en verre en présence de 30 mM de SDS [88]. leucine (1), arginine (2), dopamine (3), sérine (4), thréonine (5), asparagine (6), glutamine (7), glycine (8), citrulline (9), alanine (10), histidine (11), acidee β-aminobutyrique (12), taurine (13), acide γ-aminobutyrique (14), glutamate (15), valine (16), aspartate (17), isoleucine (18).

Sur un microsystème, la possibilité de coupler plusieurs étapes de séparation avec de faibles volumes morts et de faire des analyses rapides et efficaces, a permis d'implanter des analyses

multidimensionnelles alliant par exemple une séparation par MEKC et une séparation en CZE dans un canal verre de 1,3 cm de long (**Figure I.21**) [89].

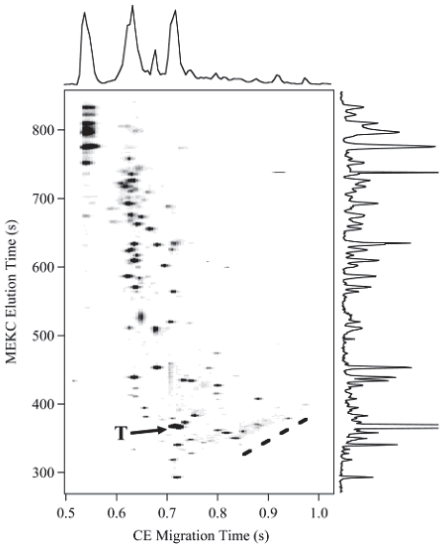


Figure I.21 : Analyse bidimensionnelle d'un digestat de sérum bovin par de la trypsine d'albumine [89].

Cependant, en MEKC, la force ionique des électrolytes utilisés est très élevée, ce qui génère de l'effet Joule difficile à dissiper en microsystème. Cela perturbe la formation de la pseudo-phase stationnaire et la distribution des solutés entre la pseudo-phase stationnaire (les micelles) et le milieu. Par conséquent, la reproductibilité des analyses est difficile à assurer, ce qui limite l'utilisation de la MEKC en microsystème.

Pour palier à cet inconvénient tout en gardant les avantages de la MEKC (possibilité de séparer des solutés neutres et élargissement de la sélectivité pour les solutés chargés), il est intéressant de mettre en œuvre l'électrochromatographie (EC) qui utilise une vraie phase stationnaire de chromatographie en phase liquide, préalablement introduite dans le canal de séparation.

I.2. Description théorique de l'électrochromatographie

L'électrochromatographie (EC) a été mise en œuvre pour la première fois en capillaire dans les années 80 par Jorgenson *et al.* [90], puis par Knox [91], mais son développement réel date du début des années 90. La séparation électrochromatographique résulte de trois phénomènes qui sont la migration électroosmotique de la phase mobile, la migration électrophorétique des solutés et la distribution des solutés entre la phase mobile et la phase stationnaire.

I.2.1. Flux électroosmotique

Lorsqu'une surface (canal ou particules de phase stationnaire) présentant des charges fixes (par exemple négatives) est mise en contact avec un électrolyte, des charges de signe opposé (positives)

s'accumulent au voisinage de l'interface liquide-solide et forment une double couche (**Figure I.22**). Celle-ci se décompose en une première couche de cations, dite compacte, car ces derniers sont complètement adsorbés le long de la paroi chargée négativement (couche de Stern). La deuxième couche dite diffuse se compose essentiellement de cations mobiles (couche de Gouy- Chapman) [92, 93]. Cette formation de deux régions de charges opposées est décrite par le modèle de double couche électrique. Cette double couche peut être assimilée à deux condensateurs de capacités C_1 et C_2 dans lesquels le potentiel décroit linéairement.

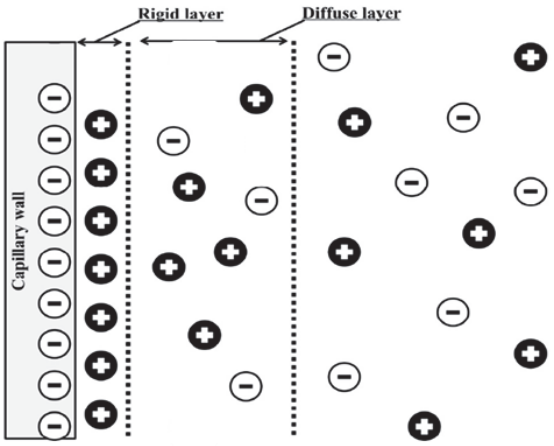


Figure I.22 : Représentation de la formation de la double couche électrique à proximité de la paroi de capillaire selon le modèle de Stern [94].

Cette accumulation de charge est caractérisée par un potentiel de surface ou potentiel *zéta* (ζ) correspondant au potentiel appliqué à la couche diffuse [95-98] :

$$\xi = \frac{\delta.\sigma}{\varepsilon_r} \quad \textbf{(I.2)}$$

où δ est l'épaisseur de la double couche, σ est la densité de charges par unité de surface et ε_r est la constante diélectrique du milieu.

Cette double couche possède une épaisseur δ de 1 à 10 nm exprimée par :

$$\delta = \left(\frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r \mathrm{RT}}{2\Upsilon F^2}\right)^{1/2} \quad \textbf{(I.3)}$$

ε_0 est la permittivité du vide, R la constante des gaz parfait, F est la constante de Faraday, T est la température et Υ est la force ionique de la solution. Plus la force ionique est élevée, plus la portée des interactions est courte.

Lors de l'application d'un champ électrique tangentiel à la surface, les charges excédentaires de la couche diffuse migrent en direction de l'électrode de signe opposé (la cathode) entraînant avec elles l'ensemble des molécules de solvant et créant ainsi un écoulement de toutes les espèces présentes dans le canal [6, 7, 97]. Ce flux électroosmotique (FEO) est caractérisé par sa vitesse linéaire v_{eo}, donnée par la relation de Helmotz-Smoluchowski [99] :

$$v_{eo} = \frac{\mathrm{L_{eff}}}{\mathrm{t_o}} = \mu_{eo} E \quad \textbf{(I.4)}$$

et $\mu_{eo} = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r \xi}{\eta}$ **(I.5)**

μ_{eo} représente la mobilité électroosmotique, L_{eff} est la longueur du canal, t_o est le temps mort et η est la viscosité de l'électrolyte.

La mobilité électroosmotique μ_{eo} dépend notamment de paramètres expérimentaux tels que le pH et la force ionique de l'électrolyte. Ces paramètres influencent non seulement le taux d'ionisation des groupements silanols, donc la densité de charge surfacique, mais aussi l'épaisseur de la double couche. D'autre part, la présence de solvant organique dans l'électrolyte modifie aussi le flux électroosmotique en raison de son influence sur le potentiel zêta, sur la viscosité et sur la constante diélectrique du milieu.

Le flux électroosmotique présente l'avantage de générer un profil d'écoulement plat, contrairement au profil parabolique du flux hydrodynamique rencontré en chromatographie en phase liquide (**Figure I.23**). Dans le cas de l'écoulement électroosmotique, la vitesse est uniforme tant que le diamètre de passage de la phase mobile entre les grains de phase stationnaire reste largement supérieur à l'épaisseur de la double couche.

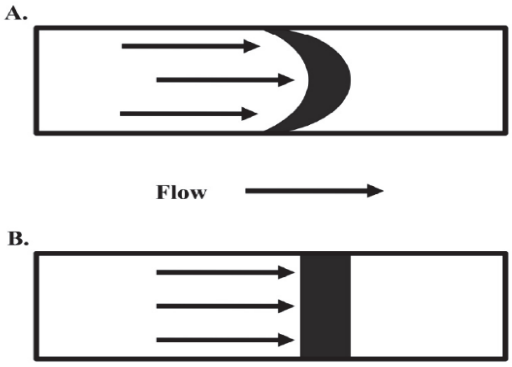


Figure I.23 : Profils d'écoulement dans une colonne de séparation. (A) : sous pression, (B) sous champ électrique [100].

Le flux électroosmotique permet donc de réduire la dispersion liée à l'anisotropie de l'écoulement habituellement observée en chromatographie liquide [101, 102].

I.2.2. Electromigration

Comme en électrophorèse de zone, les solutés chargés soumis à un champ électrique E ont une vitesse électrophorétique :

$$v_{ep,i} = \mu_{ep,i} E \quad \textbf{(I.6)}$$

où μ_{epi} est la mobilité électrophorétique effective du composé i qui lui est propre dans un milieu donné. μ_{epi} est fonction de sa charge électrique et de sa taille. Un ion est donc d'autant plus mobile que sa charge est élevée et que sa taille (ou son rayon ionique hydraté) est faible. μ_{epi} dépend

principalement du pH et de la force ionique du tampon, de l'ajout d'une espèce complexante au tampon et, enfin, de la viscosité du milieu.

L'électromigration s'effectue dans le sens du champ électrique pour les cations (mobilité électrophorétique positive) et dans le sens opposé pour les anions (mobilité électrophorétique négative).

I.2.3. Rétention chromatographique

La rétention d'un composé est caractérisée par son facteur de rétention k_i qui est égal au rapport des quantités de soluté présentes à chaque instant dans la phase stationnaire et dans la phase mobile :

$$k_i = \frac{Q_s}{Q_m} \quad \textbf{(I.7)}$$

avec Q_s la quantité de soluté en phase stationnaire et Q_m la quantité de soluté en phase mobile.

En considérant que, lorsque le soluté est en phase stationnaire, sa vitesse de migration est nulle, la vitesse de migration moyenne du soluté s'écrit :

$$v_{app,i} = (v_{eo} + v_{ep,i})\left(\frac{Q_m}{Q_m+Q_s}\right) \quad \textbf{(I.8)}$$

$v_{eo} + v_{ep,i}$ représente la vitesse du soluté en phase mobile et $Q_m/(Q_m + Q_s)$ représente la proportion de soluté en phase mobile. Compte tenu des équations **I.6**, **I.7** et **I.8**, la vitesse apparente du soluté devient :

$$v_{app,i} = \frac{\mu_{eo} + \mu_{ep,i}}{1+k_i} \mathrm{E} \quad \textbf{(I.9)}$$

d'où l'expression du temps de migration du soluté en électrochromatographie :

$$t_{m,i} = \frac{L}{v_{app,i}} = \frac{L}{E}\frac{1+k_i}{\mu_{eo} + \mu_{ep,i}} \quad \textbf{(I.10)}$$

Dans le cas d'un soluté neutre ($\mu_{eo} = 0$), le facteur de rétention k_i peut être calculé à partir de l'équation **I.10** :

$$k_i = \frac{t_{m,i}-t_o}{t_o} \quad \textbf{(I.11)}$$

où $t_{m,i}$ est le temps de migration du soluté et t_o est le temps d'élution d'un composé neutre non retenu ($t_o = \frac{L}{E\mu_{eo}}$).

La sélectivité α qui traduit l'aptitude de la phase stationnaire à séparer deux solutés, est définie par :

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad \textbf{(I.12)}$$

k_2 est le facteur de rétention du soluté le plus retenu et k_1 est le facteur de rétention du pic le moins retenu.

I.2.4. Nombre de plateaux théoriques

Les constituants d'un mélange présentant des caractéristiques de distribution différentes progressent dans la colonne à des vitesses différentes et sont élués et détectés à des temps de migration $t_{m,i}$ différents. Les solutés subissent également un phénomène de dispersion qui se traduit par un élargissement de la zone d'échantillon. Le pic chromatographique qui en résulte représente la distribution statistique (gaussienne) des temps de transit des molécules de soluté à travers le système. Cette dispersion peut être préjudiciable à la qualité de la séparation [98].

Le nombre de plateaux théoriques observé N_{obs} permet d'évaluer l'élargissement des pics. Il est défini par :

$$N_{obs} = \frac{{t_{m,i}}^2}{{\sigma^2}_{tot}} \quad \textbf{(I.13)}$$

où ${\sigma^2}_{tot}$ est la somme des contributions de la dispersion induite par le processus de séparation σ^2_{sep} et de la dispersion générée par les effets externes σ^2_{ext} :

$$\sigma^2_{tot} = \sigma^2_{sep} + \sigma^2_{ext} \quad \textbf{(I.14)}$$

La relation **I.13** permet de calculer N_{obs} directement à partir du chromatogramme où σ_{tot} est l'écart-type du pic ou sa demi-largeur aux 3/5ème de sa hauteur.

Les phénomènes dits externes susceptibles de générer de la dispersion lors des séparations sont exprimés par la relation suivante:

$$\sigma^2_{ext} = \sigma^2_{joule} + \sigma^2_{électrodispersion} + \sigma^2_{adsorption} + \sigma^2_{injection} + \sigma^2_{détection} \quad \textbf{(I.15)}$$

Les sources éventuelles de la dispersion externe sont par conséquent :

- ✓ l'effet Joule : si le système ne permet pas de dissiper convenablement la puissance dissipée par effet Joule, il en résulte un gradient radial de température à l'intérieur de la colonne qui modifie les caractéristiques du profil d'écoulement du liquide.
- ✓ l'électrodispersion : ce phénomène résulte de la dispersion par électromigration pouvant se produire dans le créneau d'échantillon si sa composition diffère de celle de l'électrolyte de migration.
- ✓ l'adsorption : l'interaction des solutés avec la paroi du capillaire ou du canal est une source de dispersion dont il est possible de limiter les effets par des rinçages fréquents et adaptés.
- ✓ l'injection : la réduction de la longueur du créneau injecté et de sa proportion par rapport à la longueur du capillaire permet de réduire la dispersion liée à l'injection.
- ✓ la détection : cette dispersion dépend du détecteur utilisé. Celle-ci est en général correctement paramétrée dans les appareils commerciaux.

Dans les conditions optimales où les phénomènes de dispersion externes sont négligeables, seule la diffusion induite par le processus de séparation est responsable de la dispersion.

$$\sigma^2_{tot} = \sigma^2_{sep} \quad \textbf{(I.16)}$$

En regroupant les équations **I.13** et **I.14**, N_{obs} devient :

$$N_{obs} = \frac{{t_{m,i}}^2}{{\sigma^2}_{sep}\left(1+\frac{{\sigma^2}_{ext}}{{\sigma^2}_{sep}}\right)} = \frac{N_{sep}}{1+\frac{{\sigma^2}_{ext}}{{\sigma^2}_{sep}}} \quad \textbf{(I.17)}$$

N_{sep} étant le nombre de plateaux théoriques intrinsèque de la colonne qui est fonction de la longueur de la colonne L et de la hauteur équivalente à un plateau théorique H :

$$N_{sep} = \frac{{t_{m,i}}^2}{{\sigma^2}_{sep}} = \frac{L}{H} \quad \textbf{(I.18)}$$

Plus la colonne est longue et/ou plus la hauteur de plateau H est faible, plus la colonne est efficace.

Afin d'obtenir des efficacités importantes lors des analyses après réduction de la dispersion externe, il faut optimiser les conditions expérimentales afin d'obtenir une hauteur de plateau H minimale. Il existe plusieurs équations permettant de modéliser la hauteur de plateau H en fonction de la vitesse en phase mobile $\bar{u}$. Pour des colonnes monolithiques, c'est l'équation de Van Deemter qui est la plus utilisée [97, 98] :

$$H = A + \frac{B}{\bar{u}} + C.\bar{u} \quad \textbf{(I.19)} \text{ avec } \bar{u} = v_{ep,i} + v_{eo}$$

La courbe correspondante est une branche d'hyperbole qui passe par un minimum définissant une vitesse optimale (**Figure I.24**).

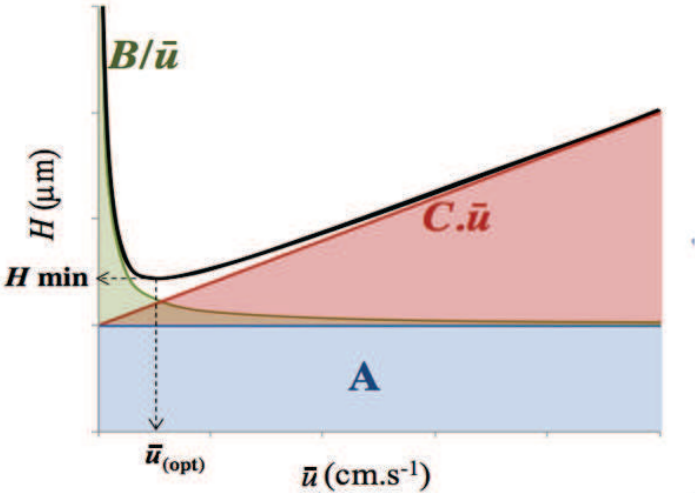


Figure I.24 : Courbe de Van Deemter

Les trois coefficients numériques expérimentaux A, B et C correspondent aux trois principaux phénomènes intervenant lors de l'avancement de la bande de soluté dans la colonne :

- **A - terme de remplissage :** Ce terme représente l'anisotropie d'écoulement ou le facteur de diffusion d'Eddy qui est lié au profil d'écoulement de la phase mobile à travers la phase stationnaire, souvent associée à la présence de chemins préférentiels. Ce terme dépend ainsi de l'homogénéité de la structure de la phase stationnaire ainsi que du type de flux généré (hydrodynamique ou électrocinétique). Il est égal à :

$$A = 2\chi d_p \quad \textbf{(I.20)}$$

où χ est le paramètre qui tient compte des irrégularités du remplissage de la colonne et d_p est le diamètre des particules constituant la phase stationnaire. Ainsi, plus le diamètre des particules est petit et de taille homogène, plus le terme A est petit.

- ✓ $\mathbf{B}/\overline{\boldsymbol{u}}$ **- terme de diffusion :** Il traduit la tendance naturelle des molécules de solutés à se disperser quand il existe un gradient de concentration. Le phénomène de diffusion est prédominant à des vitesses de phases mobiles faibles. L'influence de ce phénomène sur la hauteur d'un plateau est représentée par la relation :

$$B = 2\gamma D_M \quad \textbf{(I.21)}$$

avec γ est le facteur de tortuosité ou d'obstruction tenant compte de la sinuosité du parcours du fluide et D_M est le coefficient de diffusion moléculaire du soluté dans la phase mobile.

- ✓ $\boldsymbol{C}.\overline{\boldsymbol{u}}$ **- terme de résistance au transfert de masse :** Il traduit la difficulté des solutés à se répartir à l'équilibre entre les deux phases lorsque le déplacement de la phase mobile devient trop rapide. Ce terme augmente donc avec la vitesse de la phase mobile. La constante C est donnée par :

$$C = \frac{k_i {d_p}^2}{30(1+k_i)^2 D_p} \quad \textbf{(I.22)}$$

où D_p est le coefficient de diffusion intra-particulaire (phase stagnante).

Il est évident que la structure de la phase stationnaire va jouer un rôle primordial dans l'obtention d'une colonne efficace, par la réduction des termes A (diamètre des particules), B (tortuosité) et C (volume de phase stagnante).

I.2.5. Préconcentration des échantillons en électrochromatographie

La préconcentration consiste à augmenter le volume d'échantillon injecté, donc la quantité injectée et par suite la hauteur du pic, tout en minimisant la dispersion des solutés.

En électrochromatographie, plusieurs phénomènes de préconcentration sont possibles :

origine chromatographique : la force éluante du solvant de solubilisation de l'échantillon est beaucoup plus faible que la force éluante de la phase mobile d'élution. Durant l'étape A (**Figure I.25**), le volume injecté contient le soluté d'intérêt solubilisé dans un solvant (matrice d'injection) qui peut avoir une force éluante différente de celle de la phase mobile. D'après la théorie de l'électrochromatographie, la vitesse linéaire du soluté est donnée par la relation :

$${v_{app,i}}^* = \frac{v_{eo}+v_{ep,i}}{1+{k_i}^*} \quad \textbf{(I.23)}$$

où k^* est le facteur de rétention du soluté à son entrée sur la colonne, c'est-à-dire lorsque la matrice d'injection lui sert de phase éluante.

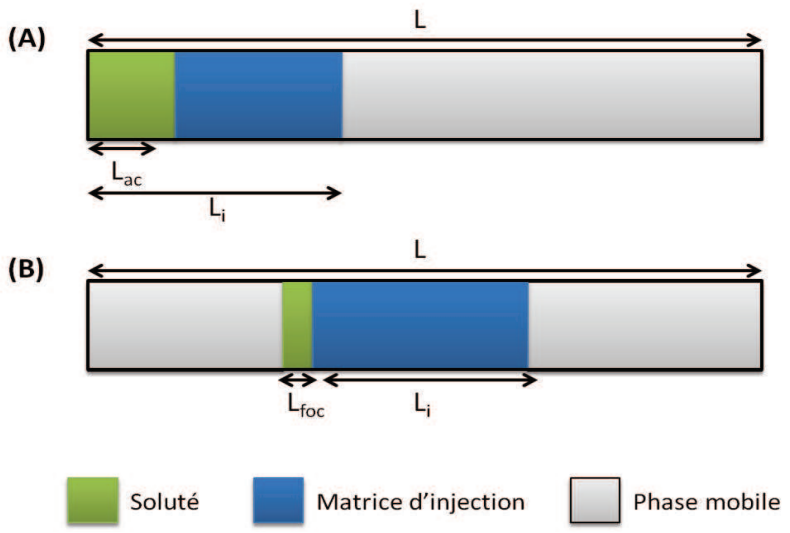


Figure I.25 : Processus de préconcentration d'origine chromatographique : (A) accumulation du soluté en tête de colonne pendant l'étape d'analyse frontale. (B) focalisation de la bande de soluté pendant l'étape d'élution par "step gradient". L = longueur de la colonne. L_{ac} = longueur de la bande de soluté après accumulation en tête de colonne. L_i = longueur occupée par la matrice d'injection. L_{foc} = longueur de la bande de soluté après focalisation.

Lorsque la valeur de k^* est élevée, le soluté progresse beaucoup moins vite que la phase mobile et les molécules de soluté s'accumulent en tête de colonne dans une zone relativement étroite de largeur L_{ac} :

$$L_{ac} = \frac{L_i}{(1+k_i^*)} \quad \textbf{(I.24)}$$

Dans cette expression, L_i représente la longueur occupée par le volume injecté de matrice d'injection. L'équation **I.24** montre que le phénomène d'accumulation du soluté en tête de colonne est d'autant plus important que la rétention du soluté avec la matrice d'injection est grande.

Après cette étape d'accumulation, les molécules de soluté sont poussées par la phase mobile qui possède une force éluante bien plus élevée que la matrice d'injection (étape B). Dans ces conditions, la vitesse de migration de l'arrière de la bande de soluté est toujours supérieure à celle de l'avant de la bande, si bien que la zone de soluté subit une focalisation due au changement de phase éluante ("step gradient"). Comme la longueur de la bande de soluté après accumulation, L_{ac}, la longueur de la bande de soluté après focalisation, L_{foc}, dépend aussi étroitement des forces éluantes de la matrice d'injection et de la phase mobile et du volume injecté.

- ✓ **origine électrocinétique** : la conductivité du solvant de solubilisation de l'échantillon est beaucoup plus faible que celle de la phase mobile d'élution. La préconcentration par amplification du champ électrique (FASI) [103, 104] consiste à introduire l'échantillon par injection électrocinétique dans un micro-canal rempli d'un électrolyte de séparation de plus forte

conductivité que l'échantillon. Le champ électrique régnant dans une zone étant inversement proportionnel à sa conductivité, les analytes migrent donc rapidement dans la zone échantillon de haut champ électrique et sont ensuite fortement ralentis lorsqu'ils pénètrent dans l'électrolyte de séparation où règne un champ électrique plus faible. A la fin du processus FASI, les analytes sont concentrés dans une zone étroite à la frontière entre la zone injectée et l'électrolyte.

Cette technique est très utilisée en microsystème pour les séparations par électrophorèse comme en atteste l'excellente revue de Giordano [105], permettant ainsi d'augmenter la hauteur des pics (**Figure I.26**).

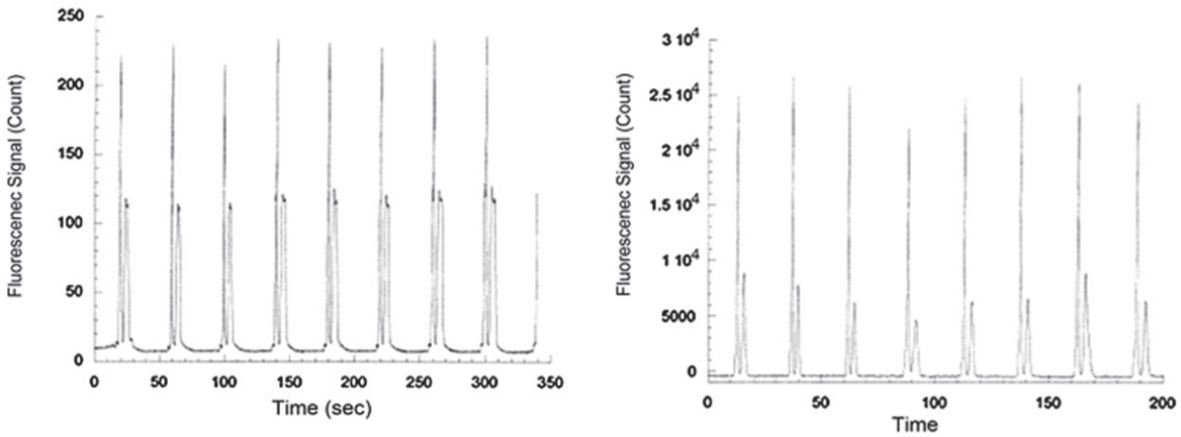


Figure I.26 : séparation de deux colorants par électrophorèse dans un microsystème verre. (A) injection classique et (B) injection avec préconcentration à l'aide de la technique FASI [106].

En électrochromatographie, différents cas de figure apparaissent suivant la nature des solutés :

- ✓ solutés neutres : préconcentration chromatographique (phases inverses) [19, 107-110].
- ✓ solutés chargés : préconcentration chromatographiques (échanges d'ions) + préconcentration électrocinétique (FASI). Proczek *et al.* ont montré que l'origine chromatographique était prépondérante dans le cas de la préconcentration de composés chargés ($Ru(bipy)_3^{2+}$) sur un monolithe HA/BDDA dans un microsystème en verre [20]. La préconcentration chromatographique est estimée être 60 fois plus importante que la préconcentration électrocinétique.

L'influence de la longueur de la zone injectée a été évaluée en microsystème avec différentes phases stationnaires (ODS, monolithe organique) et sur des composés très divers [20, 108-115]. Au-delà d'un certain volume injecté (temps d'injection élevé) dépendant du composé étudié, l'élargissement des pics devient trop important, il n'y a plus de phénomène d'enrichissement. Cela se traduit par une hauteur de pic qui n'augmente plus avec le temps d'injection (**Figure I.27**) [19, 20, 107]. La sensibilité maximale est atteinte lorsque la hauteur du pic n'augmente plus proportionnellement au temps d'injection.

L'évaluation de l'importance du phénomène de préconcentration se résume par le facteur d'enrichissement en signal (FES) qui est défini par le rapport entre le signal h obtenu après préconcentration et le signal h_o obtenu en injection classique (injection de quelques secondes) :

$$FES = \frac{h}{h_0} \quad \textbf{(I.25)}$$

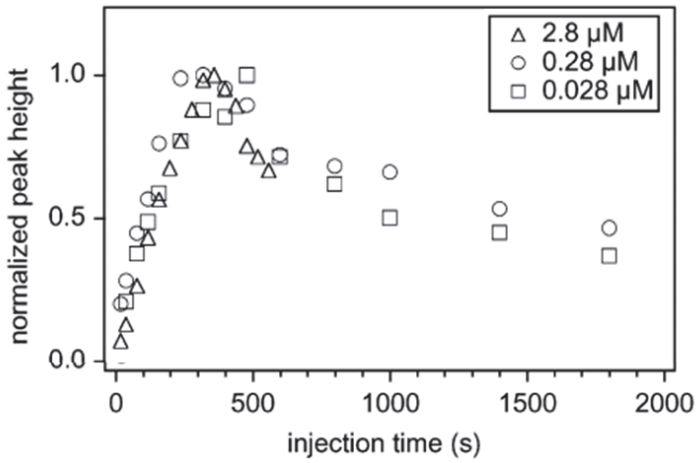


Figure I.27 : Variation de la hauteur du pic du pyrène à différentes concentrations en fonction du temps d'injection. Résultats obtenus dans une puce en verre remplie de particules C18 [107].

Proczek *et al.* ont obtenu un facteur d'enrichissement de 120 sur un mélange de HAP dans un microsystème en verre rempli de phase stationnaire monolithique organique [20] (**Figure I.28**). Cependant, cette étape de préconcentration a rarement été utilisée en microsystème dont les microcanaux sont entièrement remplis de phase stationnaire.

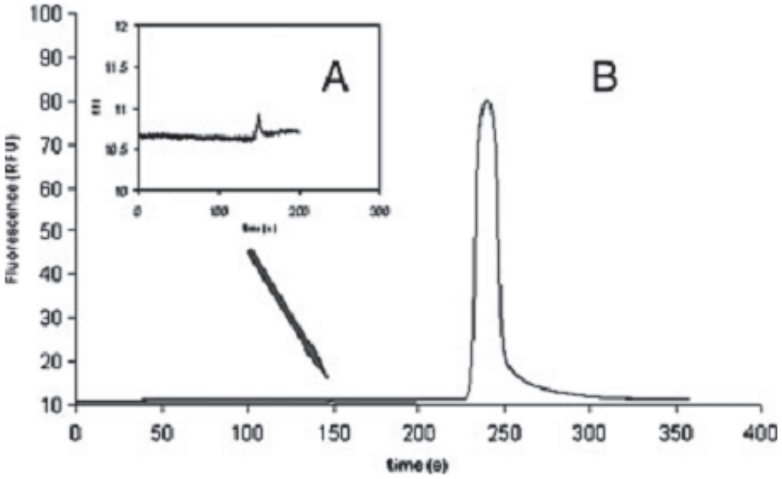


Figure I.28 : Electrochromatogrammes du fluoranthène dilué dans une phase peu éluante eau/MeCN 75/25 (v/v) à 0.083 mg/mL (A) injecté sans préconcentration (injection de 2 s), (B) préconcentré pendant 120 s. Elution sous un champ électrique de 294 V/cm [20].

I.2.6. Modes d'injection en microsystème

L'injection électrocinétique est traditionnellement utilisée en microsystème pour injecter l'échantillon dans le canal de séparation [116]. On distingue différents modes d'injection électrocinétique utilisés en microsystème dont la plupart ont été étudiés et modélisés par Blas [117, 118]. L'injection pincée est le mode le plus utilisé. Ce type d'injection est un mode complexe nécessitant un programme de tension, 4 électrodes et une géométrie de microsystème adaptée. En effet, ce mode d'injection est réalisé au niveau de la zone d'intersection de deux canaux orthogonaux et est contrôlé par l'application de potentiels au niveau des 4 réservoirs (2 réservoirs de phase mobile (PM), 1 réservoir d'échantillon (S) et un réservoir étant la poubelle (P)) (**Figure I.29**). Cette intersection peut être en forme de croix ou de double-T, permettant d'injecter des volumes plus conséquents. L'injection pincée est composée de deux ou trois étapes [5, 80] :

- ✓ étape de pincement (étape 1) : l'échantillon situé en S est amené au niveau de l'intersection par application d'une différence de potentiel entre S et P. Un pincement est réalisé en même temps au niveau de la croix pour éviter toute diffusion de l'échantillon dans le canal de séparation en appliquant une tension sur les deux réservoirs PM. Cette tension doit être plus importante que celle générée au niveau de l'intersection des deux canaux.

- ✓ étape de séparation (étape 2) : L'échantillon est ensuite élué dans le canal de séparation en appliquant une différence de potentiel entre les réservoirs PM. Un retrait d'échantillon (contre-flux) peut également être appliqué pour éviter toute diffusion dans le canal de séparation en appliquant une différence de potentiel entre PM et S ainsi que PM et P.

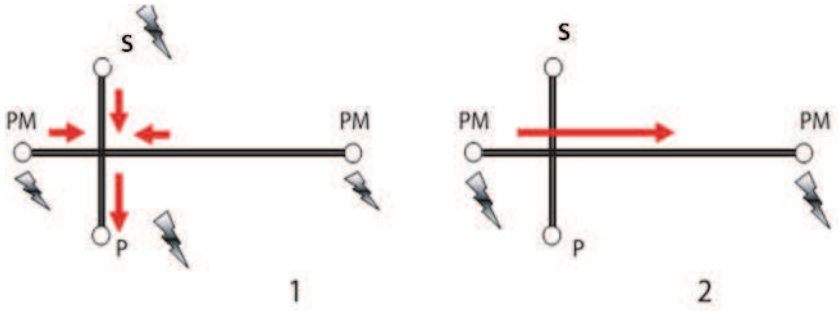


Figure I.29 : Représentation schématique d'une injection dynamique en microsystème. (1) Etape de pincement. (2) Etape de séparation (S : Echantillon, PM : phase mobile, P : poubelle) [5].

Une étape d'expansion peut être appliquée entre les étapes d'injection et de séparation afin d'augmenter le volume d'échantillon. Pour cette étape, il est nécessaire de contrôler les potentiels appliqués au niveau de chaque réservoir pour éviter toute diffusion de l'échantillon dans le canal de séparation.

I.3. Etat de l'art sur les phases stationnaires en microsystème

L'électrochromatographie en microsystème requiert l'introduction d'une phase stationnaire dans des canaux de section micrométrique. Plusieurs méthodes ont été développées depuis le début des années 1990 :

- fonctionnalisation des canaux
- structures COMOSS
- phases stationnaires particulaires
- phases stationnaires monolithiques.

I.3.1. Fonctionnalisation des canaux

La fonctionnalisation des canaux a été la première voie envisagée pour introduire une phase stationnaire en microsystème. Les parois du canal de séparation sont recouvertes d'une fine couche de phase stationnaire d'épaisseur micrométrique voire nanométrique pour donner la capacité de rétention désirée. La principale raison de ce choix était de contourner la difficulté d'immobilisation des phases particulaires, classiquement utilisées pour le remplissage des colonnes HPLC en format miniaturisé avant l'arrivée des phases monolithiques. Les avantages de ce type de microsystème sont la facilité de la préparation de la phase stationnaire et la faible pression nécessaire pour la mise en mouvement du liquide dans les microcanaux fonctionnalisés.

Jacobson a ainsi fonctionnalisé les parois d'un canal en verre par réaction avec un octadécylsilane (C_{18}) à une température de 150°C [119]. Les performances de ce microsystème séparatif étaient satisfaisantes puisque la séparation de trois coumarines neutres dans un canal de 58 mm de long a été obtenue avec une efficacité de 200 000 plateaux/mètre (**Figure I.30**).

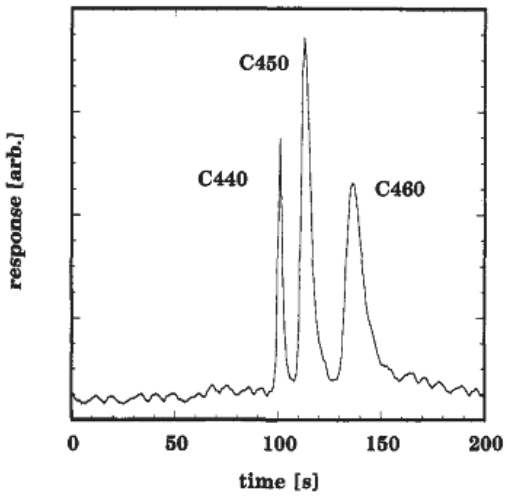


Figure I.30 : Séparation de trois coumarines dans un canal en verre fonctionnalisé C_{18} [119].

Pour illustrer l'intérêt de la fonctionnalisation des parois d'un microcanal, Soper *et al.* ont réalisé la séparation de 6 fragments d'ADN dans deux puces en PMMA, l'une non fonctionnalisée, l'autre fonctionnalisée C_{18} (**Figure I.31**) [120]. Ils ont ainsi pu montrer que la fonctionnalisation des parois du PMMA par des chaines C18 permettait la séparation de 6 fragments d'ADN en 130 s contrairement à la puce non fonctionnalisée où aucune séparation n'est observée.

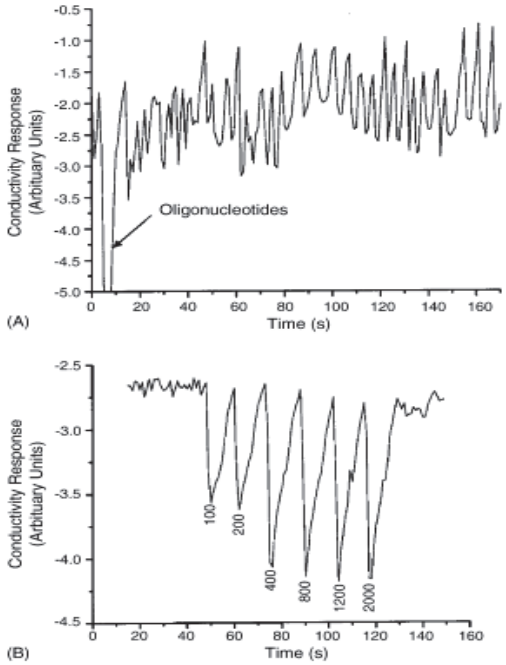


Figure I.31 : Séparation de 6 fragments d'ADN (A) sur une puce PMMA non fonctionnalisée et (B) sur une puce PMMA fonctionnalisée avec des groupements C_{18} [120].

Pumera *et al.* ont utilisé des nanoparticules d'or pour fonctionnaliser les canaux en verre afin d'apporter des interactions entre les solutés et la phase stationnaire [121]. La résolution ainsi que les efficacités ont été doublées en présence de ces nanoparticules d'or par rapport à une puce verre non traitée. La même étude a été réalisée par Lin dans un microsystème PMMA et a donné les mêmes résultats [122]. Cependant, bien que la fonctionnalisation des parois soit simple à mettre en œuvre en microsystème, seulement 12 publications entre 1994 et 2005 ont été réalisées comme l'ont remarqué Pumera [123] et Faure [25] dans leurs revues. Ceci est principalement dû à la faible capacité de rétention de ce type de phase stationnaire, qui ne permet pas d'envisager l'utilisation de ce type de microsystème pour l'analyse d'échantillons complexes.

Depuis 2005, la fonctionnalisation des canaux a été principalement utilisée pour éviter l'adsorption, notamment des protéines sur les substrats polymériques hydrophobes [23]. Ces aspects sont exposés dans la partie I.5.

I.3.2. Structures COMOSS

Pour palier à la faible capacité de rétention observée avec des canaux à paroi fonctionnalisée, les microstructures **CO**llocated **MO**nolith **S**upport **S**tructure appelées classiquement COMOSS ont été développées à la fin des années 1990. Les premières structures COMOSS ont été réalisées par Régnier *et al.* dans des microsystèmes en quartz dans lesquelles les techniques de microfabrication étaient maitrisées [124] (**Figure I.32**).

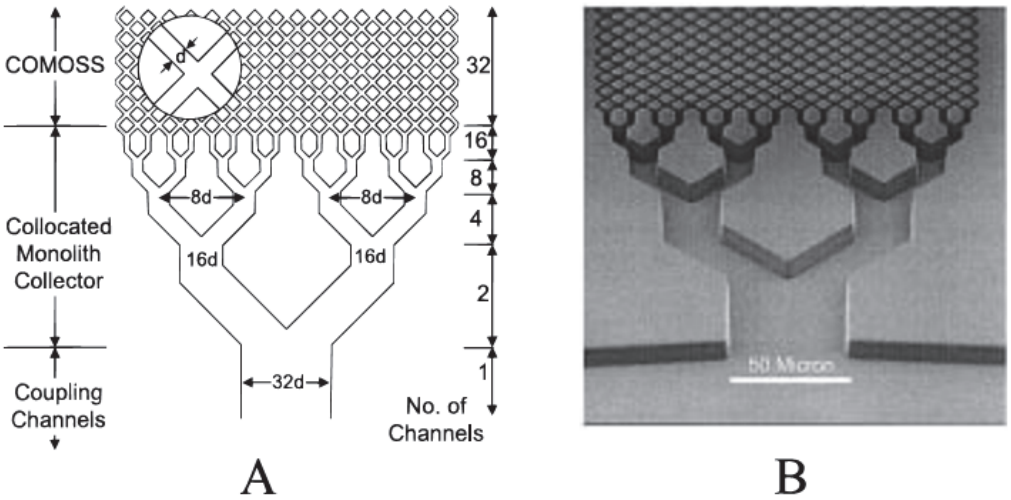


Figure I.32 : Vue générale d'une structure COMOSS fabriquée dans du quartz.
(A) Schéma. (B) Image MEB [125, 126].

Ces phases stationnaires ont l'allure d'un ensemble de plots ordonnés de façon étroite (**Figure I.33**). La taille et la distribution des plots et des canaux les séparant peuvent être choisies et modulées [127]. Typiquement, ces microstructures, fabriquées dans le canal de séparation, présentent des micro-plots de 5 à 10 µm d'arête et une hauteur de 9 à 10 µm sur une longueur totale de 39 à 45 mm.

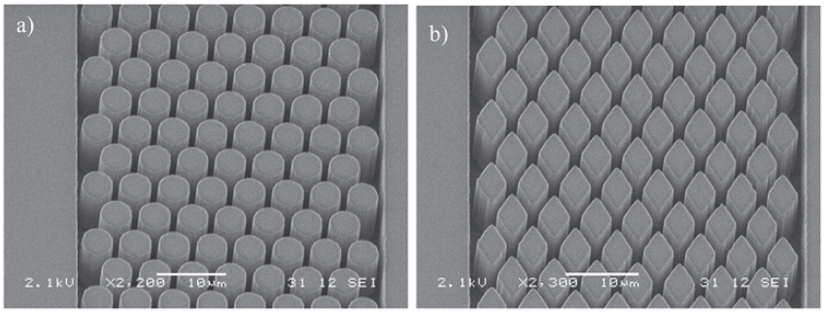


Figure I.33 : Image MEB d'un microsystème COMOSS avec des plots (a) cylindriques et (b) triangulaires [127].

La fonctionnalisation de ces microstructures permet d'accroître le volume de la phase stationnaire par rapport à celui de la phase mobile et donc d'améliorer la capacité de rétention. Régnier *et al.* ont ainsi fonctionnalisé les plots en quartz par du (3-aminopropyl)-triéthoxysilane pour permettre la séparation de la rhodamine 123 par électrochromatographie (**Figure I.34**) [128].

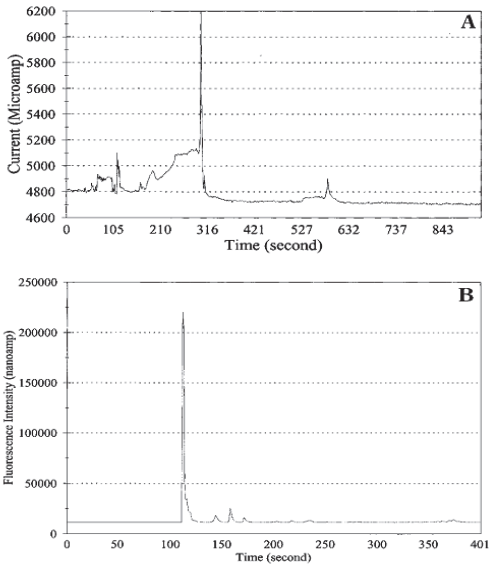


Figure I.34 : Séparation de la rhodamine 123 par électrochromatographie dans un microsystème COMOSS en quartz (A) non fonctionnalisé et (B) fonctionnalisé par du (3-aminopropyl)-triéthoxysilane [128].

Un des inconvénients de cette technologie est le coût très élevé de leur fabrication. Les matériaux polymériques moins chers ont donc progressivement remplacé le quartz. Ainsi, la fonctionnalisation des parois du PDMS par des groupements octadécyles et par l'acide 2-acrylamido-2-méthylpropanesulfonique a permis l'analyse d'un mélange de peptides en moins de 5 minutes par électrochromatographie avec des efficacités atteignant 600 000 plateaux/m [126]. Enfin, les derniers microsystèmes COMOSS ont été fabriqués en utilisant le COC qui présente de nombreux avantages énoncés précédemment [18]. Le caractère hydrophobe du COC natif permet d'envisager la séparation des solutés par chromatographie à polarités des phases inversées. Ainsi, Gustafsson a réalisé la séparation de trois amines dérivées suivant leur hydrophobicité (**Figure I.35**) [22]. Des hauteurs équivalentes à un plateau théoriques de 3,4 µm et 22 µm ont été obtenues respectivement pour l'Atto-532-hexylamine et l'Atto-532-octylamine.

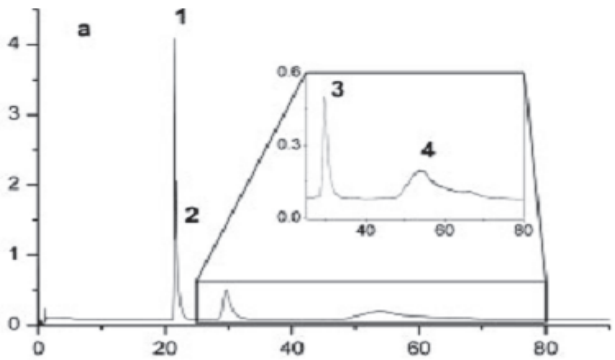


Figure I.35 : Séparation électrochromatographique de (1) Atto-532 non dérivé, (2) Atto-532-ethanolamine (1.2 mM), (3) Atto-532-hexyl-amine (2.5 mM), (4) Atto-532-octylamine (3 mM). Phase mobile : tampon tétraborate 10 mM à pH 9.2 contenant 20% ACN. Excitation à 532 nm et détection à 568 nm. Longueur de séparation : 11 mm. E = 172 V/cm [22].

Illa *et al.* ont travaillé récemment sur l'optimisation de la géométrie des COMOSS en COC afin de minimiser la dispersion des solutés [129]. Ils ont remarqué que les plots en forme de diamants permettaient d'obtenir de meilleures performances que les plots cylindriques.

Les COMOSS présentent une surface spécifique 2 à 3 fois supérieure à celle des microsystèmes dont les parois sont recouvertes de phase stationnaire. La croissance de nanotubes de carbone à la surface des microstructures COMOSS en silicium a été une des solutions envisagées [130, 131] pour encore accroître la capacité de rétention par rapport aux plots fonctionnalisés C18 (**Figure I.36**). La bande de soluté est aussi moins sujette à l'élargissement dans les nanotubes de carbone que dans un canal vide. Il a été suggéré par les auteurs que le flux électroosmotique laminaire généré par les nanotubes était moins sensible aux perturbations dispersives. L'efficacité d'une telle phase stationnaire peut atteindre jusqu'à 380000 plateaux/mètre.

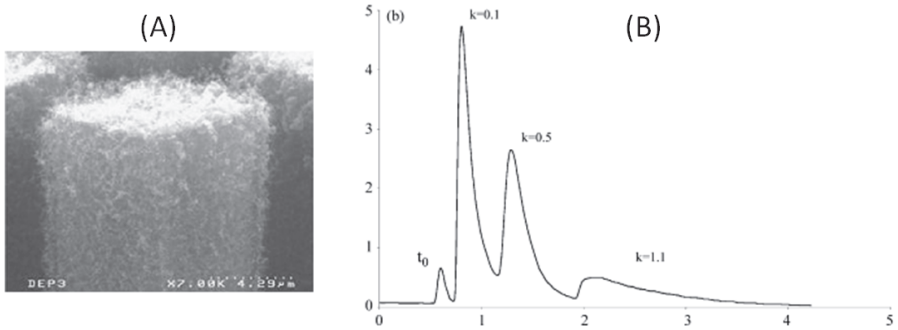


Figure I.36 : (A) Image MEB d'un plot en silicium recouvert de nanotubes de carbone. (B) Séparation chromatographique de 4 solutés dans une puce COMOSS fonctionnalisée avec des nanotubes de carbone. Solutés par ordre d'élution : uracil, phénol, N,N-diethyl-m-toluamide, toluène. Phase mobile : eau/acétonitrile 80/20. Débit : 700 nL/min [128].

Néanmoins, les performances rétentives de ce type de phase stationnaire sont nettement moins élevées que celles obtenues avec les phases particulaires. De plus, la fabrication de ce type de microsystème reste très complexe et chère.

I.3.3. Phases stationnaires particulaires

Pendant de longues années, les chercheurs ainsi que les industriels ont orienté leurs développements vers l'introduction dans des microcanaux de phases stationnaires particulaires de silice greffée. Ces phases stationnaires, de grandes surfaces spécifiques, sont classiquement utilisées pour le remplissage des colonnes HPLC. Une large gamme de phases est disponible. Leur chimie est bien connue et maitrisée. Cependant, il existe deux difficultés majeures pour leur mise en œuvre dans des formats miniaturisés :

- ✓ l'immobilisation des particules
- ✓ la réalisation d'un lit de particules uniforme.

Une des premières solutions a été d'introduire les particules via un canal latéral dédié et de les immobiliser par la présence de frittés de type COMOSS aux extrémités du canal de séparation [132, 133]. Ro *et al.* ont ainsi pu immobiliser des particules C_{18} de 5 µm de diamètre sur une longueur de 3 mm dans des microcanaux en PDMS. La préconcentration et la séparation de deux coumarines neutres ont pu être réalisées en 90s. La société Agilent a également utilisé cette méthode d'immobilisation malgré sa difficulté de mise en œuvre [71] (**Figure I.37**). Leurs puces en polyimide peuvent accueillir différents types de phases stationnaires (C_8, C_{18} et TiO_2). Les bonnes performances chromatographiques pour des particules de 5 µm (H = 15 µm à la vitesse optimale) ainsi que la bonne stabilité de la phase stationnaire dans les microcanaux ont permis d'étudier l'influence de la géométrie [134], de la taille de la particule ainsi que du mode de fabrication des microsystèmes [135, 136].

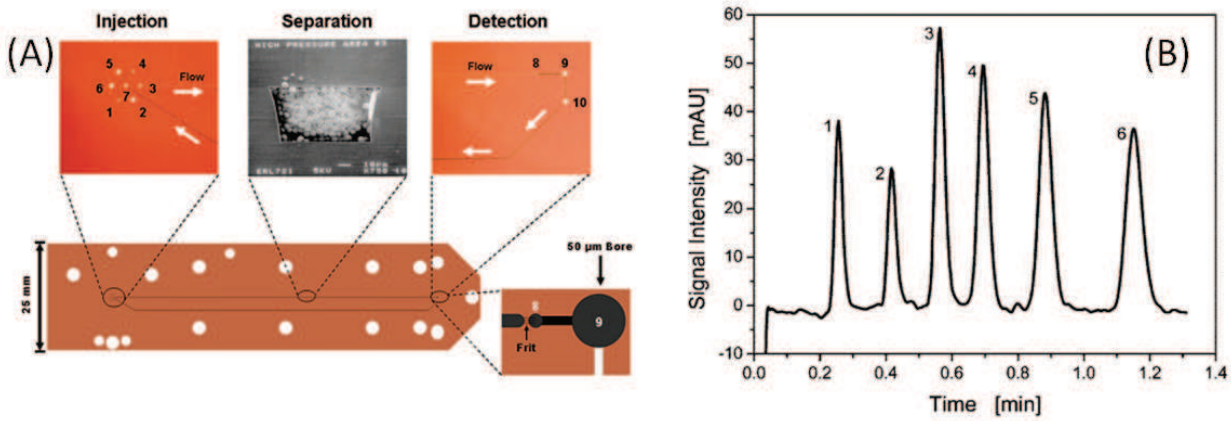


Figure I.37 : (A) schéma général de la puce Agilent comprenant une vanne d'injection, un canal de séparation rempli de particules de silice et d'un détecteur UV. (B) Séparation de 5 alkylbenzènes sous une pression de 3 bars. (1) uracil, (2) benzène, (3) éthylbenzène, (4) propylbenzène, (5) butylbenzène, (6) pentylbenzène. Phase mobile : acétonitrile/eau 80/20 (v/v) [135].

Le groupe d'Ehlert a également montré que des frittés obtenus par des techniques de microfabrication permettaient de générer moins de dispersion que les verres frittés classiques [135]. En effet, une diminution de H de 20 % a été observé en utilisant des frittés microfabriqués.

Le microsystème cHiPLC en verre, développé par Eksigent, utilise également des frittés pour immobiliser la phase stationnaire. Ce micosystème est aussi robuste, performant et peut accueillir différents types de phases stationnaires à base de silice [137, 138].

L'idée d'immobiliser des lits de particules dans des microcanaux sans fritté a été exploitée par Verpoorte *et al.* [135]. Ils ont rempli par dépression 4 cm d'un canal en PDMS avec des particules C_{18} de 3 µm de diamètre, les particules étant immobilisées par agrégation lorsque la section du canal se rétrécit à son extrémité (**Figure I.38**).

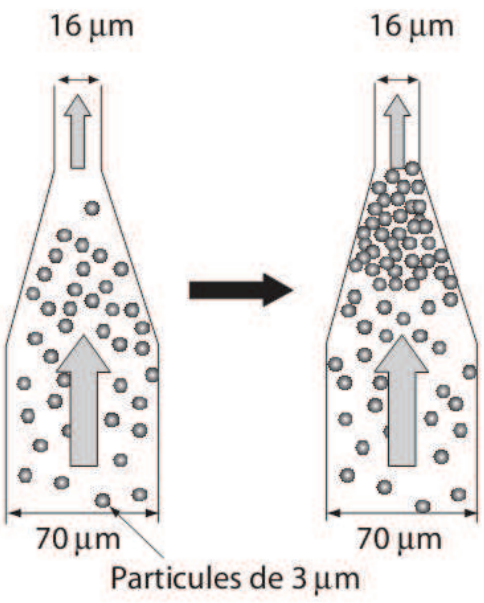


Figure I.38 : Application de l'effet keystone pour immobiliser des particules dans des microcanaux en PDMS [135].

Cette technique appelée « keystone » (clé de voute) a permis la séparation électrochromatographique de méthanol et de benzaldéhyde avec une efficacité de 290 000 plateaux/m pour le méthanol. Cependant, une mauvaise reproductibilité inter-microsystèmes ainsi qu'une répartition inhomogène des particules ne permet pas de considérer cette technique comme viable.

Dans un souci d'augmenter les efficacités, les chercheurs ont travaillé sur la réduction du diamètre des particules [136]. Des phases stationnaires à base de silice colloïdale auto-assemblée, immobilisées par des frittés, ont été mises en œuvre. Grâce à une distribution de taille des nodules très serrée et à une très grande homogénéité du lit poreux [139, 140], des particules C_{20} de 200 nm permettent ainsi d'obtenir des hauteurs de plateau théorique de l'ordre de 2.5 µm dans des microsystèmes en verre [140]. Ces structures présentent ainsi l'avantage d'augmenter considérablement le volume de phase stationnaire à l'intérieur des microcanaux. Malgré ces performances intéressantes, l'utilisation de particules et de frittés rend difficile la fabrication de ce type de microsystème séparatif.

Pour contourner le problème d'immobilisation des particules, le groupe de Gomez a exploité le caractère élastique du PDMS pour piéger les particules de silice greffée [141]. Le PDMS est déformé durant le remplissage des microcanaux par une suspension de particules C_{18} sous une pression de 2 bars. Lorsque la pression n'est plus appliquée, des contraintes sont appliquées par le PDMS sur les particules et l'ensemble de la phase stationnaire se retrouve ainsi immobilisée (**Figure I.39**). Ce microsystème séparatif n'a malheureusement pas été testé d'un point de vue chromatographique.

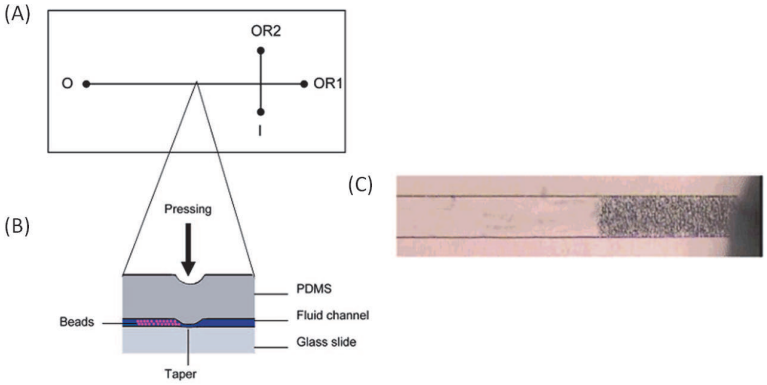


Figure I.39 : (A et B) schéma général du procédé d'immobilisation des particules par pression. (C) Piégeage de la phase stationnaire particulaire dans un canal PDMS [141].

Même si les particules semblent être "ancrées" dans la paroi du PDMS, le traitement thermique assurant la stabilité du lit chromatographique ainsi que l'utilisation du PDMS comme matériau sont des inconvénients majeurs qui ne permettent pas d'envisager l'utilisation de cette technique comme moyen d'introduction d'une phase stationnaire dans des microcanaux.

Pour résumer, l'introduction d'une phase stationnaire dans des canaux micrométriques est laborieuse et peu reproductible. Elle requiert, en outre, l'insertion de frittés aux extrémités du microcanal, qui produisent souvent des adsorptions non spécifiques des solutés au cours des analyses. Le lit de particules reste souvent instable entraînant des gros problèmes de reproductibilité dans les séparations chromatographiques. De plus, l'utilisation de frittés peut être responsable de la formation de bulles d'air perturbant l'analyse.

I.3.4. Vers les nouvelles phases stationnaires monolithiques

Les phases stationnaires monolithiques sont des structures polymériques, continues, poreuses et synthétisées *in-situ*, permettant ainsi de palier aux contraintes techniques d'immobilisation des phases stationnaires particulaires dans des microcanaux. Les monolithes présentent des caractéristiques structurales particulières (**Figure I.40**).

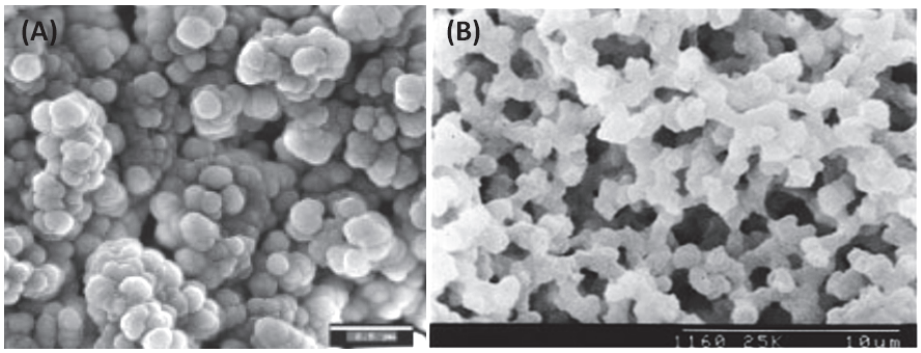


Figure I.40 : Images MEB (A) d'un monolithe organique à base de méthacrylate [142] et (B) d'un monolithe inorganique de silice [143].

Ils sont constitués d'une structure poreuse tridimensionnelle composée de nodules interconnectés formant le squelette de la colonne. Les monolithes possèdent généralement un double réseau poreux constitué de macropores (> 50 nm) induisant une faible résistance à l'écoulement et de mésopores (2 – 50 nm) et/ou micropores (< 2 nm) contribuant à la surface spécifique du monolithe et donc à la rétention chromatographique des solutés [144]. L'ensemble donne lieu à un flux perfusif favorisant des transferts de masse rapides entre la phase mobile et la phase stationnaire.

Leur utilisation en tant que phase stationnaire dans les techniques séparatives classiques, comme la chromatographie en phase liquide ou l'électrochromatographie capillaire, rencontre un intérêt croissant depuis le début des années 1990 [143, 145-147].

Les monolithes peuvent être classés en deux catégories suivant la nature du matériau, les monolithes inorganiques (oxyde de silicium, titane ou zircone) et les monolithes organiques ((méth)acrylate, styrène, divinylbenzène, acrylamide...) [143, 147-150]. Ces deux familles de monolithes sont utilisées pour la bio-séparation de macromolécules (protéines, acides nucléiques...) ainsi que pour la séparation de plus petites molécules (ions inorganiques...) [25, 143, 151].

I.3.4.1. Les colonnes monolithiques inorganiques

Parmi tous les monolithes inorganiques existants [150, 152-155], seuls ceux à base de silice ont été synthétisés dans des microcanaux. Les monolithes inorganiques de silice sont largement exploités en chromatographie liquide [150, 156-158] compte tenu de l'expérience acquise par les chromatographistes à travers l'usage de la silice sous le format particulaire. Ainsi, le transfert direct des méthodes chromatographiques établies pour les lits particulaires vers les monolithes est simplifié grâce à la grande similitude des propriétés physico-chimiques des supports siliciques. L'intérêt des monolithes inorganiques s'est accru quand la société Merck a commercialisé en 2001 une colonne HPLC monolithique appelée « Chromolith® » [159]. Par la suite, de nombreuses études de comparaison de performances chromatographiques entre colonne monolithique et particulaire ont été réalisées [129, 156, 157].

Les monolithes de silice sont préparés via le procédé sol-gel, qui combine l'hydrolyse et la polycondensation d'alkoxydes et d'alkoxysilanes (**Figure I.41**). Traditionnellement, l'hydrolyse est initiée par le mélange d'eau et d'alkoxyde en présence d'alcool comme co-solvant ou d'un catalyseur (étape 1). L'hydrolyse de Si-OR produit Si-OH qui va ensuite se condenser avec un autre Si-OH pour donner une espèce polycondensée contenant des ponts siloxanes et de l'eau (étape 2). Les condensations successives conduisent à la croissance d'un réseau de gel. Pendant la formation du monolithe, il se produit une décomposition spinodale [143]. Ce mécanisme est connu pour les matériaux ayant des dynamiques relativement lentes et génère des structures co-continues de deux phases séparées. La phase riche en silice devient le squelette du monolithe tandis que la phase riche en solvant forme les macropores.

$$Si(OR)_4 + H_2O \rightarrow Si(OH)(OR)_3 + ROH \qquad (1)$$

$$Si - OH + Si - OH \rightarrow Si - O - Si + H_2O \qquad (2)$$

Figure I.41 : Différentes étapes intervenant dans le procédé sol-gel. (1) hydrolyse et (2) condensation.

La macroporosité du monolithe est donc générée par la présence d'un solvant ou porogène dans le mélange réactionnel. Le solvant est généralement constitué d'un mélange eau/alcool. L'alcool doit préférablement être un alcool parent de l'alkoxyde métallique afin d'éviter les réactions de transestérification qui se manifestent par une substitution des groupements alcoolate de l'alkoxyde par les groupements alcoolate du solvant. Ainsi, Nakanishi *et al.* ont démontré que le diamètre des pores du monolithe de silice dépendait de la proportion en porogènes (polyéthylène oxyde ou PEO) présent dans le mélange de polymérisation (**Figure I.42**) [160]. Une augmentation de la concentration en PEO se traduit par une diminution de la taille des pores.

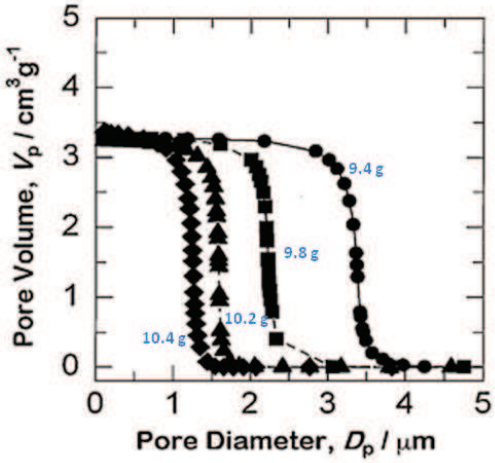


Figure I.42 : Variation du diamètre des pores du monolithe de silice en fonction de la proportion en porogènes (PEO) dans le mélange réactionnel [160].

Cependant, le squelette de silice ainsi formé contient à sa surface des micropores (< 2 nm). Afin de répondre aux besoins de la chromatographie, les microcopores présents à la surface de la silice doivent être redimensionnés pour augmenter leur taille et éviter des mécanismes parasites de séparation tels que l'exclusion stérique ou des adsorptions irréversibles dues aux fortes énergies de surface qui existent dans des petits pores. Le diamètre moyen des pores dans un support chromatographique doit être dix fois supérieur à la dimension critique du soluté [161].

Le pH et la température des solutions ont une grande influence sur la distribution de la taille des pores et permettent de générer des mésopores [143, 160]. L'utilisation de la température est la méthode la plus utilisée en raison de sa simplicité de mise en œuvre [143]. L'augmentation de la température conduit à des pores plus grands ainsi qu'à une distribution en taille plus large (**Figure I.43**).

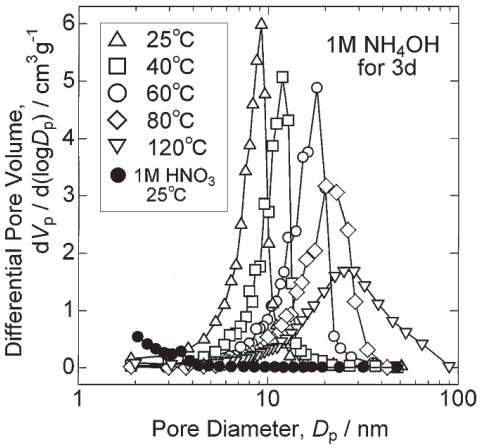


Figure I.43 : Effet du traitement thermique sur la distribution des mésopores des gels traités après immersion pendant 3 jours dans une solution ammoniacale. Distribution obtenue à partir des données de l'adsorption-désorption de l'azote [160].

Enfin, la synthèse des monolithes inorganiques se termine par une étape de calcination, qui permet d'éliminer le polymère porogénique ainsi que le solvant et de renforcer le squelette en favorisant des réactions de condensations additionnelles. Pour limiter les risques de fissure pouvant apparaitre dans cette étape, un rinçage est essentiel pour remplacer le solvant par un autre dont la tension de vapeur et la viscosité sont réduites.

La synthèse des monolithes inorganiques à base de silice est très pratiquée dans les capillaires de silice puisqu'aucun traitement préalable de la surface n'est nécessaire pour ancrer le monolithe [150, 155, 158]. Les groupements silanols issus de la paroi silice sont directement incorporés dans les réactions sol-gel. De très bonnes performances chromatographiques sont obtenues avec ce type de phases stationnaires monolithiques en capillaire où des efficacités de l'ordre de 100 000 plateaux/m sont régulièrement atteintes avec des composés modèles tels que les alkylbenzènes ou les pesticides (**Figure I.44**) [153, 162].

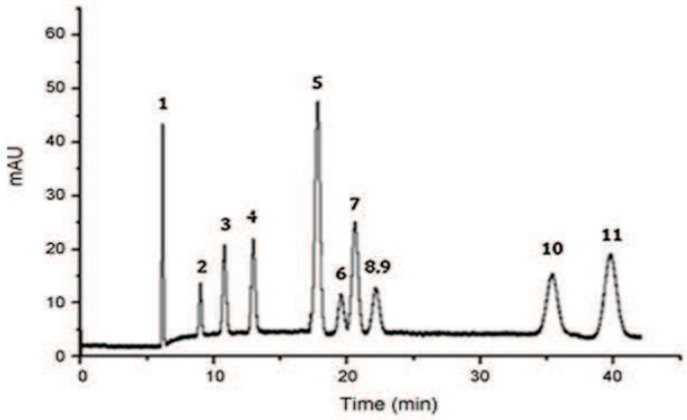


Figure I.44 : Séparation Nano-LC de 10 herbicides en capillaire de 150 µm de diamètre interne. l=27.2cm. Phase mobile : ACN/H_2O (40/60, v/v). P = 3 bar.Injection 3 bar pendant 10 s. 25°C. détection UV à 254 nm. (1) thiourée, (2) fénuron, (3) métoxuron,(4) monuron, (5) fluometuron, (6) monolinuron, (7) chlorotoluron, (8) diuron, (9) métobromuron, (10) chlorobromuron, (11) linuron [150].

Malgré les atouts indéniables de ces monolithes inorganiques, plusieurs inconvénients majeurs ont ralenti le développement de ce type de phase stationnaire en microsystème :

- ⇨ Un temps de synthèse long (plusieurs jours) et se réalisant en plusieurs étapes complique considérablement la synthèse des monolithes inorganiques en microsystème.
- ⇨ Certaines étapes de la synthèse se déroulent à haute température pendant plusieurs heures comme l'étape de calcination. Il n'est donc pas envisageable de réaliser cette étape nécessaire à la synthèse des monolithes inorganiques dans les microsystèmes en plastique, en raison de leur faible température de transition vitreuse (T_g).
- ⇨ La localisation des monolithes de silice dans un canal est très difficile voire impossible du fait de la diffusion thermique.

Pour contourner ces problèmes et notamment celui de la localisation du monolithe dans des microcanaux, Morishima a proposé un monolithe hybride, à la fois inorganique et organique, synthétisé par la polymérisation sous rayonnement UV appelée classiquement photopolymérisation [154] (**Figure I.45**). Ce processus de photopolymérisation a permis de localiser ce monolithe hybride à base de silice et d'acrylate dans un canal en verre à l'aide d'un masque. Les performances de séparation de deux coumarines obtenues par chromatographie à polarités des phases inversées sont néanmoins peu satisfaisantes en raison d'une structure monolithique hétérogène, avec des efficacités atteignant seulement 18 000 plateaux/mètres.

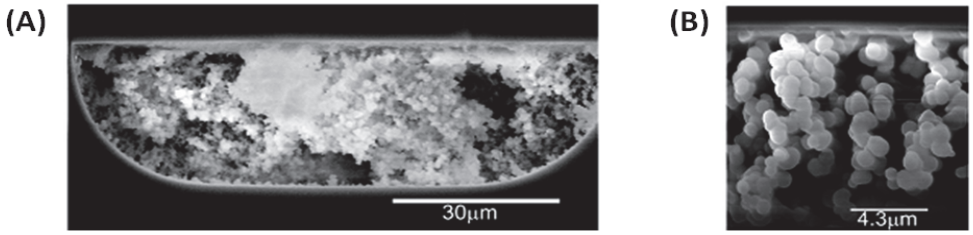


Figure I.45 : Images MEB d'un canal en verre (A) rempli de monolithe hybride silice/acrylate, (B) ancré à la paroi [154].

Une autre technique a consisté à localiser le créneau de mélange réactionnel dans le canal de séparation en contrôlant précisément la pression d'air de chaque côté. Le groupe d'Ishida a ainsi réussi à localiser une phase stationnaire monolithique inorganique dans un canal de séparation en verre long de 15 cm en forme de serpentin (**Figure I.46A**) [163]. Les performances chromatographiques de ce monolithe inorganique sont encore peu satisfaisantes avec des efficacités atteignant 20000 plateaux/mètres. Ces faibles performances peuvent être dues à la présence de zones vides dans le canal de séparation (**Figure I.46B**).

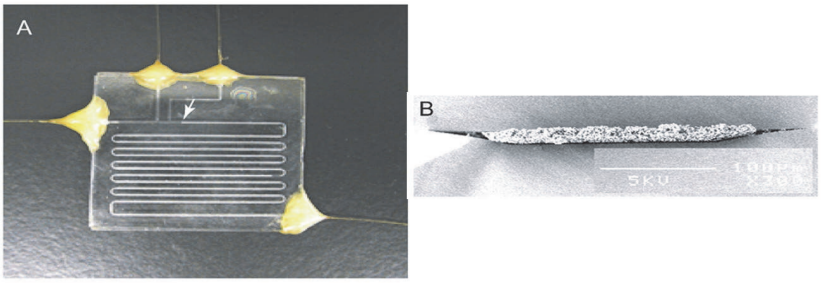


Figure I.46 : (A) Photographie d'un microsystème en verre dont seul le canal de séparation est rempli de monolithe inorganique. (B) Image MEB d'une coupe transversale d'un canal en verre rempli de phase stationnaire monolithique.

Enfin, la dernière technique de localisation référencée dans la littérature consiste à synthétiser le monolithe inorganique dans tout le microsystème et à le dégrader dans des zones bien définies [164] (**Figure I.47A**). Les monolithes de silice C_1-TMOS et C_2-TMOS ont été synthétisés in-situ dans un microsystème en verre à une température de 60°C. La phase stationnaire monolithique synthétisée dans les branches d'injection et d'élution a été éliminée en rinçant les canaux avec de la soude 3 M. Des séparations de nitroaromatiques et de nitramines ont été réalisées (**Figure I.47B**) et des efficacités de 60000 plateaux/m ont été obtenues.

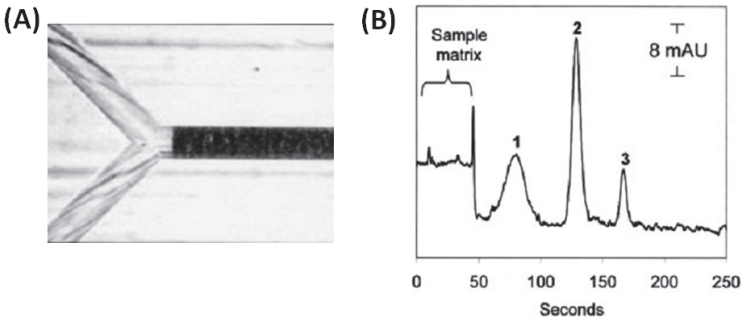


Figure I.47 : (A) Photographie d'un monolithe inorganique localisé dans un canal en verre. (B) Séparation de 3 nitroaromatiques obtenue avec un monolithe inorganique C1-TMOS. Phase mobile ACN/H2O 50/50 (v/v). Longueur de séparation : 6.2 cm. Détection UV à 254 nm [164].

L'ensemble des séparations obtenues en microsystème rempli de monolithes inorganiques, ont été réalisées sous un flux hydrodynamique. Si de nombreux travaux, à notre connaissance, ont été menés sur ces phases en électrochromatographie dans des formats capillaires [153], il n'y a aucune publication référencée dans la littérature mettant en œuvre l'électrochromatographie sur des monolithes inorganiques en microsystème.

Pour résumer, les monolithes inorganiques présentent une chimie de surface variée et bien maitrisée par les chromatographistes. Cependant, les temps de synthèse longs et coûteux ainsi que la difficulté de localiser les monolithes inorganiques dans des microcanaux ont ralenti leur développement en microsystème.

I.3.4.2. Les colonnes monolithiques organiques adaptées à l'électrochromatographie

Les monolithes organiques ont été intensivement développés en capillaire depuis le début des années 1990 en raison de leur simplicité de synthèse en format miniaturisé, comme en atteste les nombreuses revues [143, 145-147]. Hjerten *et al.* ont ainsi synthétisé le premier monolithe organique à base de N,N-méthylènebisacrylamide et d'acide acrylique dédié à la séparation de protéines par HPLC [165]. Depuis, les monolithes organiques ont été considérablement étudiés, montrant de meilleures performances que les monolithes de silice pour la séparation de grosses molécules en raison de leur biocompatibilité et de la grande variété de morphologies possibles [93]. En raison du nombre important de travaux réalisés sur la synthèse de ces monolithes organiques, nous nous limitons ici à l'état de l'art sur les monolithes organiques synthétisés en microsystème et permettant la séparation des solutés par électrochromatographie.

Comme pour les monolithes inorganiques, les monolithes polymériques présentent une structure bimodale constituée de macropores pour la circulation de la phase mobile et de petits pores pour la rétention des solutés. L'ajustement des proportions de chaque réactif du mélange de polymérisation permet de contrôler précisément la structure ainsi que la porosité du monolithe. La modification morphologique du monolithe impacte directement les performances de séparation. Ainsi, un monolithe présentant une grande surface spécifique a beaucoup de sites actifs qui interagissent avec les solutés. Cela se traduit généralement par une grande rétention.

La synthèse de ces matériaux polymériques s'effectue classiquement via un processus de polymérisation radicalaire [143]. Une description théorique et expérimentale de la polymérisation radicalaire est détaillée dans la partie I.4. Le mélange de polymérisation est généralement constitué de :

- ✓ un ou plusieurs monomères bifonctionnels appelés réticulants permettant la constitution d'un réseau tridimensionnel continu.
- ✓ un ou plusieurs monomères qui amènent les propriétés rétentives de la phase stationnaire. Ces monomères organiques peuvent être des acrylates, des acrylamides, des styrènes ou des divinylbenzènes [143, 145]. Ainsi, une grande variété de monomères est disponible, ce qui constitue un choix quasi-illimité de matrices.
- ✓ un ou plusieurs porogènes générateurs de la macroporosité du monolithe organique.
- ✓ un initiateur de radicaux libres dont l'activation est conduite sous l'action de la chaleur ou de radiations UV. L'AIBN et la benzoin methyl ether (BME) sont les deux initiateurs les plus utilisés pour la synthèse des monolithes organiques [145].

Les monolithes organiques ne possèdent pas de groupements silanols permettant de générer un flux électroosmotique comme pour les phases stationnaires particulaires et monolithiques à base de silice. Il est donc indispensable d'ajouter un monomère chargé dans le mélange de polymérisation qui apporte les charges surfaciques nécessaires à la mise en œuvre de l'électroosmose. L'ensemble

des monomères générateurs de flux cités dans la revue de Karenga et El Rassi [166] est indiqué dans le **tableau I.4**.

Tableau I.4 : liste des principaux monomères générateurs de flux électroosmotique [166].

Générateur de FEO	Nature
Monomères chargés positivement	[2-(acryloyloxy)ethyl]-trimethylammonium methyl sulphate 2-(acryloyloxy)ethyltrimethyl ammonium chloride [2-(methacryloyloxy)ethyl]-trimethylammonium chloride
Monomères chargés négativement	2-acrylamido-2-methyl-propanesulfonic acid Vinylsulfonic acid

L'ajout d'une charge dans la phase stationnaire monolithique peut entraîner des interactions électrostatiques entre cette charge et les molécules chargées à analyser. Cela se traduit généralement par une trainée des pics diminuant ainsi l'efficacité lorsqu'il y a un phénomène d'attraction. A contrario, un phénomène de répulsion est observé lorsque le soluté à séparer présente une charge identique à celle de la phase stationnaire. Les conséquences de ce phénomène vont de la perte de la rétention entraînant une difficulté pour une séparation complexe des différentes espèces présentes dans l'échantillon jusqu'à l'impossibilité d'injecter les solutés.

El Rassi *et al.* travaillent sur le développement des monolithes neutres depuis 2005 (**Tableau I.5**) [167]. Leur idée est basée sur l'utilisation du pentaerythritol diacrylate monostearate (PEDAS) comme seul monomère responsable à la fois de la réticulation du monolithe et de sa capacité de rétention. Le PEDAS présente un groupement –OH qui permet la fixation des ions de la phase mobile sur le monolithe par interaction hydrophile, générant une couche chargée et donc un flux électroosmotique. Ce même groupe a aussi développé un monolithe organique neutre combinant octadécyl acrylate (ODA) et triméthylolpropanetriméthacrylate (TRIM) pour corriger la faible rétention obtenue avec le PEDAS seul [168]. Une autre synthèse de monolithe neutre présente de meilleures performances en utilisant l'ODA associé au pentaerythritol triacrylate (PETA) [169]. Comme pour le PEDAS, le flux électroosmotique est généré par adsorption des ions de la phase mobile sur la fonction hydrophile du PETA. Les performances électrochromatographiques obtenues sur ce type de monolithe sont très satisfaisantes avec des efficacités de l'ordre de 200000 plateaux/mètre et un flux de plus de 2 mm/s. Cependant, les monolithes neutres présentent l'inconvénient d'être polymérisés à une température supérieure à 80°C, ce qui n'est pas compatible avec les microsystèmes polymériques. C'est la raison pour laquelle aucune synthèse de ce type de monolithe n'a encore été réalisée en microsystème, où seuls des monolithes chargés ont été utilisés.

Tableau I.5 : Performances électrochromatographiques obtenues sur des monolithes neutres.

ACN/eau 70/30 (%v)	PEDAS [167]	ODA-TRIM [168]	ODA-PETA [169]
Flux (mm/s)	2.3	1.8	3
H (µm)	/	6	3
k butylbenzène	0.25	0.44	1

Les dimensions et la chimie de surface des microcanaux étant très proches de celles du capillaire silice, le transfert de la synthèse des monolithes organiques du capillaire vers le microsystème est en théorie simple à mettre en œuvre. La synthèse d'un monolithe organique à l'intérieur d'un microsystème en verre nécessite une étape de prétraitement de la surface du verre afin de rendre possible l'accrochage covalent du monolithe aux parois du microsystème. La surface des parois en verre est généralement modifiée chimiquement par le 3-(trimethoxysilyl)propyl méthacrylate (γ-MAPS), appelé classiquement promoteur d'adhésion. Ce prétraitement, à base d'un silane méthacrylate, génère des groupements acrylate à la surface des parois en verre et donc rend possible la liaison entre la paroi et le monolithe en formation [19, 170].

Hjerten *et al.* ont ainsi synthétisé par initiation thermique, dans des microsystèmes en quartz, différents types de monolithes à base d'acrylamide pour séparer par électrochromatographie des alkyl phénones ou des anti-dépresseurs (**Figure I.48**) [171]. Une nuit à température ambiante a permis de polymériser la phase stationnaire, qui a été localisée sur 28 cm de long dans le canal dédié à la séparation via l'introduction de polyéthylène glycol aux extrémités de ce canal. Des efficacités supérieures à 200 000 plateaux/m ont été obtenues en électrochromatographie sur microsystème, valeurs comparables à celles déterminées en capillaires.

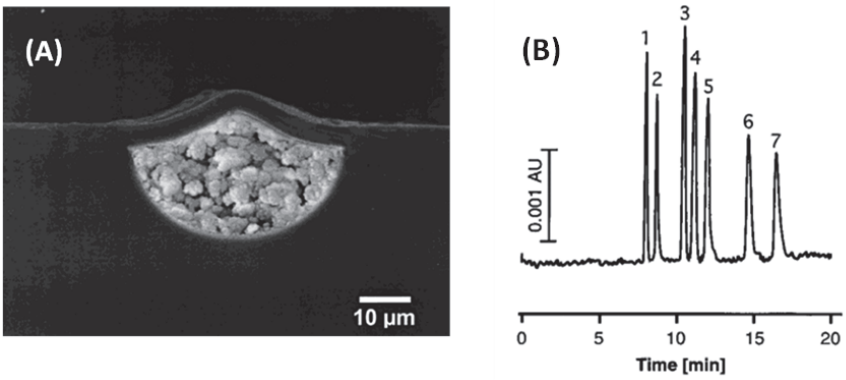


Figure I.48 : (A) Image MEB d'un canal en quartz rempli de monolithe à base d'acrylamide. (B) Séparation de 6 alkyl phénones dans un microsystème en quartz rempli de monolithe à base d'acrylamide. Longueur de séparation : 28 cm. Phase mobile : ACN/H2O 30/70 (v/v). 5 mM phosphate de sodium pH=2.5. Champ électrique de séparation : 500 V/cm. Détection UV à 240 nm. Solutés : (1) acétone, (2) aniline, (3) acétophenone , (4) propiophénone, (5) butyrophenone, (6) 2,6-dihydroxyacetophenone, (7) 2,5-dihydroxypropiophenone [171].

La polymérisation peut également être initiée dans les microsystèmes en verre par une irradiation UV, permettant une synthèse et localisée via l'utilisation d'un masque. Ainsi, Shepodd *et al.* ont photopolymérisé et localisé des monolithes acrylates chargés négativement [4]. Des séparations électrochromatographiques d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), de peptides et d'acides aminés ont été réalisées et des efficacités atteignant des 600000 plateaux/m ont été obtenues (**Figure I.49**).

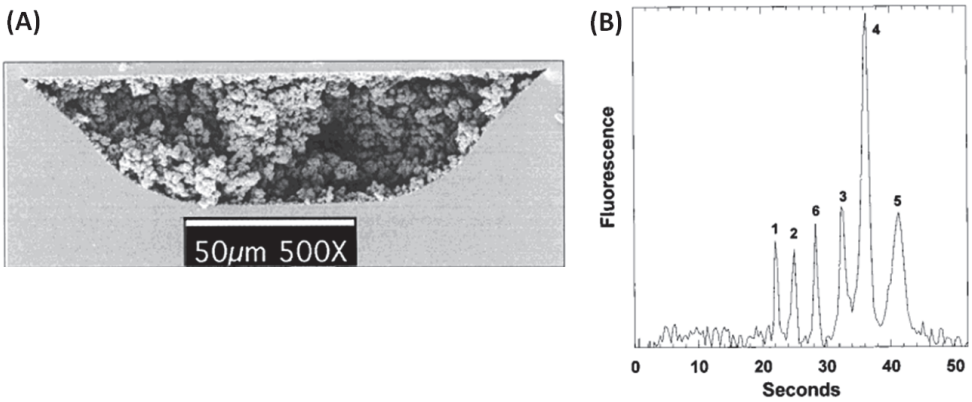


Figure I.49 : (A) Image MEB de la coupe transversale du microsystème et du canal en verre où a été synthétisé un monolithe à base d'acrylate. (B) electrochromatogramme de 6 peptides sur ce même microsystème. Phase mobile : tampon borate 25 mM – acétonitrile (7/3). Champ électrique : 770 V/cm. Longueur de séparation : 7 cm. Solutés : (1) inhibiteur de la papaïne, (2) proctoline, (3) opioide, (4) ile-angiotensine III, (5) angiotensine III, (6) GGG [4].

Les microsystèmes séparatifs en verre présentent une capacité de diffusion thermique plus importante que les capillaires et permettent donc de limiter les effets Joules [4]. Cette capacité des microsystèmes séparatifs à diffuser la chaleur générée rend possible l'utilisation de champ électrique élevé et l'obtention de vitesse linéaire élevée permettant d'atteindre des efficacités supérieures à celles observées en capillaire.

L'utilisation de la photopolymérisation a ensuite été largement utilisée pour la synthèse in-situ d'un monolithe organique en microsystème verre [19, 20, 172-175]. Les efficacités atteignent régulièrement plus de 200000 plateaux/m permettant ainsi la séparation de 13 hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) en 15 minutes (**Figure I.50**).

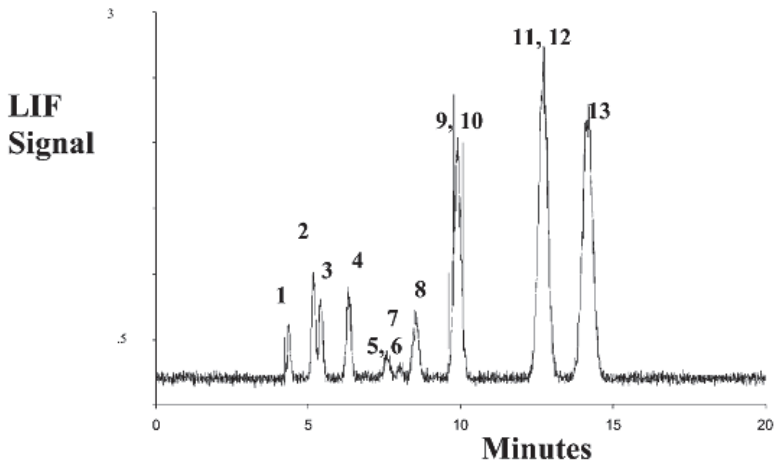


Figure I.50 : Electrochromatogramme correspondant à la séparation de 13 hydrocarbures aromatiques polycycliques sur un microsystème verre. (1) naphtalène, (2) acénaphtylène, (3) acénaphtène, (4) fluorène, (5) phénanthrène, (6) anthracène, (7) fluoranthène, (8) pyrène, (9) benz(a)anthracène, (10) chrysène, (11) benz(b)fluoranthène, (12) benzo(k)fluoranthène, (13) benzo(a)pyrène. Phase mobile, tampon Tris 5 mM pH 8 – acétonitrile (2/8). Longueur de séparation : 7 cm. Injection : 280 V/cm pendant 5 min. Champ électrique de séparation : 280 V/cm.

Le développement des monolithes organiques en microsystème verre semble avoir atteint son apogée puisque toutes les étapes nécessaires à l'analyse d'échantillons réels ont été intégrées :

- ⇨ intégration d'une étape d'extraction/préconcentration pour diminuer les limites de détection [1, 174].
- ⇨ application d'un gradient linéaire d'élution généré électrochromatographiquement [176] (**Figure I.51**).

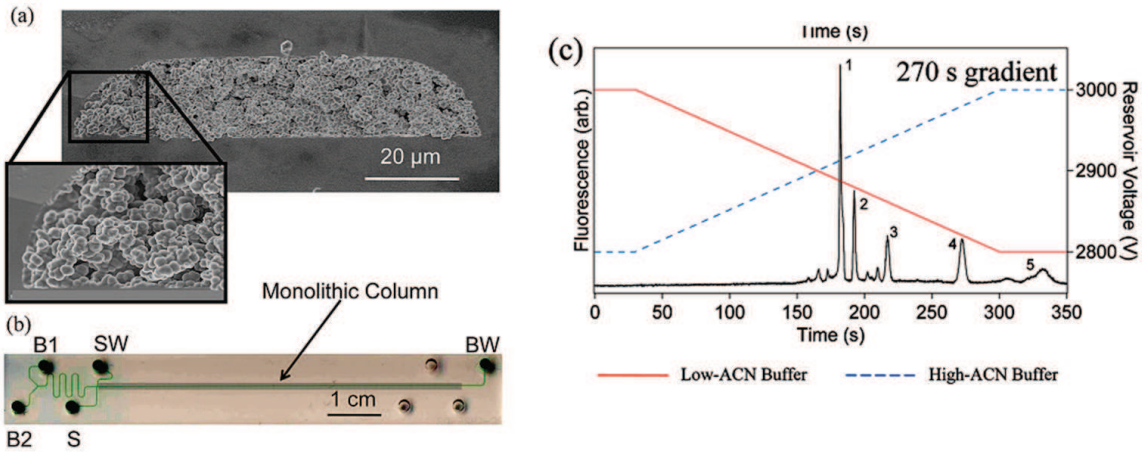


Figure I.51 : (a) Image MEB d'un monolithe organique localisé dans un microsystème en verre. (B) Photographie du microsystème utilisé pour la mise en œuvre d'un gradient linéaire d'élution. (C) Electrochromatogrammes d'un mélange de peptides dérivé par le fluorophore FITC. (1) bradykinin, (2) oxytocin, (3) angiotensin I, (4) angiotensin IV, et (5) leucine enkephalin. Un gradient d'élution de 2 à 60 % d'ACN est appliqué pendant 270 s [176].

Les microsystèmes en verre sont progressivement remplacés par des microsystèmes fabriqués dans des matériaux plastiques, afin de développer des outils analytiques peu chers et jetables. La synthèse des monolithes dans ce type de matériaux ne peut pas être initiée thermiquement en raison de leur faible température de transition vitreuse (T_g). Cette synthèse nécessite donc d'être initiée par irradiation UV.

Les monolithes organiques ont tout d'abord été implantés dans des microsystèmes en PDMS. Zheng *et al.* ont synthétisé in-situ un monolithe acrylamide chargé négativement dans un canal en PDMS dont les parois ont été fonctionnalisées par le γ-MAPS [177, 178]. Les agents réticulants allyl-γ et allyl-β-CD présents dans la structure du monolithe jouent le rôle de sélecteurs chiraux pour la séparation d'énantiomères dans la famille des acides aminés. Cependant, la forte adsorption des monomères et des porogènes à la surface du PDMS rend difficile la synthèse in-situ des monolithes organiques dans ce matériau. Cette adsorption entraine une mauvaise répétabilité dans la synthèse.

La modification de surface du PDMS par voie photochimique, très largement étudiée dans la littérature en milieu ouvert sur des plaques ou en milieu fermé dans des microcanaux [23, 26, 29], permet de palier à ce problème. Faure *et al.* ont ainsi modifié chimiquement la surface du PDMS avec une couche de polymère obtenu à partir d'un monomère diacrylate (ethylène diméthacrylate ou EDMA). La couche de méthacrylate incorporée à la paroi contient des fonctions libres pouvant réagir par la suite avec un monolithe en formation. Ils y ont ensuite synthétisé un monolithe acrylate chargé négativement pour la séparation de deux catécholamines (**Figure I.52**) [179]. Cette étape de fonctionnalisation permet donc à la fois de limiter l'adsorption des monomères/porogènes et d'ancrer le monolithe organique à la surface du PDMS. Comme pour la plupart des matériaux polymériques, elle est réalisée à l'aide de benzophénone dont le mécanisme d'action est décrit dans la partie I.5 de ce chapitre de thèse.

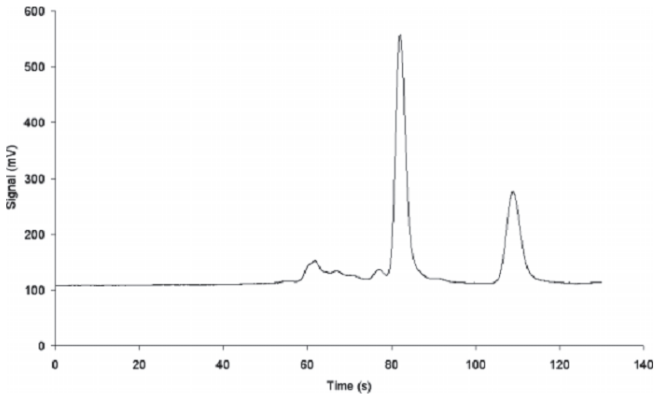


Figure I.52 : Electrochromatogramme de noradrénaline et de dopamine. Phase mobile : 40% phosphate de sodium 5 mM pH 2.0 et 60% ACN. Injection pincée pendant 50 s. Champ électrique de séparation : 300 V/cm. Longueur de séparation : 3 cm [179].

Malgré cette étape de fonctionnalisation, l'adsorption des monomères et des porogènes à la surface du PDMS n'est pas toujours totalement éliminée. Ce matériau est donc progressivement remplacé

par d'autres matériaux polymériques ayant une inertie chimique plus importante tels que le polyimide ou le COC.

La photopolymérisation de monolithes organiques dans le polyimide n'est pas possible car le polyimide ne transmet pas les rayonnements UV. Des synthèses de phases stationnaires monolithiques organiques initiées thermiquement ont été réalisées avec succès dans des microsystèmes en polyimide [180, 181]. Cependant, ces monolithes non chargés présentent l'inconvénient d'être polymérisés thermiquement pendant plus de 24 heures et de ne pas permettre la mise en mouvement des liquides par électroosmose nécessaire en électrochromatographie.

Le COC est devenu en quelques années le matériau de choix pour la synthèse des monolithes en microsystème plastique car il est inerte face aux solvants organiques et absorbe très peu les monomères. Plusieurs groupes de recherche ont travaillé sur la synthèse et l'ancrage des monolithes organiques en microsystème COC [182-184]. Cependant, les phases stationnaires développées ne sont pas dédiées à la séparation par électrochromatographie. Le groupe de Knapp a par exemple développé un monolithe à base de méthacrylate pour la séparation de peptides par application d'un flux hydrodynamique [183]. L'ensemble des travaux réalisés a permis de mettre au point les étapes de fonctionnalisation du COC nécessaire à la modification de l'hydrophobicité du matériau et à l'ancrage du monolithe à la surface des parois en COC. Ces étapes de fonctionnalisation sont détaillées dans la partie I.5 de ce chapitre bibliographique.

Faure *et al.* ont synthétisé le premier monolithe organique à base d'acrylate dédié à l'électrochromatographie dans un microsystème en COC [116]. L'introduction de l'AMPS permet d'introduire une charge dans le monolithe et de générer le flux électroosmotique. Le monomère lauryl méthacrylate a été introduit dans le mélange de polymérisation afin d'obtenir des rétentions importantes pour des solutés hydrophobes. Une étape de fonctionnalisation de la surface du canal a été réalisée avant synthèse du monolithe afin de pouvoir immobiliser le monolithe à la surface du COC, comme précédemment pour les microsystèmes en PDMS à partir de l'EDMA. Les performances électrochromatographiques sont satisfaisantes puisque des efficacités de 85000 plateaux/mètres ont été obtenues sur la séparation de 5 hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (**Figure I.53**). Néanmoins, une mauvaise répétabilité de la synthèse du monolithe acrylate a été observée.

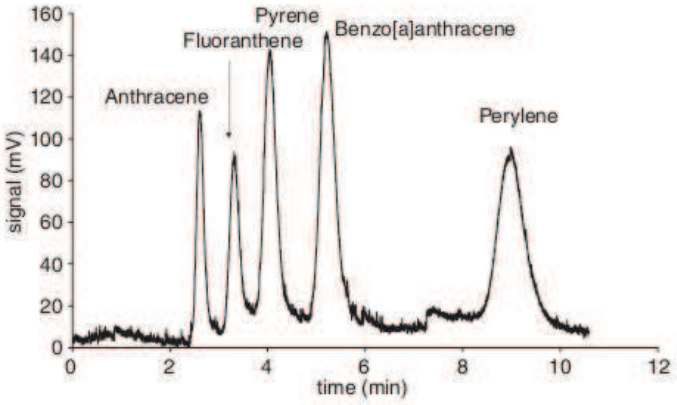


Figure I.53 : Electrochromatogramme de 5 HAP obtenu en microsystème COC. Phase mobile 80/20 ACN/Tampon tris 10 mM pH 7.4. Injection : 510 V/cm pendant 5 s. Champ électrique de séparation : 223 V/cm. Longueur de séparation : 1.75 cm [116].

Il est donc possible de conclure que les monolithes organiques constituent aujourd'hui une option privilégiée lorsque la présence d'une phase stationnaire en microsystème est requise. En effet, leur grande surface spécifique offre de grandes capacités de rétention et la grande variété des monomères disponibles permet d'envisager de mettre en œuvre tout type de chromatographie. De plus, ces monolithes organiques présentent l'avantage d'être synthétisés en une seule étape via la polymérisation radicalaire, qui est un processus simple, peu coûteux, et rapide. La synthèse in-situ des monolithes organiques dans des microsystèmes en COC dédié à l'analyse par électrochromatographie permet donc d'envisager la fabrication d'un outil analytique peu cher, simple à mettre en œuvre et jetable. Ce type de microsystème analytique remplit alors les critères requis pour l'analyse-sur-site.

I.4. Principes de la polymérisation sous rayonnement UV

Les monolithes organiques sont synthétisés via le processus de polymérisation en chaine [67]. Un centre actif initial (radical ou ion) porté par la chaine en croissance, réagit avec les monomères et permet la formation du polymère. La formation de centres actifs peut être initiée par voie thermique, photochimique ou radiochimique. La radiopolymérisation n'a jamais été utilisée pour ces synthèses car les rayonnements ionisants, du fait de l'énergie très élevée des particules ou des quanta, attaquent presque indistinctement toutes les structures présentes. Des inhomogénéités de la structure du monolithe sont alors observées.

L'activation photochimique est l'une des méthodes les plus efficaces pour créer des espèces réactives et amorcer ainsi des réactions chimiques pouvant conduire à la synthèse de nouveaux matériaux. La polymérisation sous rayonnement UV ou photopolymérisation a trouvé ses principaux débouchés dans le domaine du traitement de surface de matériaux par des revêtements protecteurs

[185, 186]. Ce type d'initiation est également très utilisé depuis le début des années 1990 pour la synthèse des monolithes organiques en capillaire et en microsystème [25].

La photopolymérisation présente plusieurs avantages par rapport à la polymérisation thermique (**Tableau I.6**). Le contrôle spatio-temporel de la polymérisation est tout à fait possible dans le cas de la synthèse d'un polymère photo-amorcé. La rapidité du processus de polymérisation, de l'ordre de quelques minutes au lieu de plusieurs heures pour la polymérisation thermique, permet de diminuer les temps de fabrication et donc de diminuer les coûts de production.

Tableau I.6 : Caractéristiques de la polymérisation amorcée par voie photochimique ou par voie thermique

Caractéristiques	Polymérisation sous rayonnement UV	Polymérisation par voie thermique
Durée de polymérisation	quelques minutes	quelques heures
Contrôle spatial du polymère	oui car la polymérisation intervient uniquement dans les zones exposées aux UV	impossible car diffusion thermique
Contrôle temporel	oui	non

De plus, la profondeur de pénétration de la lumière et donc l'épaisseur de la couche de polymère peut être modulée de quelques micromètres à plusieurs millimètres en agissant sur la longueur d'onde du rayonnement lumineux et/ou sur la concentration en photoinitiateur.

Les polymères obtenus peuvent se présenter sous diverses formes : linéaire, branchée ou réticulée (**Figure I.54**). Lorsque les macromolécules de polymère sont liées les unes aux autres transversalement en d'autres points que leurs extrémités, le polymère est dit réticulé.

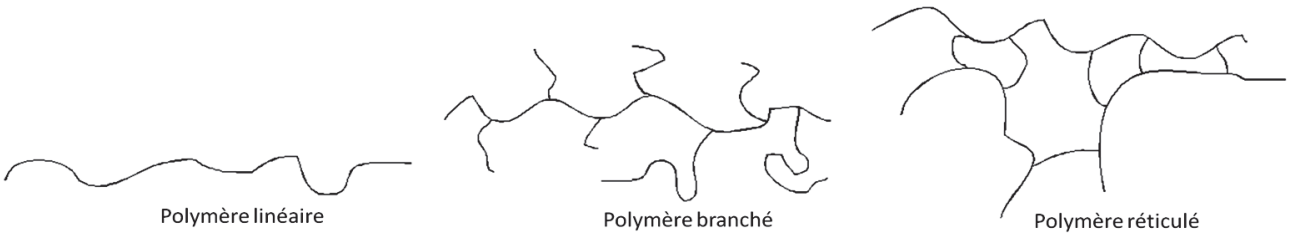


Figure I.54 : Différentes structures polymériques possibles.

L'ensemble du processus de polymérisation sous rayonnement UV se décompose en deux étapes (**Figure I.55**) :

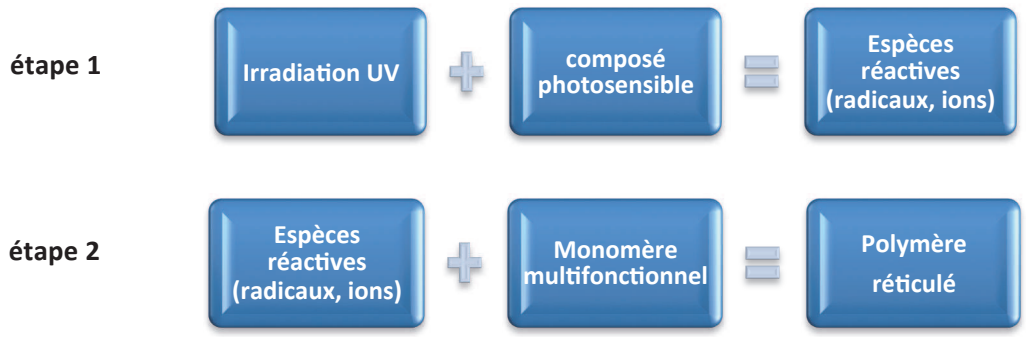


Figure I.55 : Représentation schématique du processus de polymérisation.

Comme la plupart des monomères ne produisent pas de radicaux amorceurs en quantité suffisante lorsqu'ils sont exposés au rayonnement UV, il est nécessaire d'ajouter un composé photosensible qui absorbe efficacement la lumière incidente et produit des espèces radicalaires ou ioniques avec un rendement quantique ϕ_a élevé. Le rendement quantique est défini comme étant le rapport du nombre de molécules transformées au nombre de photons absorbés. L'introduction d'un photoinitiateur dans le mélange de polymérisation permet de générer ces espèces réactives par absorption d'un photon. Un monomère multifonctionnel possédant une ou plusieurs fonctions réactives réagit ensuite avec ces espèces réactives formées et donne naissance à un réseau polymère tridimensionnel.

On distingue deux catégories de réactions de photopolymérisation selon le mécanisme mis en jeu et la nature des espèces actives :

- ✓ les systèmes cationiques.
- ✓ les systèmes radicalaires.

I.4.1. Les systèmes cationiques

La polymérisation cationique est un type de polymérisation en chaîne dans lequel le centre actif est de nature cationique.

Les photoinitiateurs cationiques tels que les sels de diaryliodonium ou de triarylsulfonium par exemple génèrent des acides protoniques formés en présence d'une molécule donneur d'hydrogène sous irradiation UV et capables d'amorcer la polymérisation. Ces photoinitiateurs sont très stables thermiquement, solubles dans la plupart des monomères et génèrent efficacement des espèces réactives (rendement quantique élevé).Ces systèmes cationiques sont particulièrement bien adaptés aux monomères qui ne polymérisent pas par voie radicalaire. Les monomères concernés sont ceux qui possèdent des groupements électro-donneurs, tels que les éthers vinyliques, les époxydes, les lactones, les éthers cyliques ou les époxysilicones [187, 188].

Le mécanisme photochimique est présenté sur la **Figure I.56**. Il comprend l'initiation, la propagation, éventuellement le transfert et la terminaison. Le sel de trialrylsulfonium se décompose en radical cation (H^+X^-) sous l'effet du rayonnement UV. Ce radical cation réagit ensuite avec le solvant ou le

monomère pour induire une polymérisation. La longueur d'onde d'irradiation doit être comprise entre 230 et 300 nm afin de pouvoir amorcer la polymérisation.

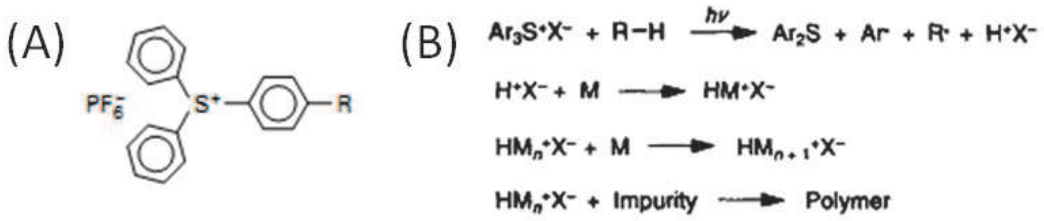


Figure I.56 : (A) Structure chimique et (B) mécanisme photochimique du sel de triarylsulfonium [187].

Ces systèmes cationiques sont insensibles vis-à-vis de l'oxygène et peuvent suivre leur polymérisation sous l'effet de la lumière naturelle ou dans l'obscurité jusqu'à consommation complète du monomère. La polymérisation cationique est très utilisée pour la synthèse de polymères époxydes et éthers vinyliques [189-191].

La fonctionnalisation de monolithe de silice par du méthacryloxypropyltriméthoxysilane [192] a été réalisée à partir de chlorure de diphenyliodonium (DPI) qui est un photoinitiateur cationique. Cette étape de fonctionnalisation a permis la séparation de 6 composés cétones (**Figure I.57**).

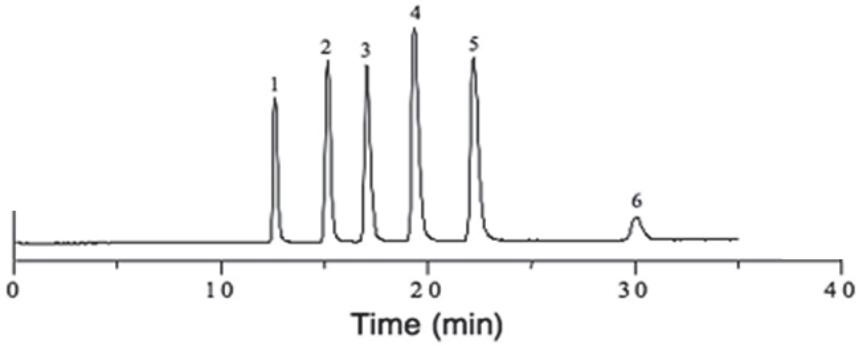


Figure I.57 : Séparation de 6 cétones sur un monolithe de silice fonctionnalisé à partir d'un photoinitiateur cationique. (1) propiophénone, (2) valérophénone, (3) hexanophénone, (4) heptanophénone, (5) octanophénone et (6) décanophénone [192].

Cependant, les photoinitiateurs cationiques n'ont jamais été utilisés pour amorcer la synthèse des monolithes organiques en raison du fait que la polymérisation se poursuit en l'absence de rayonnement UV après initiation. Cela ne permet pas d'envisager la localisation du monolithe dans un canal et risque d'induire un manque de reproductibilité dans la synthèse. De plus, les longueurs d'onde d'irradiation d'activation de ces photoinitiateurs ne sont pas compatibles avec le matériau COC (**Figure I.4**), même si d'importants travaux sont actuellement réalisés pour élargir cette bande spectrale (de 230 à 600 nm) [188, 192].

I.4.2. Les systèmes radicalaires

La polymérisation radicalaire qui est la méthode la plus utilisée pour la synthèse des monolithes organiques [145, 147], fait intervenir les radicaux comme espèces réactives. Elle peut se découper en trois phases distinctes : l'initiation, la propagation et la terminaison.

I.4.2.1. L'initiation

Cette étape d'initiation désigne la réaction au cours de laquelle un monomère M est transformé en centre actif M^* à partir d'un radical libre. La formation d'un radical libre nécessite la présence d'un photoinitiateur et d'un apport énergétique apporté par le rayonnement UV. Ce photoinitiateur passe d'un état fondamental à un état excité singulet de plus grande énergie par l'absorption d'un photon UV [193]. Ensuite, il y a passage de cet état singulet (spins opposés) vers un état triplet (spins parallèles) plus stable par conversion inter-système (ISC). A ce stade-là, deux mécanismes peuvent intervenir suivant la nature du photoinitiateur radicalaire :

- ✓ les photoinitiateurs de type I à base de benzoin éther ou de composés azo subissent une coupure homolytique sous rayonnement UV avec formation de deux fragments radicalaires (**Figure I.58**) [194, 195]. Dans le cas des photoinitiateurs de type benzoin éther, le radical benzoyle possède une grande réactivité envers les monomères vinyliques et acryliques.

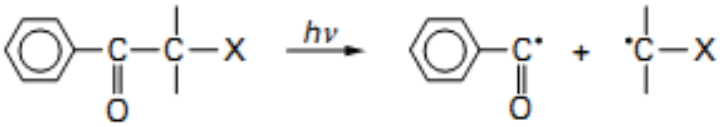


Figure I.58 : Mécanisme photochimique d'un photoinitiateur de type I à base de benzoin éther [194, 195].

- ✓ les photoinitiateurs de type II tels que la benzophénone ou la thioxanthone sont des cétones aromatiques qui ne subissent pas de fragmentation mais abstraient un hydrogène sur une molécule donneur d'hydrogène avec formation d'un radical cétyle et du radical alkyle du donneur (**Figure I.59**) [187]. Le radical alkyl amorce ensuite la polymérisation tandis que le radical cetyl se recombine pour former le composé pinacol. Ces photoinitiateurs sont généralement associés à des amines tertiaires ayant des hydrogènes tertiaires très labiles (coamorceurs) pour créer des polymères [196]. Le mécanisme photochimique de ce type de photoinitiateur est détaillé dans la partie I.5.

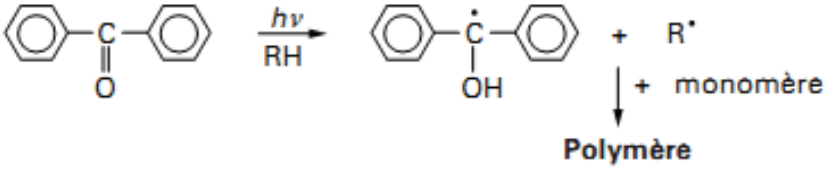


Figure I.59 : Mécanismes généraux des photoinitiateurs de type I

En l'absence de monomères, le photoinitiateur à l'état singulet retourne à l'état fondamental par conversion interne. Le photoinitiateur à l'état triplet peut être désactivé au contact de la molécule de dioxygène présente dans l'air [197].

Les photoinitiateurs de type I sont les plus utilisés pour la synthèse des monolithes organiques en capillaire et en microsystème [198, 199] contrairement aux photoinitiateurs de type II où aucune publication n'est référencée.

Les radicaux libres, espèces instables, ont une durée de vie très courte et sont susceptibles de réagir rapidement pour former une chaine macromoléculaire avant de se recombiner ou de se transformer. L'étape d'initiation suppose dans le cas d'un photoinitiateur de type I, deux réactions :

- une réaction de dissociation correspondant à la décomposition homolytique de l'initiateur I :

$$I \xrightarrow{k_d} 2R^{\bullet} \quad \textbf{(I.26)}$$

- une réaction d'initiation avec transfert du site actif sur un monomère M :

$$R^{\bullet} + M \xrightarrow{k_a} R{-}M \quad \textbf{(I.27)}$$

Comme réaction secondaire, on peut avoir la combinaison de deux radicaux :

$$R^{\bullet} + R^{\bullet} \xrightarrow{k_c} R{-}R \quad \textbf{(I.28)}$$

k_d, k_a et k_c sont les constantes cinétiques respectivement de la dissociation, l'initiation et la combinaison.

Les équations cinétiques sont établies en considérant que les différentes réactions, impliquées dans le processus de polymérisation radicalaire, sont du premier ordre pour chacune des espèces réactives.

L'équation générale de la vitesse d'initiation prend en compte les caractéristiques du rayonnement UV incident. Ainsi, la vitesse d'initiation R_i est donnée par la relation suivante [200-202]:

$$\boldsymbol{R_i = 2\emptyset_a P_a = 2\emptyset_a P\left[1 - exp^{-2.3\mathrm{A_{bs}}}\right]} \quad \textbf{(I.29)}$$

où P est l'intensité de la lumière incidente, P_a l'intensité du rayonnement adsorbé, $\emptyset_a$ le rendement quantique des espèces amorceuses et $\mathrm{A_{bs}}$ l'absorbance de l'échantillon.

Dans l'équation **I.29**, le facteur 2 ne s'applique que pour les photoinitiateurs se décomposant en deux radicaux. En revanche, s'il n'y a qu'un seul radical de formé par le photoinitiateur, il faut appliquer un facteur égal à 1.

L'absorbance $\mathrm{A_{bs}}$ dépend de la concentration [I] en photoinitiateur, du coefficient d'extinction molaire ϵ du photoinitiateur ainsi que de l'épaisseur l de l'échantillon irradié :

$$\mathrm{A_{bs}} = \epsilon l[I] \quad \textbf{(I.30)}$$

Ainsi, pour être efficace et induire des vitesses d'initiation rapide, un photoinitiateur doit satisfaire à un certain nombre de critères :

- ✓ présenter une absorption maximale à la longueur d'onde d'émission de la source lumineuse.
- ✓ présenter un rendement quantique élevé pour produire un maximum de radicaux par photon absorbé.
- ✓ présenter un coefficient d'extinction molaire élevé.
- ✓ présenter une capacité à résister à la désactivation par l'oxygène moléculaire.

L'azobisisobutyronitrile (AIBN) et la benzoin méthyl éther (BME) sont les photoinitiateurs de type I les plus utilisés pour la synthèse des monolithes organiques en capillaire et en microsystème [198, 199, 203]. Leurs mécanismes de dissociation ont été très étudiés sous rayonnement UV (**Figure I.60**) [195, 204]. La BME génère un radical benzoyl très réactif avec les monomères et un radical α-alkoxybenzyl intervenant seulement dans les réactions de terminaison. L'AIBN produit deux radicaux cyanopropyl avec libération d'une molécule de diazote sous l'effet de la lumière mais également sous l'effet de la température [195].

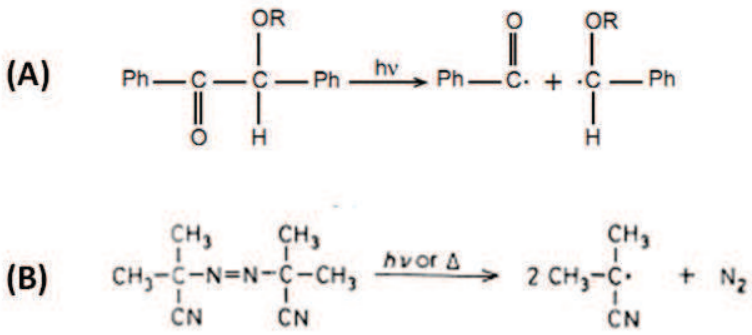


Figure I.60 : Mécanisme de dissociation (A) de la BME avec R=CH3 et (B) de l'AIBN [195, 204].

L'AIBN et la BME ont également des propriétés photochimiques différentes résumées dans le **Tableau I.7** [205, 206]. Ainsi, la BME possède des valeurs élevées de ϵ et $\emptyset_a$ et induit donc des vitesses d'initiation plus importantes d'après les équations I.34 et I.35. D'une manière générale, il a été observé que les temps de synthèse des monolithes organiques sont plus rapides avec la BME qu'avec l'AIBN. De plus, la BME présente l'avantage d'être relativement inerte face à l'inhibition générée par la molécule de dioxygène [205].

Tableau I.7 : Caractéristiques photochimiques des deux photoinitiateurs les plus utilisés pour la synthèse des monolithes organiques [205, 206].

Photoinitiateurs	λ_{max} (nm)	ϵ_{max} ($M^{-1}.cm^{-1}$)	$\emptyset_a$
AIBN	360	11.9	0.5
BME	341	215	1.48

I.4.2.1. La propagation

Cette étape de propagation correspond à l'addition successive de monomères sur la chaîne de polymère en croissance. Elle est classiquement appelée réaction de transfert car c'est une réaction qui termine une macromolécule sans arrêt de la chaine cinétique. Cette phase est plus rapide que l'étape d'initiation et nécessite une énergie d'activation beaucoup plus faible. La croissance d'un radical monomère $M^{\bullet}$ induit la formation d'un radical de même nature mais avec une chaine plus longue d'une unité à chaque addition.

$$RM^{\bullet} + M \xrightarrow{k_p} RMM^{\bullet} \quad \textbf{(I.31)}$$

Cela implique que l'espèce formée par la réaction de transfert soit suffisamment réactive pour amorcer la croissance d'une nouvelle macromolécule. La vitesse de propagation R_{pr} peut être définie comme :

$$R_{pr} = k_p[M^{\bullet}][M] \quad \textbf{(I.32)}$$

où k_p est la constante de vitesse de propagation qui est considérée comme quasi indépendante du degré de polymérisation. Une des réactions caractéristiques des radicaux libres est la réaction d'addition sur une double liaison. Elle correspond à une variation négative de l'entropie (**Figure I.61A**). Ainsi, une réversibilité de cette réaction peut être envisagée par une élévation de la température, processus qui engendre une élimination qui redonne le radical libre et la double liaison. Ces radicaux libres formés en bout de chaîne peuvent réticulés avec d'autres doubles liaisons présentes soit sur la même chaine (intramoléculaire), soit sur un monomère gravitant autour du polymère en formation (intermoléculaire) (**Figure I.61B**). Ces réactions de transfert inter- et intramoléculaire conduisent à des ramifications plus ou moins longues.

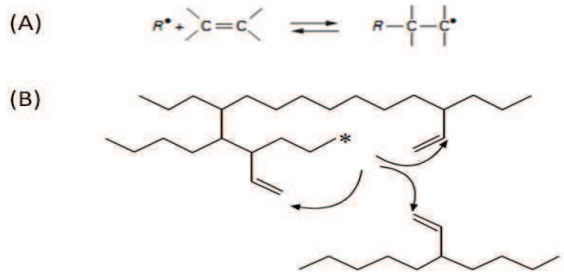


Figure I.61 : Phase de propagation (A) sur une double liaison et (B) dans un polymère en formation.

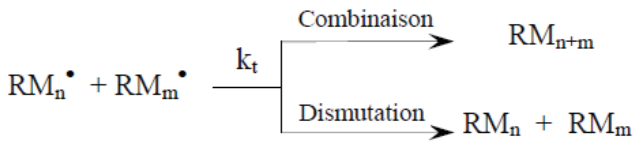
I.4.2.3. La terminaison

Les réactions de terminaison correspondent à la fin de la réaction de polymérisation. Une disparition simultanée de deux radicaux libres peut se produire par deux mécanismes :

- ✓ mécanisme de combinaison : deux radicaux se recombinent pour former une liaison covalente.

- ✓ mécanisme de dismutation : transfert d'hydrogène suivi d'une recombinaison entre les deux radicaux.

Ces deux réactions peuvent intervenir simultanément dans l'étape de terminaison. La constante de vitesse de la terminaison k_t correspond donc à la somme des constantes de vitesse de combinaison k_{tc} et de dismutation k_{td} ($k_t = k_{tc} + k_{td}$).



(I.33)

La vitesse de terminaison R_t s'exprime par :

$$R_t = 2k_t[M^\bullet]^2 \quad \textbf{(I.34)}$$

I.4.2.4. Vitesse de photopolymérisation en chaîne par voie radicalaire

La vitesse de photopolymérisation R_p correspond à la vitesse de disparition des monomères lors de l'ensemble du processus de polymérisation [207, 208]. Cette vitesse dépend donc des vitesses d'initiation R_i et de propagation R_{pr} puisque ces deux étapes consomment des monomères, d'après les équations (**I.29**) et (**I.32**).

$$R_p = -\frac{d[M]}{dt} = R_i + R_{pr} = 2\emptyset_a P_a + k_p[M^\bullet][M] \quad \textbf{(I.40)}$$

R_i est très petit par rapport à R_{pr} car le nombre de monomères réagissant lors de l'initiation est très faible comparé à celui de l'étape de propagation. On peut donc négliger R_i dans l'équation de la vitesse de polymérisation. D'où :

$$R_p = k_p[M^\bullet][M] \quad \textbf{(I.41)}$$

Cependant, la concentration en radicaux est supposée atteindre rapidement une valeur constante (régime stationnaire), ce qui engendre une vitesse d'initiation R_i égale à la vitesse de terminaisonR_t. D'après les équations (**I.29**) et (**I.34**). On peut donc écrire :

$$2\emptyset_a P_a = 2k_t[M^\bullet]^2 \quad \textbf{(I.42)}$$

$$\text{d'où } [M^\bullet] = \left(\frac{\emptyset_a P_a}{k_t}\right)^{1/2} \quad \textbf{(I.43)}$$

En combinant les équations (**I.41**) et (**I.43**), la vitesse de photopolymérisation peut s'écrire :

$$R_p = k_p[M]\left(\frac{\emptyset_a P_a}{k_t}\right)^{1/2} \quad \textbf{(I.44)}$$

A partir de l'expression de P_a de l'équation **I.29**, l'équation générale de la vitesse de photopolymérisation s'écrit :

$$\mathbf{R_p = \frac{k_p}{k_t^{1/2}}[M]\left(\emptyset_a P\left[1 - \exp^{-2.3\epsilon l[I]}\right]\right)^{1/2}} \quad \textbf{(I.45)}$$

La vitesse de photopolymérisation dépend donc :

- ✓ de la nature et de la concentration [M] des monomères à travers les constantes de vitesse k_p et k_t [186]. Par exemple, la réactivité des acrylates est plus élevée que celle des méthacrylates [202, 209].
- ✓ de la nature des porogènes à travers k_p et k_t. En effet, la variation de la viscosité du milieu affecte ces deux constantes cinétiques [210].
- ✓ de la nature du photoinitiateur à travers le rendement quantique $\emptyset_a$ et le coefficient d'extinction molaire ϵ [207, 210, 211] et de sa concentration [I]. Comme indiqué précédemment, la BME permet d'induire des vitesses de polymérisation plus élevées qu'avec l'AIBN.
- ✓ des conditions d'irradiation à travers l'intensité P du rayonnement incident et la longueur d'onde λ reliée indirectement à l'absorbance et $\emptyset_a$ du photoinitiateur et [202, 209, 211].

La vitesse de polymérisation évolue au cours de la réaction à cause de la consommation du monomère et du photoinitiateur et de l'augmentation de la viscosité du milieu qui affecte les valeurs de k_p et k_t. On distingue 3 étapes successives dans cette évolution (**Figure I.62**) [210] :

- ✓ Etape 1 : une augmentation rapide de R_p est observée correspondant à une augmentation de la concentration en radicaux induisant une augmentation de la viscosité (k_p et k_t diminuent).
- ✓ Etape 2 : la vitesse de polymérisation se stabilise progressivement à cause d'une prise en masse du système qui réduit la mobilité des espèces réactives.
- ✓ Etape 3 : un ralentissement de R_p est enfin observé résultant de la consommation du monomère et du photoinitiateur ainsi que d'une mobilité des espèces réactives quasi-nulle.

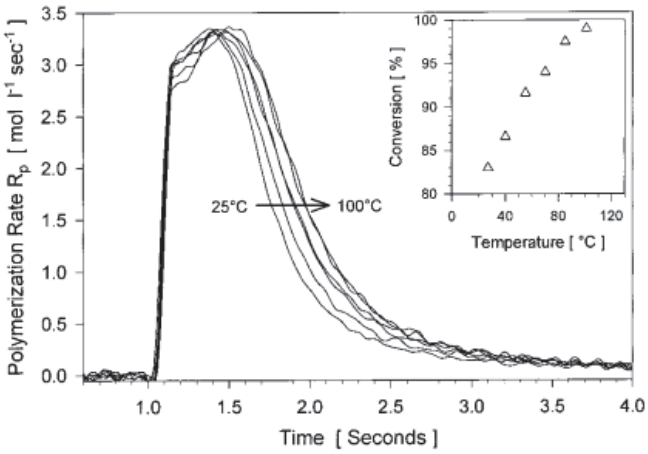


Figure I.62 : Evolution de la vitesse de photopolymérisation en fonction du temps [210].

Ces réactions ultrarapides sont analysées par spectroscopie infrarouge résolue dans le temps (RTIR) afin de déterminer les paramètres cinétiques fondamentaux [202, 209] : vitesse de polymérisation, constante de vitesse de propagation k_p et de terminaison k_t. La spectroscopie RTIR consiste à exposer l'échantillon simultanément à un faisceau UV qui amorce la polymérisation et à un faisceau d'analyse infra-rouge (IR) pour suivre en continu la décroissance de l'absorbance de la fonction réactive (fonction acrylate à 812 cm^{-1}). La courbe absorbance en fonction du temps enregistrée montre l'évolution du taux de conversion DC du monomère dans le polymère.

Ce taux ou degré de conversion est défini comme étant le rapport de la masse de monomère incorporé dans le polymère sur la masse totale initiale (avant polymérisation) en monomères. L'intégration de l'expression de la vitesse de photopolymérisation R_p (équation **(I.45)**) en fonction du temps permet d'obtenir l'équation du degré de conversion, qui s'écrit :

$$DC = \int_o^t R_p dt = \int_o^t -\frac{d[M]}{dt} dt = \mathbf{1} - \boldsymbol{exp}\left(-\frac{\mathbf{k_p}}{\mathbf{k_t}^{1/2}}(\emptyset_\mathbf{a}\mathbf{P})^{\mathbf{1/2}}\mathbf{t}\right) \quad \textbf{(I.46)}$$

Comme pour la vitesse de photopolymérisation R_p (équation (**I.45**), le degré de conversion dépend donc de la nature et de la concentration [M] des monomères, de la nature et la concentration [I] du photoinitiateur et des conditions d'irradiation. Cependant, l'expression de DC prend également en compte le temps de photopolymérisation.

L'importance de la nature du monomère sur le taux de conversion est clairement montrée sur la **Figure I.63** [202]. Parmi tous les monomères utilisés (acrylate, vinyl ether, cycloépoxide, méthacrylate, glycidyl éther), les monomères acrylates présentent la plus forte réactivité et le taux de conversion de 100 % est rapidement atteint.

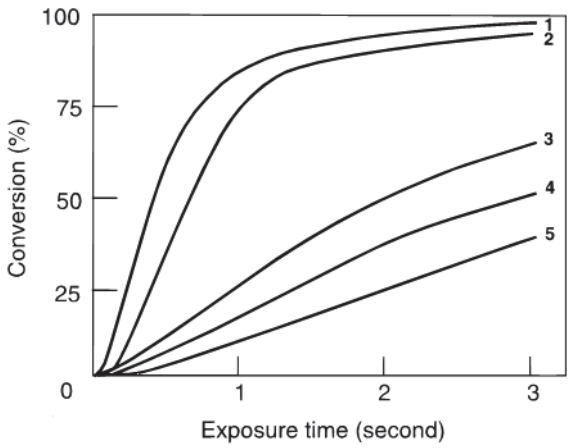


Figure I.63 : Evolution du taux de conversion en fonction du temps pour différents monomères utilisés. (1) acrylate, (2) vinyl éther, (3) cycloépoxide, (4) méthacrylate et (5) glycidyl éther [202].

Les méthacrylates présentent une réactivité beaucoup plus faible que les acrylates bien qu'ils présentent des structures semblables. La faible valeur de la constante de vitesse de propagation k_p du monomère méthacrylate par rapport à l'acrylate permet d'expliquer cette différence.

I.4.3. Description de la polymérisation radicalaire d'un point de vue « pratique »

La description théorique de la polymérisation radicalaire permet de mettre en évidence les principaux paramètres intervenants dans la synthèse des monolithes organiques photopolymérisés. Les équations de la vitesse de polymérisation et du degré de conversion **I.45** et **I.46** suggèrent qu'il y a 4 facteurs indépendants intervenant dans le processus de photopolymérisation (**Figure I.64**).

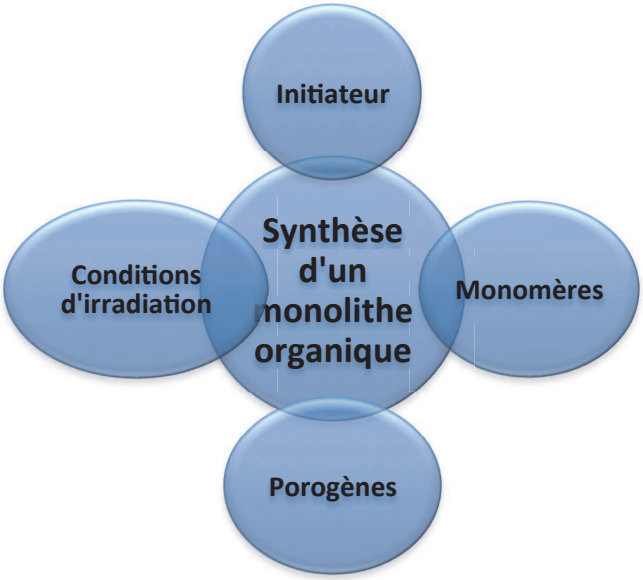


Figure I.64 : Facteurs influençant sur la photopolymérisation des monolithes organiques.

Sous des **conditions d'irradiation** bien précises, l'**initiateur** se décompose en radicaux qui déclenchent alors le processus de polymérisation en solution via la présence de **monomères** monovinyliques ou divinyliques. Lorsque les polymères en croissance deviennent insolubles en solution à cause de leur réticulation, ils précipitent. Cette précipitation dépend fortement du choix des **porogènes** présents en solution. Les espèces insolubles précipitées, appelées nucléi, se saturent en monomères présents dans la phase liquide environnante. Par conséquent, la polymérisation se poursuit à la fois en solution et dans les nuclei qui forment alors des nodules dont la taille augmente progressivement. Ensuite, ces nodules se relient entre eux par des chaînes de polymère lors de réactions de réticulation. Ces assemblages restent dispersés dans la phase liquide jusqu'à ce que leur taille et leur nombre soient suffisants pour qu'ils s'aggrègent pour former une matrice interconnectée de type monolithe [212, 213].

Svec *et al.* ont mis en évidence l'importance des proportions de chaque constituant du mélange réactionnel sur les caractéristiques poreuses du monolithe [212, 213]. La porosimétrie au mercure, les mesures de surfaces spécifiques par BET et la microscopie électronique à balayage (MEB) permettent de rendre compte de la structure poreuse du monolithe ainsi formé [212-214] tandis que l'analyse de solutés tests par électrochromatographie permet d'observer l'effet de la structure poreuse du monolithe sur les performances séparatives.

⇨ Effet de l'initiateur :

Une concentration minimale en photoinitiateur est nécessaire pour amorcer la photopolymérisation des monolithes organiques. Les conditions d'illumination doivent être, elles aussi, adaptées au type d'initiateur choisi. Il faut ainsi utiliser la bonne intensité lumineuse et une longueur d'onde d'illumination adaptée pour permettre un clivage photolytique optimal du photoinitiateur [210].

L'impact de la concentration des photoinitiateurs sur la structure et les performances séparatives du monolithe a été étudié par Bernabé-Zafon *et al.* [203]. L'augmentation de la concentration en photoinitiateur augmente la vitesse de polymérisation ainsi que le nombre de radicaux formés. La concentration de monomères présents autour de ces radicaux devient plus faible et entraîne la formation d'une structure monolithique présentant un grand nombre de globules de petites tailles, entraînant une amélioration de l'efficacité. La surface spécifique augmente ainsi que la rétention (**Tableau I.8**).

Tableau I.8 : Influence de la concentration en AIBN sur les performances séparatives [203].

Intiateur (wt%)	u (mm/s)	$k_{anthracène}$	H_{min} anthracène (µm)
0.05	0.24	0.7	14.7
0.15	0.20	0.9	14.7
0.3	0.32	1.32	11.2
0.6	0.30	1.29	10.9
0.8	0.26	0.97	15.1

Néanmoins, une concentration trop importante en photoinitiateur (> 0.6 % en poids dans cet exemple) peut entraîner une diminution de la rétention ainsi qu'une dégradation de l'efficacité. En effet, l'augmentation de la concentration en photoinitiateur entraîne une augmentation du nombre de réactions de terminaison. La quantité de monomères réagissant à la surface des nucléi diminue, générant une densité de chaines alkyl présentes dans la structure du monolithe de moins en moins importante. Une diminution de la rétention des solutés est donc très rapidement observée. De plus, une hétérogénéité locale de la structure aux extrémités des globules est observée, ce qui peut être responsable de la dégradation de l'efficacité [215].

Les photoinitiateurs, à forte concentration, peuvent absorber totalement le rayonnement UV incident nécessaire à la photopolymérisation. Cet effet « écran » modifie les conditions de polymérisation et peut entraîner une dégradation des performances séparatives du monolithe [203, 207]. Les radicaux formés sont ainsi localisés dans une zone étroite près de la surface du canal de séparation. Comme les radicaux ne sont pas répartis de façon homogène dans tout le volume du canal, il en résulte une structure monolithique hétérogène présentant une surface spécifique peu importante.

Dans cette même étude [203], Bernabé-Zafon *et al.* ont comparé l'effet de 4 photoinitiateurs (AIBN, DMPA, BPO, LPO) sur la synthèse de monolithes organiques à base de lauryl méthacrylate. Ils ont ainsi observé que l'ajustement de la concentration du photoinitiateur est nécessaire en fonction de leurs propriétés photochimiques afin d'obtenir des performances séparatives similaires. Ainsi, dans les conditions optimales de synthèse, la nature des photoinitiateurs n'a pas d'impact sur les efficacités et très peu sur les rétentions (**Tableau I.9**).

Tableau I.9 : Ajustement de la concentration en photoinitiateur pour l'obtention de performances séparatives similaires [203].

Intiateur	Intiateur (wt%)	$k_{anthracène}$	H_{min} anthracène (µm)
AIBN	0.3	1.32	11.2
DMPA	0.05	1.06	10.5
BPO	0.05	0.88	11.6
LPO	0.3	1.12	10.2

⇨ Effets des porogènes :

L'effet de la proportion des porogènes sur la structure poreuse et sur les performances séparatives a été largement étudié [175, 216-219]. Généralement, deux porogènes possédant des propriétés chimiques différentes sont introduits dans la composition du mélange de polymérisation. Un porogène joue le rôle de bon solvant tandis que le deuxième porogène est défini comme étant le mauvais solvant. Ainsi, la cinétique de précipitation des nucléi et donc la cinétique de polymérisation est contrôlée par la proportion de ces porogènes. En effet, à chaque instant, il y a une compétition sur la solubilité des monomères et chaines polymériques en croissance entre deux milieux : les nucléi et les porogènes. Si la teneur en bon solvant augmente, les monomères se solubilisent plus facilement dans le bon solvant que dans les nuclei et la concentration en monomères autour de ces nucléi devient de moins en moins importante. La taille des nucléi devient alors plus restreinte. Il en résulte la formation d'une structure monolithique contenant un grand nombre de petits globules et des tailles de pores très petites.

A contrario, l'augmentation de la teneur en mauvais solvant améliore la solubilité des monomères dans les nucléi. La concentration locale de monomères autour de ces espèces insaturées augmente, entraînant la formation d'un monolithe constitué de plus gros globules et de tailles de pores plus importantes. Il est ainsi possible de contrôler la distribution poreuse d'une phase stationnaire monolithique par simple modification du rapport des porogènes. Fréchet *et al.* ont utilisé cette technique pour contrôler la taille des pores d'un monolithe méthacrylate photopolymérisé dans un microsystème en verre (**Figure I.65**) [175]. L'étude réalisée par porosimétrie au mercure permet de montrer que l'augmentation du pourcentage en 1-propanol induit des diamètres de pores plus petits. Le porogène 1-propanol est donc dans ce cas-là le bon solvant du mélange réactionnel.

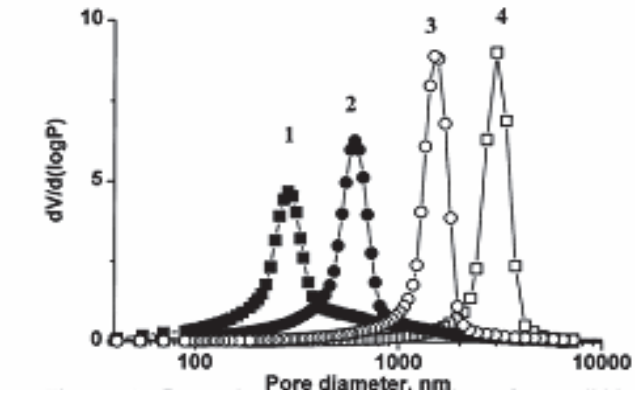


Figure I.65 : Profils de distribution de la taille des pores obtenus sur des colonnes monolithiques photopolymérisées à base de butylacrylate et d'éthylène diméthacrylate en fonction de la composition en solvants dans le mélange réactionnel. Les porogènes utilisés sont le 1-propanol et le 1.4-butanediol. Pourcentage en 1-propanol : (1) 80%, (2) 78%, (3) 76%, (4) 74% [175].

Ces mêmes auteurs ont également montré que la distribution poreuse du monolithe impactait directement la perméabilité du monolithe. En effet, une structure monolithique peu dense contenant un grand nombre de macropores facilite l'écoulement de la phase mobile dans le canal de séparation sous flux hydrodynamique. Une étude MEB réalisée par Hasegawa confirme cette idée en montrant l'influence de la proportion en bon solvant, en l'occurrence le PEO, sur la densité de la structure monolithique organique (**Figure I.66**) [217]. La macroporosité du monolithe acrylate devient de plus en plus importante quand le pourcentage de PEO augmente.

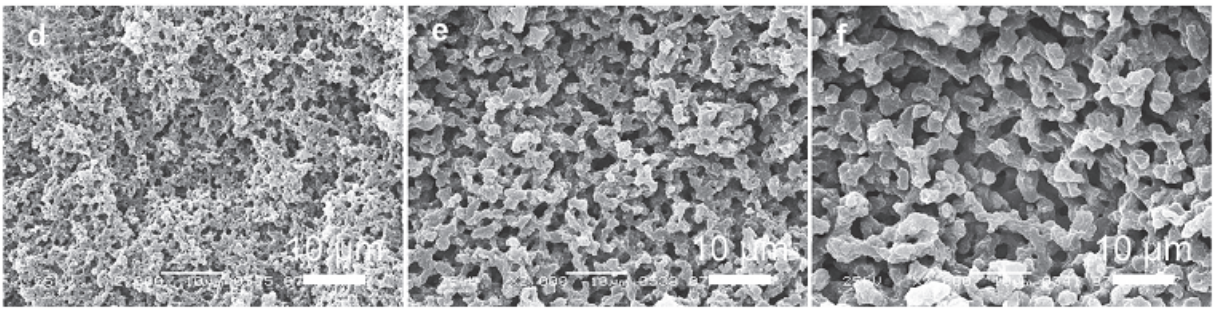


Figure I.66 : Images MEB de plusieurs monolithes acrylates préparés à partir de différentes proportions en bon solvant (PEO). Masse en PEO : (d) 0.03 g, (e) 0.04 g, (f) 0.05 g.

En électrochromatographie, d'après l'équation (I.5), la mobilité électroosmotique n'est pas reliée directement à la taille des pores. Cependant, un recouvrement de la double couche électrique peut apparaître dans le cas d'un monolithe comportant des pores de petites tailles et induire une diminution de la mobilité électroosmotique [175].

Jiang *et al.* ont étudié l'influence de la proportion en porogènes sur les efficacités et la rétention [219]. Lorsque la taille des globules devient de plus en plus petite du fait de l'augmentation de la teneur en bon solvant, une amélioration de la surface spécifique et de l'efficacité est observée. Une

augmentation de la rétention est également observée du fait de la formation d'une structure monolithique très dense et très hydrophobe.

⇨ Effets des monomères :

Comme pour les porogènes, deux monomères sont généralement ajoutés dans le mélange de polymérisation : un monomère fonctionnel définissant les propriétés rétentives du monolithe et un agent réticulant qui possède deux fonctions vinyles permettant de faire le lien entre deux branches de polymère.

Le type de monomères fonctionnels mis en jeu dans le processus de polymérisation a un impact sur la structure poreuse et les performances séparatives du monolithe [220, 221]. En effet, le **tableau I.10** montre que la surface spécifique ainsi que le diamètre des nodules dépendent fortement de la longueur de la chaine alkyl du monomère fonctionnel [220]. Cette variation des propriétés morphologiques du monolithe a une incidence directe sur les performances séparatives. Ainsi, l'efficacité devient de plus en plus importante quand la surface spécifique augmente tandis que la rétention augmente avec la longueur de la chaine alkyl du monolithe.

Tableau I.10 : Effet de la nature des monomères sur les structures poreuses et les performances séparatives du monolithe [220].

Monomères acrylate	Efficacités (plateaux/mètres)	$k_{fluoranthène}$	Surface spécifique (m^2/g)	Diamètre des nodules (µm)
ethyl	170 000	5.68	1.42	1.1
butyl	220 000	5.44	2.66	1.1
hexyl	200 000	5.77	1.09	0.7
lauryl	200 000	6.21	2.18	1.0

Les variations du pourcentage d'agent réticulant par rapport aux monomères provoquent à la fois des effets sur la porosité et sur les proportions des fonctionnalités chimiques du polymère [199, 222]. Pour une concentration totale en monomères maintenue constante, l'augmentation de la proportion en agent réticulant entraîne la formation de nucléi très réticulé présentant une quantité moins importante de monomère fonctionnel. Comme la concentration en monomères fonctionnels autour de ces nucléi est très faible et que ces mêmes nucléi contiennent un nombre très faible de monomères vinyliques à leurs surfaces, la taille finale des globules interconnectés reste relativement faible.

D'un point de vue séparatif, l'augmentation de la proportion en agent réticulant se traduit par la formation d'un monolithe ayant des rétentions de plus en plus faibles car les globules interconnectés contiennent une quantité plus faible en monomères fonctionnels [199]. De plus, le rapport des proportions du monomère fonctionnel sur l'agent réticulant a une influence sur l'homogénéité de la

phase stationnaire. Plus la structure du monolithe est homogène et plus les hauteurs de plateaux théoriques sont faibles. Cantó-Mirapeix *et al.* ont synthétisé un monolithe organique à partir du butyl acrylate (BA) qui est le monomère fonctionnel et du 1.3-butanediol diacrylate (BDDA) qui est l'agent réticulant. La variation du rapport massique BA/BDDA entraine la variation de la morphologie du monolithe, ce qui modifie les performances séparatives de la phase stationnaire (**Tableau I.11**).

Tableau I.11 : Effet de la proportion en agent réticulant sur les performances séparatives du monolithe à base de butyl acrylate (BA) et 1.3-butanediol diacrylate (BDDA) [199].

BA/BDDA (wt/wt)	u (mm/s)	$k_{pyrène}$	H_{min} pyrène (µm)
80/20	1.98	3.52	7.6
70/30	1.99	2.3	5.1
60/40	2.06	1.92	11.3
50/50	1.92	1.55	10.7
40/60	1.92	0.81	11.4

⇨ Influence du rapport entre les monomères et les porogènes :

L'ajustement de la proportion en porogènes par rapport aux monomères permet également de contrôler la distribution poreuse du monolithe [219]. Ainsi, une diminution de la teneur en porogènes présents dans le mélange réactionnel induit une diminution du volume poreux total et un déplacement du maximum de la distribution de la taille des pores vers des valeurs plus faibles. Comme nous l'avons remarqué précédemment, une diminution de la taille des pores peut induire une augmentation des efficacités et de la rétention ainsi qu'une diminution de la mobilité électroosmotique.

⇨ Effets du monomère chargé :

L'introduction d'un monomère chargé dans la composition du mélange de polymérisation est nécessaire afin de générer un flux électroosmotique dans le canal de séparation. La mobilité électroosmotique est directement proportionnelle à la densité de charge de surface (équation **I.5**). Le nombre de groupements chargés à la surface du monolithe, introduits via le monomère chargé, a donc un impact sur le flux électroosmotique. Ainsi, une augmentation de la proportion de monomère chargé induit une augmentation de la mobilité électroosmotique et donc une réduction des temps d'analyse. Eeltink *et al.* ont réussi à multiplier par 12 la mobilité électroosmotique en augmentant d'un facteur 7 la proportion en monomère chargé META [216].

Cependant, l'augmentation du pourcentage en monomère chargé peut augmenter le diamètre des pores ainsi que la taille des globules [223]. En effet, la concentration de monomères autour des nucléi augmente du fait de l'augmentation croissante de la quantité en monomère chargé dans la

composition du mélange de polymérisation. La structure poreuse ainsi que les performances séparatives du monolithe s'en trouvent affectées.

Eeltink *et al.* ont observé que l'augmentation de la proportion en monomère fonctionnel peut améliorer la mobilité électroosmotique même si la teneur en monomère chargé est maintenue constante [216]. Ce phénomène observé peut être expliqué par des différences de réactivités des monomères mis en jeu dans la synthèse du monolithe. Les monomères de butyl acrylate possèdent une réactivité très importante et ont une tendance à réagir entre elles (homopolymérisation) lorsque leur concentration augmente dans la composition du mélange de polymérisation. Il y a donc une quantité moins importante de butyl acrylate autour des nucléi. Le monomère chargé META possède quant à lui une réactivité beaucoup plus faible et sa concentration autour des nucléi augmente du fait de la disparition du monomère fonctionnel par des réactions d'homopolymérisation. L'incorporation de monomère chargé dans la structure monolithique augmente donc générant une mobilité électroosmotique plus importante.

Pour résumer, la fabrication d'une phase stationnaire monolithique organique permettant d'obtenir des performances séparatives satisfaisantes requiert une mise au point minutieuse de la composition du mélange réactionnel. La substitution d'un réactif par un autre réactif dans la composition du mélange réactionnel peut fortement perturber les conditions de polymérisation. Dans ce cas, il est nécessaire de réoptimiser le mélange de polymérisation, ce qui est long, coûteux et sans succès garanti.

⇨ Effets des conditions d'irradiation :

L'optimisation des conditions d'irradiation permet de contrôler la morphologie du monolithe sans modifier la composition du mélange de polymérisation [96, 144, 221, 224-226]. Les conditions d'irradiation peuvent être définies par 3 paramètres :

- **La longueur d'onde d'irradiation λ** : elle doit correspondre au maximum d'absorption du photoinitiateur utilisé afin de générer les radicaux indispensables au processus de polymérisation [201]. Elle est généralement définie à 365 nm pour la BME et 254 nm pour l'AIBN.

- **Le temps de polymérisation t** : cette grandeur fixe l'énergie W d'irradiation d'après la relation suivante :

$$W = Pt \quad \textbf{(I.47)}$$

où P représente la puissance d'irradiation reçue par unité de surface (appelé aussi intensité lumineuse). Il a été démontré qu'à P constant le temps de polymérisation a une influence sur la structure poreuse du monolithe et donc sur les performances séparatives du monolithe [96, 144, 221, 224]. Il existe un temps d'irradiation minimal nécessaire à la conversion des monomères (**équation I.46**) et donc à la formation du monolithe. Ce temps dépend de la nature du photoinitiateur, des monomères et des porogènes mis en jeu dans la synthèse. Un temps

d'irradiation trop long peut dégrader le monolithe sous l'effet des rayonnements UV en formant des trous dans sa structure et donc altérer ses performances électrochromatographiques (**Figure I.67**) [144]. Augustin *et al.* ont remarqué que la morphologie du monolithe ne varie pas dans la zone de temps (ou d'énergie pour P constant) comprise entre le temps de polymérisation minimal nécessaire à la formation du monolithe et le temps d'irradiation où le monolithe commence à se dégrader sous l'effet des rayonnements UV [144]. Cette zone optimale de synthèse du monolithe doit être paramétrée pour chaque mélange de polymérisation.

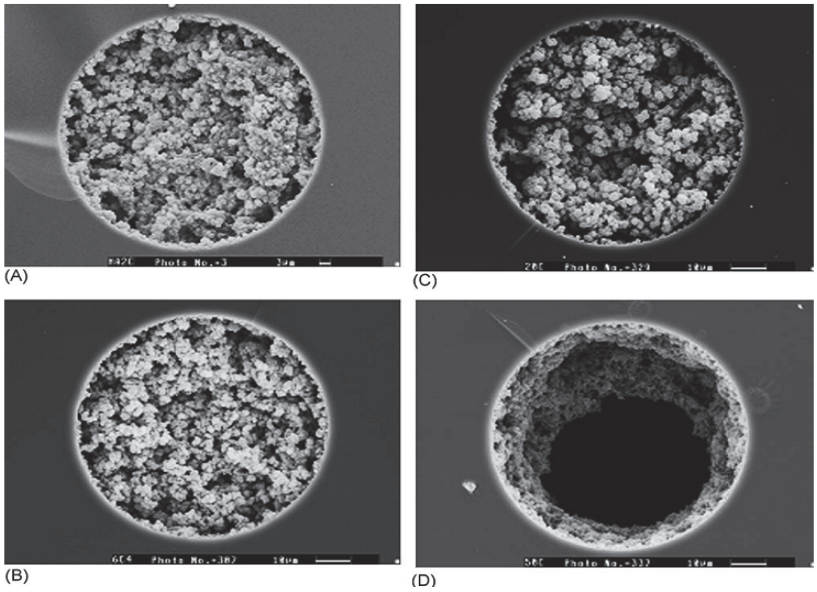


Figure I.67 : Images MEB d'un monolithe acrylate synthétisé dans un capillaire à différentes énergies d'irradiation (=temps de polymérisation). (A) 2 J/cm^2, (B) 6 J/cm^2, (C) 20 J/cm^2, (D) 50 J/cm^2 [144].

Les travaux de Nischang ont permis de faire le lien entre le temps de polymérisation et la porosité du monolithe [198, 215]. Il a remarqué que le nombre de mésopores diminue progressivement quand la durée de polymérisation augmente, du fait de la présence de monomères résiduels dans la phase liquide environnante autour des nucléi. Cette disparition des mésopores s'accompagnent de la formation de micropores. La porosité totale du monolithe diminue donc progressivement au fur et à mesure que le temps de polymérisation augmente, ce qui entraîne une augmentation de la rétention des solutés ainsi qu'une diminution de la perméabilité. Nishang *et al.* ont également montré que l'homogénéité de la phase stationnaire monolithique est dépendante du temps de polymérisation. En effet, un temps de polymérisation long peut entrainer une inhomogénéité dans la distribution des pores (micropores et mésopores) sur un même globule. De plus, la réticulation des globules devient de plus en plus importante au fur et à mesure que le temps de polymérisation augmente, entraînant l'apparition de volume stagnante de phase mobile autour des globules. Ceci a pour effet d'engendrer des hauteurs de plateaux théoriques plus grandes et des transferts de masse plus lents (**Figure I.68**).

Bien que les études réalisées par Nishang sur l'influence du temps de polymérisation sur la structure du monolithe aient été réalisées par voie thermique, ces résultats peuvent être transposés pour la synthèse des monolithes par voie photochimique.

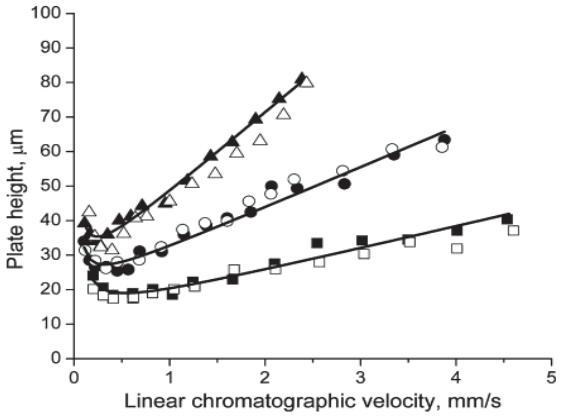


Figure I.68 : Influence du temps de polymérisation sur les courbes de va Deemter obtenue sur un monolithe méthacrylate synthétisé par voie thermique en capillaire. Phase mobile : ACN/H_2O 70/30 (%v). Symboles : 3h (carré), 6h (rond), 9h (triangle) [215].

L'influence de l'intensité P sur la synthèse du monolithe a été succinctement évaluée en capillaire par Eeltink [216]. L'augmentation de P augmente le nombre de réactions d'initiation (équation **I.29**) entraînant la formation d'un grand nombre de nucléi. Ces nucléi s'agglomèrent ensuite pour former des globules de plus grandes tailles. Malheureusement, le monolithe ainsi formé n'a pas été étudié pour la séparation de solutés par électrochromatographie.

Il convient de souligner que l'augmentation de l'intensité lumineuse provoque non seulement une augmentation de la vitesse de polymérisation, mais également celle du taux de conversion final (d'après les équations **I.45** et **I.46**). Une conversion des monomères plus rapide et plus importante est observée lorsque l'intensité du rayonnement lumineux augmente, modifiant la morphologie du monolithe (**Figure I.69**).

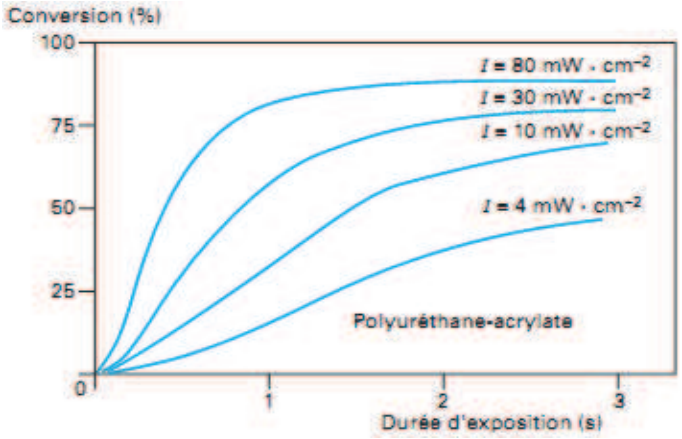


Figure I.69 : Influence de la puissance lumineuse sur la cinétique de polymérisation d'une résine acrylique [200].

Il a été admis que la mobilité moléculaire est plus élevée dans le polymère photoréticulé sous illumination intense, ceci à cause d'une forte élévation locale de la température qui peut atteindre plus de 100°C, même lorsque la photopolymérisation est réalisée à température ambiante [202, 209,

227]. Cette modification de la mobilité moléculaire induit une polymérisation plus complète et peut avoir un effet sur la structure poreuse du monolithe par une répartition plus homogène des nucléi dans tout le volume du canal. L'influence de P sur la structure et les performances séparatives du monolithe est étudiée dans la présente thèse.

- **La température T** : L'influence de T a été étudiée par Szumski *et al.* qui ont remarqué que entre - 15°C et 40°C, la structure et les performances séparatives d'un monolithe acrylate synthétisé via le processus de photopolymérisation peuvent être affectées [225]. En effet, la mobilité moléculaire ainsi que la solubilité des monomères présents en solution dépendent directement de la température de polymérisation. Les auteurs ont remarqué qu'une augmentation de la température entraîne une dégradation de l'efficacité et de la résolution consécutives à une dégradation de l'homogénéité de la structure du monolithe (**Figure I.70**).

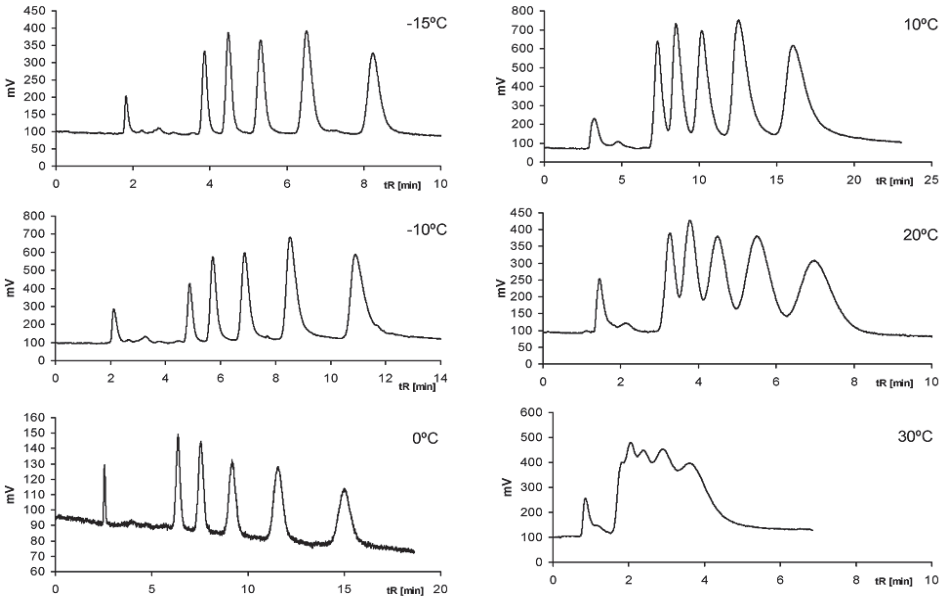


Figure I.70 : Séparation de 5 alkylbenzènes dans des monolithes photopolymérisés à différentes températures. Phase mobile : ACN/H_2O 60/40 (%v). Détection UV à 200 nm. Ordre de sortie des solutés : thiouré (t_o), benzène, toluène, ethylbenzène, propylbenzène, butylbenzène [225].

En résumé, les conditions d'irradiation affectent la cinétique de la polymérisation qui elle-même peut influer sur la structure et donc sur les performances séparatives du monolithe. L'optimisation de ces conditions d'irradiation est donc un moyen simple de contrôler la distribution poreuse du monolithe.

I.5. Fonctionnalisation du substrat COC

La fonctionnalisation de surface des matériaux polymériques a connu un fort développement durant ces dernières années afin d'éviter l'adsorption des protéines sur les substrats hydrophobes et de permettre l'utilisation de ces microsystèmes à une large gamme d'applications aussi diverses que variées [23]. Il existe trois principales méthodes pour fonctionnaliser une surface à base de substrats polymériques :

- ✓ fonctionnalisation par dépôt en phase vapeur
- ✓ fonctionnalisation par l'intermédiaire d'un plasma
- ✓ fonctionnalisation par voie photochimique

Dans cette partie, nous nous limitons à l'étude des différentes méthodes employées pour la fonctionnalisation de surface plane et de canal en COC.

I.5.1. Fonctionnalisation par dépôt en phase vapeur

La fonctionnalisation d'un matériau en phase vapeur permet le dépôt d'une couche par simple adhésion à la surface du matériau. La couche déposée n'est pas liée de façon covalente à la surface à traiter.

D'une façon générale, cette technologie fait appel à trois composantes :

- ⇨ une source : il s'agit de l'endroit où le produit à déposer (ou l'un de ses composants) est concentré : creuset, plaque métallique, bouteille de gaz, ... C'est le siège du phénomène physique de base : la dispersion de cet élément sous forme d'atomes, d'ions et, plus généralement, de vapeur.
- ⇨ un substrat : il s'agit de la pièce à revêtir. La matière issue de la source, pure ou recombinée, vient s'y fixer jusqu'à conduire à la formation de la couche.
- ⇨ un milieu : il s'agit de tout ce qui est compris entre la source et le substrat. C'est le siège du phénomène de transfert de matière. Cela peut être aussi le siège de réactions chimiques intervenant entre les atomes du matériau à déposer et un gaz (dépôts réactifs).

On différencie les dépôts chimiques en phase vapeur (CVD) des dépôts physiques en phase vapeur (PVD) par le moyen utilisé pour produire la vapeur [228, 229] :

- ⇨ La technique PVD correspond à la vaporisation du matériau source (espèce à déposer) soit par effet Joule, soit par induction, soit par bombardement ionique ou électronique, soit par faisceau laser. Les dépôts sont réalisés sous vide poussé de façon à conférer une grande pureté aux couches. Plus la pression est basse, plus les trajectoires des particules vaporisées sont rectilignes. L'inconvénient majeur de cette technique est la faible adhésion de la couche déposée à la surface fonctionnalisée.

- ⇨ La technique CVD consiste à mettre un composé volatil du matériau à déposer en contact soit avec un autre gaz au voisinage de la surface à recouvrir, soit avec la surface elle-même. On provoque alors une ou plusieurs réactions chimiques, donnant au moins un produit solide. Les autres produits de réaction doivent être gazeux afin d'être éliminés hors du réacteur. Les dépôts se font à pression variable, mais il faut systématiquement un apport énergétique pour favoriser ces réactions. Cet apport énergétique peut être apporté par voie thermique, par réaction avec des précurseurs ou par un plasma.

Grâce à ces deux techniques, le dépôt de silice (SiO_2) a été intensivement utilisé pour la fabrication des circuits intégrés dans les techniques de microfabrication [230]. Ce dépôt permet soit de jouer le rôle d'isolant afin d'éviter tout contact électrique entre deux circuits, soit d'apporter des groupements chimiques fonctionnels pour y incorporer d'autres groupements chimiques par la suite. Ma *et al.* ont utilisé ces deux techniques pour fonctionnaliser le COC par le dépôt de fines couches de SiO_2 [231]. Des caractérisations par infrarouge, XPS et AFM ont été réalisées pour vérifier la viabilité de cette méthode de fonctionnalisation (**Figure I.71**). L'apparition des bandes à 1071 cm^{-1} et à 1196 cm^{-1} (liaison Si-O-Si), ainsi que la disparition des bandes 2946.1 cm^{-1} et 2887.5 cm^{-1} (groupements $–CH_2$ et $–CH_3$ présents à la surface du COC) suggère qu'une couche de SiO_2 a été déposée à la surface du COC. Bien que la couche de SiO_2 ne soit pas liée de façon covalente à la surface du COC, il a été démontré par des tests mécaniques que cette couche de silice peut résister à des conditions extrêmes.

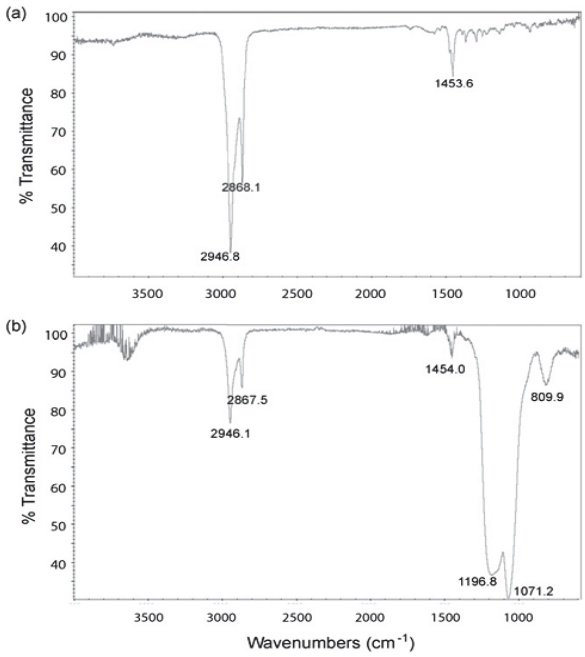


Figure I.71 : Spectres infrarouges d'une plaque COC (a) non fonctionnalisée et (b) fonctionnalisée SiO_2 [231].

De la même manière, Saem *et al.* ont déposé une couche de SiO_2 à la surface d'un microsystème en COC afin d'immobiliser de l'ADN pré-synthétisé [232]. Bien que ces techniques en phase vapeur soient rapides et simples à mettre en œuvre, elles nécessitent une surface à fonctionnaliser

directement accessible pour l'espèce à déposer et requiert donc un milieu ouvert. Elles ne peuvent pas être utilisées pour la fonctionnalisation des canaux d'un microsystème (milieu fermé).

I.5.2. Fonctionnalisation du COC par l'intermédiaire d'un plasma

La fonctionnalisation du COC par réaction chimique est très difficile car ce matériau ne possède que des carbones aliphatiques dans sa structure chimique. Il possède donc une très faible réactivité chimique, contrairement au verre ou au PDMS qui possèdent des fonctions carbonyles et des fonctions hydrophiles.

Cortese [32] et Nikolova [233] ont proposé une fonctionnalisation par l'intermédiaire d'un plasma O_2 pour palier à ce manque de réactivité. Cette étape permet de créer des liaisons hydrophiles disponibles à la surface du COC et de greffer par la suite d'autres groupements fonctionnels à la surface du matériau. Cortese a ainsi pu immobiliser de l'aluminium et du cuivre à la surface du COC [32] tandis que Nikolova a greffé le monomère 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) pour réaliser le collage par liaisons covalentes de deux plaques de COC entre elles (**Figure I.72**) [233]. Ce collage est capable de résister à des pressions de 8 bars. Cette technique permet de remplacer les techniques de collage à chaud où les forces de liaisons sont moins importantes que pour un collage à base de solvants [234].

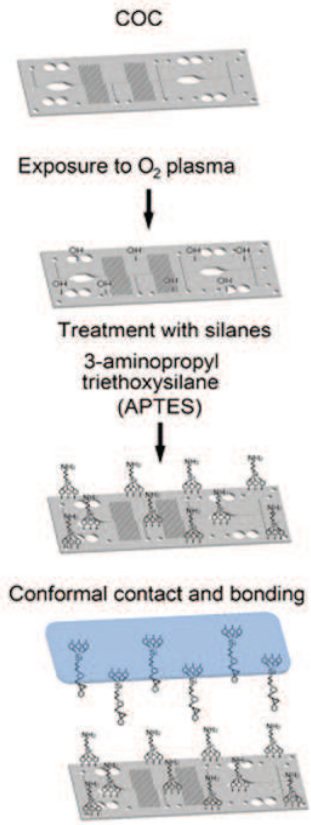


Figure I.72 : Schéma représentant le procédé de collage de deux plaques COC par fonctionnalisation de surface sous plasma/O_2) [233].

Cette méthode de fonctionnalisation du COC par l'intermédiaire d'un plasma O_2 a été reprise et utilisée pour immobiliser des anticorps à la surface du COC [235, 236]. Sung *et al.* y ont incorporé une couche de poly(DMA-r-mPEGMA-r-NAS) [236] tandis que le groupe de Jönsson a réalisé une étape de silanisation suivie d'une réaction avec le dextran pour immobiliser ces anticorps [235].

Le groupe de Roy a remarqué que la fonctionnalisation du COC dépend de la nature du gaz utilisé en observant la forme du ménisque (interface air/eau) dans un micro-canal (**Figure I.73**) [237]. Ainsi, une bonne fonctionnalisation du COC est obtenue avec un plasma argon/O_2 où le ménisque est concave (étalement de l'eau sur les parois) traduit le caractère hydrophile du COC traité. En revanche, aucune fonctionnalisation n'est réalisée avec un plasma argon/air car le ménisque convexe (aucun étalement de l'eau sur les parois) n'indique aucune modification du caractère hydrophobe du COC. Ces résultats sont intéressants car ils suggèrent que la simple observation du ménisque air/eau permet d'indiquer si la surface du COC a été fonctionnalisée ou non. Néanmoins, cette fonctionnalisation par plasma se dégrade dans le temps comme l'ont observé Roy *et al.* [237].

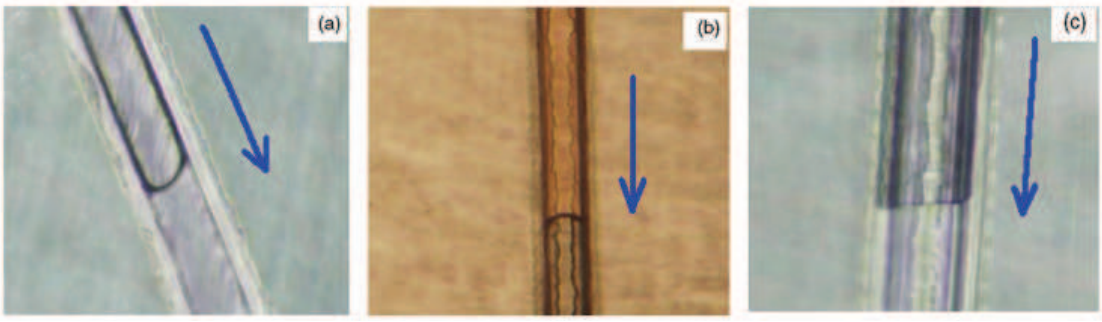


Figure I.73 : Observation du ménisque (interface air/eau) dans (a) un canal COC non traité, (b) un canal COC traité sous un plasma argon/O_2 et (c) un canal traité sous plasma argon/air [237].

A partir de ces résultats, ce même groupe a étudié l'influence de la nature du plasma (oxygène, azote et argon) sur la résistance mécanique du COC et sur la mobilité électroosmotique générée dans le canal en COC [238]. Ainsi, une modification de surface par un plasma d'azote semble donner les meilleures performances.

Tsao *et al.* ont développé un protocole similaire pour palier au manque de réactivité du COC. Ils ont réalisé une activation du COC par l'intermédiaire d'un plasma O_3 sous irradiation UV à 254 nm à température ambiante [31]. L'irradiation UV de forte énergie permet de casser les liaisons chimiques et de créer des radicaux à la surface du COC. Le traitement UV/O_3 agit comme un oxydant fort et induit donc une oxydation de la surface des hydrocarbures permettant l'incorporation de groupements fonctionnels à base d'oxygène. L'avantage de cette méthode est que le matériau COC reste fonctionnalisé pendant plus de 14 jours.

Pour résumer, l'ensemble de ces techniques de fonctionnalisation utilisant un plasma fonctionnent bien sur les matériaux polymériques et principalement sur le COC comme l'a constaté le groupe de Tennico [234]. Cependant, la nécessité de fonctionnaliser le COC en milieu ouvert (avant le collage de deux plaques COC) complique la fabrication des microsystèmes COC.

I.5.3. Fonctionnalisation par voie photochimique

La fonctionnalisation du COC par voie photochimique offre l'avantage de pouvoir traiter aussi bien des surfaces planes que les parois internes d'un micro-canal, ceci grâce à la transparence du COC dans une large gamme de longueurs d'onde dans le domaine UV (> 270 nm). Elle permet également d'apporter une meilleure stabilité de la fonctionnalisation dans le temps contrairement aux méthodes de recouvrement dynamique où une molécule hydrophile est simplement adsorbée à la surface du COC [239]. De plus, la fonctionnalisation sous irradiation UV permet des modifications de surface rapides et localisées contrairement aux techniques de bromination du COC [240]. Ainsi, le groupe de Mecomber a modifié la surface du COC avec des azides aromatiques perfluorés [241]. Sous irradiation à 254 nm, ces azides perdent leurs groupements N_2 et deviennent nitrène aryle sous forme singulet, capable de réagir avec les liaisons C-H de la structure chimique du COC. Grâce à ces azides, il devient possible de modifier chimiquement la surface du COC avec des groupements amines quaternaires ou des groupements aldéhydes pour permettre par la suite d'autres modifications. Cependant, ces molécules sont très toxiques et peuvent présenter un risque pour le manipulateur.

Une autre approche est basée sur la photo-activation de la liaison C-H du substrat COC par l'intermédiaire de la benzophénone. Ce photoinitiateur de type II est capable d'abstraire un hydrogène et de générer des radicaux libres à la surface du COC. Ces radicaux libres peuvent ensuite réagir avec des monomères pour créer un film polymérique à la surface du matériau [111, 242, 243].

Le mécanisme photochimique de la benzophénone a été très étudié depuis la fin des années 70, mais la dégradation de ce photoinitiateur sous irradiation UV n'est pas encore parfaitement comprise [244-248]. Cependant, il est admis que le processus se déroule de la manière suivante (**Figure I.74**) :

1. excitation de la benzophénone dans un état singulet par absorption d'un photon UV.
2. passage de l'état singulet (spins opposés) vers l'état triplet (spin parallèle) par conversion inter-système (ISC).
3. formation d'un radical benzophénone ketyl par abstraction d'hydrogène et création d'un radical à la surface du donneur d'hydrogène.
4. formation d'un benzopinacol par recombinaison du radical ketyl en l'absence de monomères.

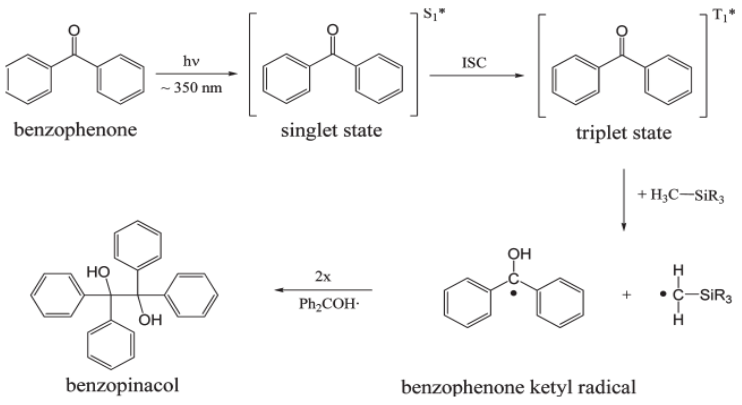


Figure I.74 : mécanisme d'abstraction d'hydrogène de la benzophénone à partir d'une surface donneuse en atomes d'hydrogène (ici silice méthylée) [247].

Le groupe de Ranby a été l'un des premiers à utiliser ce mécanisme pour la fonctionnalisation du COC [242] et à comprendre que le mécanisme d'abstraction d'hydrogène dépendait fortement de la longueur d'irradiation [111] (**Figure I.75**).

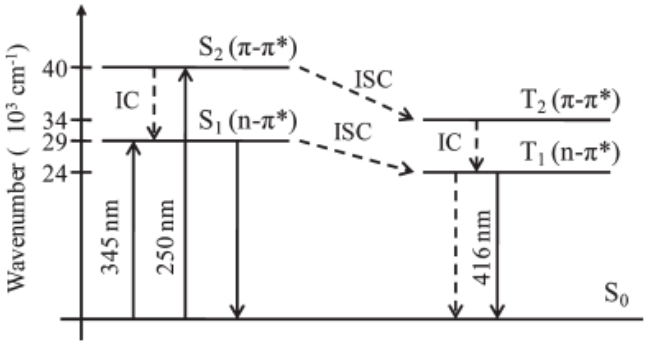


Figure I.75 : Diagramme de Jablonski montrant l'importance de la longueur d'onde d'irradiation sur le mécanisme d'abstraction d'hydrogène de la benzophénone par rapport [247].

Pour une irradiation à 345 nm, longueur d'onde où le COC est totalement transparent, la benzophénone est excitée à l'état singulet S_1 correspondant à la transition n→π* dans le groupement carbonyle (durée de vie de 100 ns). Par conversion inter-système, l'état singulet S_1 est converti en état triplet T_1 (durée de vie de 100 ps) avec un rendement de 100 %. La relaxation de l'état singulet S_1 vers l'état fondamental S_0 ne se produit presque jamais. L'énergie de la benzophénone à l'état triplet T_1 qui est de 69 kcal/mol, n'est pas suffisante pour abstraire les hydrogènes primaires, secondaires et tertiaires dont les énergies de liaison sont respectivement de 100, 96 et 93 kcal/mol (**Tableau I.12**). En l'absence de donneur d'hydrogène, la relaxation de l'état triplet T_1 vers l'état fondamental S_0 se produit en émettant un photon à 416 nm (phosphorescence). Cependant, Ranby a souligné que la capacité de la benzophénone à abstraire un hydrogène à cette longueur d'onde dépend de la nature chimique du solvant [111]. Par exemple, Deverell a réussi à greffer la surface du COC avec des monomères bifonctionnels à partir du mécanisme d'abstraction d'hydrogène de la benzophénone dilué dans le méthanol à 365 nm [249].

Tableau I.12 : Récapitulatif des énergies de liaisons hydrogènes et des états excités de la benzophénone [111, 247].

Type	Energie (kcal/mol)
Hydrogène primaire	100
Hydrogène secondaire	96
Hydrogène tertiaire	93
Benzophénone à l'état triplet T_1 à 345 nm	69
Benzophénone à l'état triplet T_2 à 250 nm	110

Pour une irradiation à 250 nm (« deep UV »), longueur d'onde où le COC possède une transmittance de 50 %, on observe les mêmes mécanismes qu'à 345 nm. Cependant, l'état triplet T_2 a une énergie plus importante que l'état triplet T_1 (**Tableau I.12**) et le mécanisme d'abstraction d'hydrogène par la benzophénone peut se réaliser à 250 nm.

Sur les matériaux polymériques donneurs d'hydrogènes, l'abstraction d'hydrogène se fait préférentiellement dans cette ordre : hydrogène tertiaire (– CH_3) > hydrogène secondaire (-CH_2) > hydrogène primaire (-CH). Comme le COC résulte d'une copolymérisation entre norbornène et éthylène, le nombre d'hydrogènes tertiaires dans sa composition y est très élevé. Le COC est donc un très bon candidat pour l'abstraction d'hydrogène par les photoinitiateurs de type II tels que l'isopropyl thioxanthone [250], l'anthraquinone [246], p-nitrophenyl azide [246] et 3 phenyl-3-(trifluoromethyl)diazirine [246].

La fonctionnalisation du COC via ce mécanisme d'abstraction d'hydrogène a été très utilisé sur des surfaces planes afin d'améliorer ses propriétés optiques et de permettre la compatibilité du COC vis-à-vis des échantillons biologiques [111, 196, 250-253]. Ce protocole de fonctionnalisation a également été utilisé afin d'immobiliser des biomolécules à la surface du COC [254].

La modification chimique des parois internes des microcanaux en COC via la photo-activation de la benzophénone a été réalisée par Stachowiak [255] et Li [256] à 254 nm. Des monomères hydrophiles de polyéthylène glycol méthacrylate (PEGMA) ont été photo-greffés à la surface du COC par ces deux groupes afin de le rendre hydrophile et de diminuer l'adsorption des protéines. Dans une première étape, la benzophénone abstrait un hydrogène à la surface par absorption UV créant ainsi des radicaux à la surface du canal COC et des radicaux benzophénones ketyl en solution (**Figure I.76**). En l'absence de monomères, ces radicaux ketyl se recombinent et se lient par liaison covalente à la surface du COC pour former des groupements semi-pinacol. Dans une seconde étape, une polymérisation de surface est créée sous irradiation UV entre ces sites semi-pinacol et les monomères présents en solution. Le mélange contenant le monomère fonctionnalisant ne possède pas d'initiateur pour éviter toute hétérogénéité structurelle dans la couche ancrée.

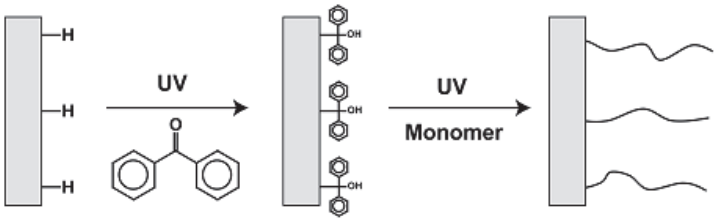


Figure I.76 : Protocole de fonctionnalisation du COC en deux étapes [255].

Stackowiak *et al.* ont également montré que la modification chimique du COC suivant ce procédé dépendait fortement des concentrations en benzophénone et en PEGMA ainsi que du temps d'irradiation à 260 nm [255]. Ils ont ainsi caractérisé le changement d'hydrophobicité du COC par des mesures d'angles de contact de l'eau sur le matériau (**Figure I.77**). Le temps de fonctionnalisation (temps d'irradiation) nécessaire est de 15 min environ, ceci indépendamment des concentrations en

benzophénone et en PEGMA utilisées. L'angle de contact obtenu diminue de 75° à 45° quand la concentration en benzophénone augmente de 0 à 5 % en poids. Cependant, une concentration plus importante en benzophénone (10 % en poids) augmente l'angle de contact à 55°. A forte concentration, la benzophénone absorbe fortement et peut donc réduire la transmission des rayonnements UV au centre du canal rempli de mélange réactionnel. Les réactions radicalaires entre monomères et radicaux libres à la surface du COC sont donc moins nombreuses, ce qui engendre une modification chimique du COC moins importante. Il existe donc une concentration optimale en benzophénone. De plus, il est intéressant de noter que la fonctionnalisation du COC peut se réaliser en l'absence de photoinitiateur. En effet, les photons UV à 260 nm, qui ont une forte énergie, peuvent casser les liaisons chimiques du COC et ainsi créer des radicaux en surface [31]. Néanmoins, la fonctionnalisation du matériau est plus importante en présence de benzophénone (angle de contact de 45°) qu'en l'absence d'un photoinitiateur (angle de contact de 75°)

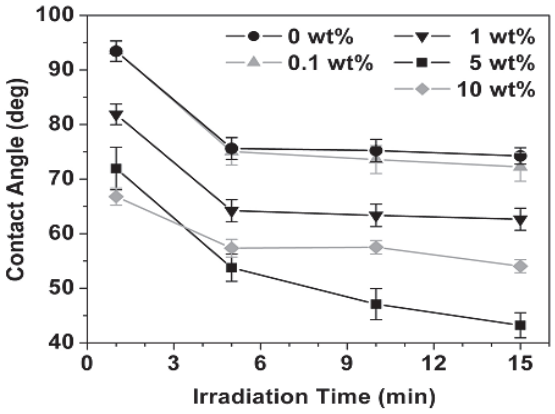


Figure I.77 : Effet de la concentration en benzophénone et du temps d'irradiation sur la variation d'angle de contact mesurée sur des plaques COC fonctionnalisée PEGMA [255].

Ce même groupe a travaillé sur la fonctionnalisation de différents matériaux polymériques pouvant donner des atomes d'hydrogène (COC, PC, PMMA,…) [29]. Ils ont également réalisé l'incorporation de différents monomères hydrophiles (27 au total) à la surface du matériau COC.

Grâce aux mécanismes d'abstraction d'hydrogène des photoinitiateurs de type II, Stachowiak *et al.* ont proposé une méthode en deux étapes permettant d'ancrer un monolithe organique à base de butyl méthacrylate (BMA) – éthylène glycol diméthacrylate (EDMA) à la surface du COC [184]. Dans une première étape, les parois du microsystème COC sont modifiées chimiquement par un monomère bifonctionnel (éthylène diacrylate) en présence de benzophénone à 260 nm. Les fonctions acrylates libres des monomères bifonctionnels ancrés à la surface du COC peuvent ensuite réagir dans une seconde étape avec les monomères du mélange de polymérisation permettant l'ancrage du monolithe organique par réaction radicalaire (**Figure I.78**) [184]. Grâce à ce protocole, le monolithe ancré à la paroi du COC peut résister à une pression de 10 bars. Les performances chromatographiques n'ont cependant pas été testées.

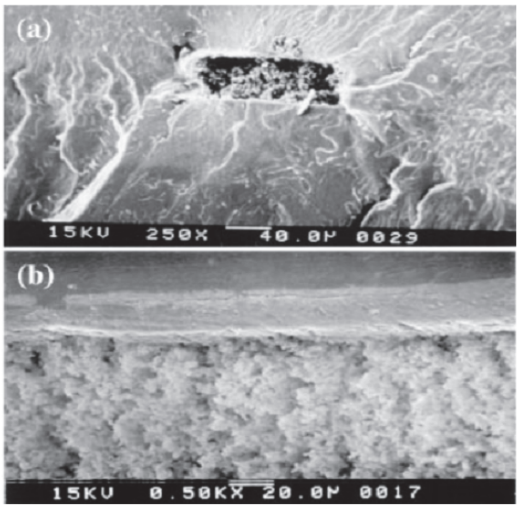


Figure I.78 : Images MEB montrant (a) une vue générale du monolithe BMA/EDMA synthétisé dans un canal COC de 130 µm × 45 µm et (b) vue sur les parois du canal COC montrant l'ancrage par liaison covalente du monolithe BMA/EDMA [184].

Le groupe de Ro a également utilisé ce concept en fonctionnalisant les parois du COC avec un monomère triacrylate (trimethylolpropane triacrylate ou TMPTA) [183]. Cette couche intermédiaire a permis d'ancrer un monolithe éthyl hexyl méthacrylate – éthylène glycol diméthacrylate (EHMA-EDMA) dans un canal en COC (**Figure I.79**). Contrairement à Stackowiak, ce groupe a réalisé cette fonctionnalisation et cette synthèse à 365 nm car le COC est plus transparent à cette longueur d'onde (transmittance de 92 % au lieu 40 % à 260 nm). Néanmoins, la faible réactivité de la benzophénone à cette longueur d'onde n'a pas été pris en compte [111]. Il a été observé que la qualité de l'ancrage du monolithe à la paroi du COC dépendait de la nature de la couche intermédiaire générée à la surface. Ainsi, le monolithe EHMA-EDMA est mieux ancré quand les canaux ont été modifiés chimiquement avec du TMPTA qu'avec de l'éthylène diacrylate (EDA).

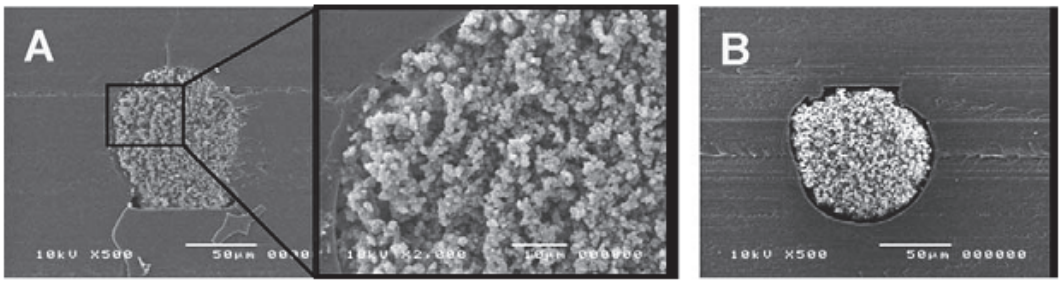


Figure I.79 : Images MEB d'un monolithe EHMA-EDMA synthétisé dans un microsystème COC. Les canaux ont été fonctionnalisés avec (A) du TMPTA et (B) de l'EDA [183].

Le microsystème en COC fonctionnalisé au TMPTA et rempli de phase stationnaire monolithique EHMA-EDMA a été couplé à un MALDI-TOF-MS pour l'analyse d'un mélange de peptides et de protéines.

L'introduction simultanée de la benzophénone et d'un monomère polyfonctionnel pour la fonctionnalisation du COC sous irradiation UV entraîne la formation d'homopolymères qui risquent de boucher le canal [255]. Pour palier à ce problème, Deverell *et al.* ont repris les travaux de Stachowiak [255] et ont proposé une méthode d'ancrage du monolithe glycidyl méthacrylate (GMA)/ éthylène diméthacrylate (EDMA) sur les parois COC en trois étapes :

1. activation de la surface COC par incorporation de groupements semi-pinacol à partir de la benzophénone sous irradiation UV à 254 nm.
2. réaction de ces sites réactionnels avec un mélange de monomères polyfonctionnels (méthyl méthacrylate/éthylène diméthacrylate) pour former une couche intermédiaire constituée de fonctions acrylates accessibles pour d'autres réactions radicalaires.
3. synthèse in-situ d'un monolithe GMA/EDMA et ancrage sur la paroi du COC à 365 nm grâce à la présence de la couche intermédiaire. Le 2,2-diméthoxy-2-phénylacetophénone (DMPAP) est le photoinitiateur de type I utilisé pour initier la polymérisation.

Ce procédé de photopolymérisation contrôlé a permis de développer un microréacteur monolithique possédant de bonnes propriétés d'écoulement. Des débits de 2 $\mu L.h^{-1}$ à 4.3 $\mu L.h^{-1}$ ont été appliqués respectivement dans un capillaire (276 µm d.i) et un microsystème en COC (610 µm × 100 µm) pendant plus de 24h. Aucune perte d'adhésion du monolithe sur les parois COC n'a été observée.

Récemment, Flook *et al.* ont synthétisé et ancré un monolithe dans un capillaire COC (320 µm ID) en deux étapes sans incorporation de couche intermédiaire [257]. L'activation du COC a été réalisée à 350 nm par le 2-methyl-4'-(methylthio)-2-morpholinopropiophenone (MTMPP) qui est un photoinitiateur de type II dérivé de la benzophénone. La synthèse in-situ d'un monolithe divinylbenzène (DVB) a été ensuite réalisée à 350 nm en présence de l'AIBN. Le monolithe ancré à la paroi du COC est capable de résister à des pressions de 33.6 bars à une vitesse de 4.2 mm/s. La séparation d'un mélange de 5 peptides et protéines a été obtenue dans un capillaire COC en 2 min avec de bonnes efficacités et de bonnes résolutions (**Figure I.80**).

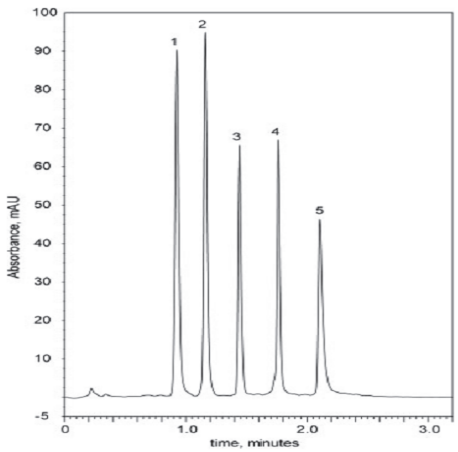


Figure I.80 : Elution en gradient d'un mélange de peptide et de protéine dans un monolithe DVB à 200 µL/min. Dimension de la colonne : 1 mm × 250 mm. Phase mobile : eau/acetonitrile/1% (v/v) TFA. (1) angiotensin II, (2) substance P, (3) ribonuclease A, (4) cytochrome c et (5) BSA [257].

De la même manière, le groupe de Paull a réalisé en deux étapes la synthèse et l'ancrage d'un monolithe butyl méthacrylate (BuMA)-éthylène diméthacrylate (EDMA) dans un microsystème en COC [258]. Paull *et al.* ont ensuite créé un gradient chimique de phase stationnaire en fonctionnalisant le monolithe avec un sulfopropyl méthacrylate (SPM) à différentes intensités. Cette fonctionnalisation de surface permet l'immobilisation de l'acide iminodiacetic (IDA) et des ions Cu^{2+}.

Pour résumer, la benzophénone permet de modifier chimiquement la surface du COC et permet l'ancrage d'un monolithe organique. Néanmoins, 4 inconvénients majeurs de l'utilisation de la benzophénone doivent être mentionnés :

- ✓ la benzophénone est très sensible à la présence de dioxygène O_2 [187, 259, 260]. Cela se matérialise par la perte de sa réactivité vis-à-vis des groupements donneurs d'hydrogène par inhibition de la benzophénone excitée à l'état triplet. Il est donc nécessaire de travailler sous atmosphère inerte (N_2 par exemple).
- ✓ le procédé est long et coûteux avec de nombreuses étapes de polymérisation et de rinçage, ce qui n'est pas compatible avec la production à grande échelle [249, 255].
- ✓ l'utilisation de la benzophénone requiert une irradiation à 254 nm [111, 249], ce qui est peu compatible avec le matériau COC (transmittance de 40 % et de 92 % respectivement à 254 nm et 365 nm).
- ✓ la présence d'une couche intermédiaire de polymères initiée par la benzophénone peut entraîner une hétérogénité radiale et avoir un impact sur les performances chromatographiques.

I.6. Conclusion

Ce chapitre bibliographique a permis de faire l'état de l'art sur la fabrication et l'utilisation des microsystèmes séparatifs. L'utilisation du substrat polymérique COC permet d'envisager la fabrication de microsystèmes peu coûteux et jetables. La mise en œuvre de l'électrochromatographie permet de simplifier la miniaturisation des systèmes analytiques et de mettre en œuvre la séparation de solutés chargés ou non. Enfin, la synthèse in-situ d'un monolithe organique dans un microsystème COC est une solution simple pour obtenir facilement en quelques minutes une phase stationnaire dans des microcanaux.

Le but de notre travail est de développer un microsystème électrochromatographique en COC qui soit performant, robuste, facile à utiliser, fabriqué rapidement et à moindre coût, ceci pour satisfaire à certains critères comme ceux de l'analyse sur site par exemple.

Les objectifs à atteindre sont les suivants :

1. synthétiser un monolithe organique dans un microcanal en COC permettant la séparation de solutés variés.
2. mettre au point un protocole permettant l'ancrage du monolithe à la surface du COC.

3. optimiser les conditions de polymérisation du monolithe afin d'obtenir des séparations électrochromatographiques performantes.
4. simplifier les étapes d'injection pour rendre le microsystème compatible avec l'analyse sur site.
5. mettre en œuvre la préconcentration en microsystème COC afin d'obtenir des limites de détection satisfaisantes permettant l'analyse d'échantillons réels.
6. réaliser l'analyse d'échantillons réels afin d'illustrer les possibilités de l'outil analytique développé.

I.7. Références bibliographiques

[1] Li, H. F., Lin, J. M., *Anal. Bioanal. Chem.* 2009, *393*, 555-567.

[2] Crockett, A. B., Jenkins, T. F., Craig, H. D., Sisk, W. E., DTIC Document, Special Report 98-4. 1998, pp. 1-30.

[3] Boles, T. H., Wells, M. J. M., *J. Chromatogr. A* 2010, *1217*, 2561-2568.

[4] Throckmorton, D. J., Shepodd, T. J., Singh, A. K., *Anal. Chem* 2002, *74*, 784-789.

[5] Blas, M., Delaunay-Bertoncini, N., Rocca, J.-L., *Spectra analyse* 2005, *34*, 17-28.

[6] Coltro, W. K. T., Lunte, S., Carrilho, E., *Electrophoresis* 2008, *29*, 4928-4937.

[7] Mourzina, Y., Steffen, A., Kalyagin, D., Carius, R., Offenhäusser, A., *Electrophoresis* 2005, *26*, 1849-1860.

[8] Stol, R., PedersoliJr, J. L., Poppe, H., Kok, W. T., *Anal. Chem* 2002, *74*, 2314-2320.

[9] Manz, A., Miyahara, Y., Miura, J., Watanabe, Y.*, et al.*, *Sensor. Actuat. B-Chem.* 1990, *1*, 249-255.

[10] Kutter, J. P., *TrAC-Trend. Anal. Chem.* 2000, *19*, 352-363.

[11] Stachowiak, T. B., Svec, F., Fréchet, J. M. J., *J. Chromatogr. A* 2004, *1044*, 97-111.

[12] Terry, S. C., Jerman, J. H., Angell, J. B., *Electron. Devic.* 1979, *26*, 1880-1886.

[13] Dutta, D., Ramsey, J. M., *Lab. Chip.* 2011, *11*, 3081-3088.

[14] Culbertson, C. T., Jacobson, S. C., Ramsey, J. M., *Anal. Chem* 2000, *72*, 5814-5819.

[15] Xie, J., Miao, Y., Shih, J., Tai, Y.-C., Lee, T. D., *Anal. Chem.* 2005, *77*, 6947-6953.

[16] Ishibashi, R., Mawatari, K., Takahashi, K., Kitamori, T., *J. Chromatogr. A* 2012, *1228*, 51-56.

[17] Lazar, I. M., Trisiripisal, P., Sarvaiya, H. A., *Anal. Chem.* 2006, *78*, 5513-5524.

[18] Nunes, P., Ohlsson, P., Ordeig, O., Kutter, J., *Microfluid. Nanofluid.* 2010, *9*, 145-161.

[19] Augustin, V., Proczek, G., Dugay, J., Descroix, S., Hennion, M. C., *J. Sep. Sci.* 2007, *30*, 2858-2865.

[20] Proczek, G., Augustin, V., Descroix, S., Hennion, M.-C., *Electrophoresis* 2009, *30*, 515-524.

[21] Jeffrey W, S., *Dental Materials* 2012, *28*, 13-22.

[22] Gustafsson, O., Mogensen, K. B., Kutter, J. P., *Electrophoresis* 2008, *29*, 3145-3152.

[23] Tentori, A. M., Herr, A. E., *J. Mech. Eng.* 2011, *21*, 1-14.

[24] Kuo, J. S., Chiu, D. T., *Lab. Chip.* 2011, *11*, 2656-2665.

[25] Faure, K., *Electrophoresis* 2010, *31*, 2499-2511.

[26] Makamba, H., Kim, J. H., Lim, K., Park, N., Hahn, J. H., *Electrophoresis* 2003, *24*, 3607-3619.

[27] Rötting, O., Röpke, W., Becker, H., Gärtner, C., *Micro. Techn.* 2002, *8*, 32-36.

[28] Yassine, O., Morin, P., Dispagne, O., Renaud, L.*, et al.*, *Anal. Chim. Acta.* 2008, *609*, 215-222.

[29] Rohr, T., Ogletree, D. F., Svec, F., Frechet, J. M. J., *Adv. Funct. Mater.* 2003, *13*, 264-270.

[30] Bedair, M. F., Oleschuk, R. D., *Anal. Chem* 2006, *78*, 1130-1138.

[31] Tsao, C. W., Hromada, L., Liu, J., Kumar, P., DeVoe, D. L., *Lab on a Chip* 2007, *7*, 499-505.

[32] Cortese, B., Mowlem, M. C., Morgan, H., *Sensor. Actuat. B-Chem.* 2011, *160*, 1473-1480.

[33] www.microfluidic-chipshop.com, consulté le 24/05/2012.

[34] www.topas.com, consulté le 24/05/2012.

[35] Leech, P. W., *MRS Proceedings* 2009, *1191* 1191-1197.

[36] Carlborg, C. F., Haraldsson, T., Öberg, K., Malkoch, M., van der Wijngaart, W., *Lab. Chip.* 2011, *11*, 3136-3147.

[37] www.mercenelabs.com, consulté le 24/05/2012.

[38] Schift, H., David, C., Gabriel, M., Gobrecht, J.*, et al.*, *Micro. Eng.* 2000, *53*, 171-174.

[39] Cameron, N. S., Roberge, H., Veres, T., Jakeway, S. C., John Crabtree, H., *Lab. Chip.* 2006, *6*, 936-941.

[40] Mair, D. A., Geiger, E., Pisano, A. P., Fréchet, J. M. J., Svec, F., *Lab on a Chip* 2006, *6*, 1346-1354.

[41] Guber, A. E., Heckele, M., Herrmann, D., Muslija, A.*, et al.*, *Chem. Eng. J.* 2004, *101*, 447-453.

[42] Attia, U., Marson, S., Alcock, J., *Microfluid. Nanofluid.* 2009, *7*, 1-28.

[43] Becker, H., Gärtner, C., *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, *390*, 89-111.

[44] Miserere, S., Mottet, G., Taniga, V., Descroix, S.*, et al.*, *Lab. Chip.* 2012, *under press*.

[45] Lahlou, H., Sanchez, J. B., Mohsen, Y., Vilanova, X.*, et al.*, *Micro. Techn.* 2012, 1-7.

[46] Becker, H., Gärtner, C., *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2008, *390*, 89-111.

[47] www.yole.fr/Reports.aspx, MEMS : Emerging MEMS Technologies & Markets, Report Yole Development 2010.

[48] Lewis, A. C., Hamilton, J. F., Rhodes, C. N., Halliday, J.*, et al.*, *J. Chromatogr. A* 2010, *1217*, 768-774.

[49] Radadia, A. D., Salehi-Khojin, A., Masel, R. I., Shannon, M. A., *Sensor. Actuat. B-Chem.* 2010, *150*, 456-464.

[50] Sanchez, J. B., Berger, F., Fromm, M., Nadal, M. H., *Sensor. Actuat. B-Chem.* 2005, *106*, 823-831.

[51] Lambertus, G., Elstro, A., Sensenig, K., Potkay, J.*, et al.*, *Anal. Chem* 2004, *76*, 2629-2637.

[52] Sanchez, J.-B., Berger, F., Fromm, M., Nadal, M.-H., *Sensor. Actuat. B-Chem.* 2006, *119*, 227-233.

[53] Haeberle, S., Zengerle, R., *Lab. Chip.* 2007, *7*, 1094-1110.

[54] Serrano, G., Reidy, S. M., Zellers, E. T., *Sensor. Actuat. B-Chem.* 2009, *141*, 217-226.

[55] Sanchez, J.-B., Berger, F., Daniau, W., Blind, P.*, et al.*, *Sensor. Actuat. B-Chem.* 2006, *113*, 1017-1024.

[56] Trietsch, S. J., Hankemeier, T., van der Linden, H. J., *Chemometr. Intell. Lab.* 2011, *108*, 64-75.

[57] Abbyad, P., Dangla, R., Alexandrou, A., Baroud, C. N., *Lab. Chip.* 2011, *11*, 813-821.

[58] Diguet, A., Li, H., Queyriaux, N., Chen, Y., Baigl, D., *Lab. Chip.* 2011, *11*, 2666-2669.

[59] Huebner, A., Sharma, S., Srisa-Art, M., Hollfelder, F.*, et al.*, *Lab. Chip.* 2008, *8*, 1244-1254.

[60] Song, H., Tice, J. D., Ismagilov, R. F., *Angewandte Chemie* 2003, *115*, 792-796.

[61] Teh, S.-Y., Lin, R., Hung, L.-H., Lee, A. P., *Lab on a Chip* 2008, *8*, 198-220.

[62] Günther, A., Jhunjhunwala, M., Thalmann, M., Schmidt, M. A., Jensen, K. F., *Langmuir* 2005, *21*, 1547-1555.

[63] Niu, X., Zhang, M., Peng, S., Wen, W., Sheng, P., *Biomicrofluidics* 2007, *1*, 044101-044112.

[64] Eriksson, C., Agaton, C., Kånge, R., Sundberg, M.*, et al.*, *J. Prot. Res.* 2006, *5*, 1568-1574.

[65] Gustafsson, M., Hirschberg, D., Palmberg, C., Jörnvall, H., Bergman, T., *Anal. Chem* 2003, *76*, 345-350.

[66] Schembri, C., Burd, T., Kopf-Sill, A., Shea, L., Braynin, B., *J. auto. chem* 1995, *17*, 99-99.

[67] Lai, S., Wang, S., Luo, J., Lee, L. J.*, et al.*, *Anal. Chem* 2004, *76*, 1832-1837.

[68] Gustafsson, M., Hirschberg, D., Palmberg, C., Jörnvall, H., Bergman, T., *Analytical Chemistry* 2003, *76*, 345-350.

[69] Faure, K., *Electrophoresis* 2010, *15*, 2499-2511.

[70] Yin, H., Killeen, K., Brennen, R., Sobek, D.*, et al.*, *Anal. Chem* 2004, *77*, 527-533.

[71] Yin, H., Killeen, K., *J. Sep. Sci.* 2007, *30*, 1427-1434.

[72] www.eksigent.com, consulté le 24/05/2012.

[73] Liu, J., Chen, C.-F., Tsao, C.-W., Chang, C.-C.*, et al.*, *Anal. Chem* 2009, *81*, 2545-2554.

[74] Bedair, M. F., Oleschuk, R. D., *Analytical Chemistry* 2006, *78*, 1130-1138.

[75] Yun, K. S., Yoon, E., in: Springer (Ed.), *MEMS/NEMS Handbook Techniques and Applications.* 2006, pp. 121–153.

[76] Amirouche, F., Zhou, Y., Johnson, T., *Micro. Techn.* 2009, *15*, 647-666.

[77] Brennen, R. A., Yin, H., Killeen, K., *Anal. Chem* 2007, *79*, 9302-9309.

[78] Fuentes, H. V., Woolley, A. T., *Lab. Chip.* 2007, *7*, 1524-1531.

[79] Borowsky, J. F., Giordano, B. C., Lu, Q., Terray, A., Collins, G. E., *Anal. Chem* 2008, *80*, 8287-8292.

[80] Wu, D., Qin, J., Lin, B., *J. Chromatogr. A* 2008, *1184*, 542-559.

[81] Karlinsey, J. M., *Anal. Chim. Acta.* 2012, *725*, 1-13.

[82] Salieb-Beugelaar, G. B., Dorfman, K. D., van den Berg, A., Eijkel, J. C. T., *Lab on a Chip* 2009, *9*, 2508-2523.

[83] Gebauer, P., Malá, Z., Boček, P., *Electrophoresis* 2007, *28*, 26-32.

[84] Gebauer, P., Malá, Z., Boček, P., *Electrophoresis* 2011, *32*, 83-89.

[85] Bodor, R., Žúborová, M., Ölvecká, E., Madajová, V.*, et al.*, *J. Sep. Sci* 2001, *24*, 802-809.

[86] Vio, L., Crétier, G., Chartier, F., Geertsen, V.*, et al.*, *J. Anal. Atom. Spectr* 2012.

[87] Ladner, Y., Crétier, G., Faure, K., *J. Chromatogr. A* 2010, *1217*, 8001-8008.

[88] Shou, M., Smith, A. D., Shackman, J. G., Peris, J., Kennedy, R. T., *J. Neurosci. Meth.* 2004, *138*, 189-197.

[89] Ramsey, J. D., Jacobson, S. C., Culbertson, C. T., Ramsey, J. M., *Anal. Chem* 2003, *75*, 3758-3764.

[90] Jorgenson, J. W., Lukacs, K. D., *J. Chromatogr. A* 1981, *218*, 209-216.

[91] Knox, J., Grant, I., *Chromatographia* 1987, *24*, 135-143.

[92] Govindaraju, K., Ahmed, A., Lloyd, D. K., *J. Chromatogr. A* 1997, *768*, 3-8.

[93] Smith, N. W., Carter-Finch, A. S., *J. Chromatogr. A* 2000, *892*, 219-255.

[94] Kaltcheva, M., *Thèse*, Concordia University Montreal, Canada 2001.

[95] Wan, Q.-H., *J. Chromatogr. A* 1997, *782*, 181-189.

[96] Delaunay-Bertoncini, N., Demesmay, C., Rocca, J.-L., *Electrophoresis* 2004, *25*, 3204-3215.

[97] Ericson, C., Liao, J.-L., Nakazato, K., Hjertén, S., *J. Chromatogr. A* 1997, *767*, 33-41.

[98] Bartle, K. D., Myers, P., *J. Chromatogr. A* 2001, *916*, 3-23.

[99] Knox, J., *Chromatographia* 1988, *26*, 329-337.

[100] Augustin, V., Université Paris VI - Pierre et Marie Curie, France, 2005.

[101] Gusev, I., Huang, X., Horváth, C., *J. Chromatogr. A* 1999, *855*, 273-290.

[102] Jiang, T., Jiskra, J., Claessens, H. A., Cramers, C. A., *J. Chromatogr. A* 2001, *923*, 215-227.

[103] Lin, C.-C., Hsu, J.-L., Lee, G.-B., *Microfluid. Nanofluid.* 2011, *10*, 481-511.

[104] Svec, F., *J. Chromatogr. B* 2006, *841*, 52-64.

[105] Giordano, B. C., Burgi, D. S., Hart, S. J., Terray, A., *Anal. Chim. Acta.* 2012, *718*, 11-24.

[106] Yang, H., Chien, R. L., *J. Chromatogr. A* 2001, *924*, 155-163.

[107] Broyles, B. S., Jacobson, S. C., Ramsey, J. M., *Anal. Chem.* 2003, *75*, 2761-2767.

[108] Zhang, Y., Zhu, J., Zhang, L., Zhang, W., *Anal. Chem* 2000, *72*, 5744-5747.

[109] Tegeler, T., El Rassi, Z., *Anal. Chem* 2001, *73*, 3365-3372.

[110] Liu, Z., Otsuka, K., Terabe, S., *Electrophoresis* 2001, *22*, 3791-3797.

[111] Rånby, B., Yang, W. T., Tretinnikov, O., *Nucl. Instrum. Meth. B.* 1999, *151*, 301-305.

[112] Yu, C., Davey, M. H., Svec, F., Fréchet, J. M. J., *Anal. Chem* 2001, *73*, 5088-5096.

[113] Quirino, J. P., Dulay, M. T., Zare, R. N., *Anal. Chem* 2001, *73*, 5557-5563.

[114] Oguri, S., Tanagaki, H., Hamaya, M., Kato, M., Toyo'oka, T., *Anal. Chem* 2003, *75*, 5240-5245.

[115] Foote, R. S., Khandurina, J., Jacobson, S. C., Ramsey, J. M., *Anal. Chem* 2005, *77*, 57-63.

[116] Faure, K., Albert, M., Dugas, V., Crétier, G.*, et al.*, *Electrophoresis* 2008, *29*, 4948-4955.

[117] Blas, M., Delaunay, N., Rocca, J.-L., *Electrophoresis* 2007, *28*, 4629-4637.

[118] Blas, M., Delaunay, N., Ferrigno, R., Rocca, J.-L., *Electrophoresis* 2007, *28*, 2961-2970.

[119] Jacobson, S. C., Hergenröder, R., Koutny, L. B., Ramsey, J. M., *Anal. Chem* 1994, *66*, 2369-2373.

[120] Soper, S. A., Henry, A. C., Vaidya, B., Galloway, M.*, et al.*, *Anal. Chim. Acta.* 2002, *470*, 87-99.

[121] Pumera, M., Wang, J., Grushka, E., Polsky, R., *Anal. Chem* 2001, *73*, 5625-5628.

[122] Lin, Y.-W., Huang, M.-J., Chang, H.-T., *J. Chromatogr. A* 2003, *1014*, 47-55.

[123] Pumera, M., *Talanta* 2005, *66*, 1048-1062.

[124] He, B., Regnier, F., *J. Pharma. Biomed.* 1998, *17*, 925-932.

[125] Slentz, B. E., Penner, N. A., Lugowska, E., Regnier, F., *Electrophoresis* 2001, *22*, 3736-3743.

[126] Slentz, B. E., Penner, N. A., Regnier, F. E., *J. Chromatogr. A* 2002, *948*, 225-233.

[127] De Pra, M., De Malsche, W., Desmet, G., Schoenmakers, P. J., Kok, W. T., *J. Sep. Sci.* 2007, *30*, 1453-1460.

[128] He, B., Tait, N., Regnier, F., *Anal. Chem* 1998, *70*, 3790-3797.

[129] Guillarme, D., Ruta, J., Rudaz, S., Veuthey, J.-L., *Anal. Bioanal. Chem.* 2010, *397*, 1069-1082.

[130] Fonverne, A., Ricoul, F., Demesmay, C., Delattre, C.*, et al.*, *Sensor. Actuat. B-Chem.* 2008, *129*, 510-517.

[131] De Malsche, W., Clicq, D., Verdoold, V., Gzil, P.*, et al.*, *Lab. Chip.* 2007, *7*, 1705-1711.

[132] Jemere, A. B., Oleschuk, R. D., Harrison, D. J., *Electrophoresis* 2003, *24*, 3018-3025.

[133] Ro, K. W., Chang, W.-J., Kim, H., Koo, Y.-M., Hahn, J. H., *Electrophoresis* 2003, *24*, 3253-3259.

[134] Jung, S., Höltzel, A., Ehlert, S., Mora, J.-A.*, et al.*, *Anal. Chem* 2009, *81*, 10193-10200.

[135] Ehlert, S., Kraiczek, K., Mora, J.-A., Dittmann, M.*, et al.*, *Anal. Chem* 2008, *80*, 5945-5950.

[136] Jung, S., Ehlert, S., Mora, J.-A., Kraiczek, K.*, et al.*, *J. Chromatogr. A* 2009, *1216*, 264-273.

[137] Sajonz, P., Schafer, W., Gong, X., Shultz, S.*, et al.*, *J. Chromatogr. A* 2007, *1145*, 149-154.

[138] Sancho, R., Minguillon, C., *Chem. Soc. Rev.* 2009, *38*, 797-805.

[139] Park, J., Lee, D., Kim, W., Horiike, S.*, et al.*, *Anal. Chem* 2007, *79*, 3214-3219.

[140] Zheng, S., Ross, E., Legg, M. A., Wirth, M. J., *J. Am. Chem. Soc.* 2006, *128*, 9016-9017.

[141] Gaspar, A., Piyasena, M. E., Gomez, F. A., *Anal. Chem* 2007, *79*, 7906-7909.

[142] Amparo, C.-M., José, M. H.-M., Carlos, M.-F., Ernesto, F. S.-A., *Electrophoresis* 2008, *29*, 4399-4406.

[143] Aggarwal, P., Tolley, H. D., Lee, M. L., *J. Chromatogr. A* 2012, *1219*, 1-14.

[144] Augustin, V., Jardy, A., Gareil, P., Hennion, M. C., *J. Chromatogr. A* 2006, *1119*, 80-87.

[145] Svec, F., *Electrophoresis* 2009, *30*, S68-S82.

[146] Svec, F., *Journal of Chromatography B* 2006, *841*, 52-64.

[147] Zou, H., Huang, X., Ye, M., Luo, Q., *J. Chromatogr. A* 2002, *954*, 5-32.

[148] Popp, M., Sulyok, M., Rosenberg, E., *J. Sep. Sci.* 2007, *30*, 2888-2899.

[149] Huo, Y., Schoenmakers, P. J., Kok, W. T., *J. Chromatogr. A* 2007, *1175*, 81-88.

[150] Roux, R., Abi Jaoudé, M., Demesmay, C., *J. Chromatogr. A* 2009, *1216*, 3857-3863.

[151] Sanchez, C., Belleville, P., Popall, M., Nicole, L., *Chem. Soc. Rev.* 2011, *40*, 696-753.

[152] Abi Jaoudé, M., Randon, J., Bordes, C., Lanteri, P., Bois, L., *Anal. Bioanal. Chem.* 2012, 1-11.

[153] Allen, D., El Rassi, Z., *Electrophoresis* 2003, *24*, 3962-3976.

[154] Morishima, K., Bennett, B. D., Dulay, M. T., Quirino, J. P., Zare, R. N., *J. Sep. Sci.* 2002, *25*, 1226-1230.

[155] Ishizuka, N., Kobayashi, H., Minakuchi, H., Nakanishi, K.*, et al.*, *J. Chromatogr. A* 2002, *960*, 85-96.

[156] Moliner-Martínez, Y., Molins-Legua, C., Verdú-Andrés, J., Herráez-Hernández, R., Campíns-Falcó, P., *J. Chromatogr. A.* 2011, *1218*, 6256-6262.

[157] Beneito-Cambra, M., Herrero-Martínez, J. M., Ramis-Ramos, G., Lindner, W., Lämmerhofer, M., *J. Chromatogr. A* 2011, *1218*, 7275-7280.

[158] Yan, L.-J., Zhang, Q.-H., Feng, Y.-Q., Zhang, W.-B.*, et al.*, *J. Chromatogr. A* 2006, *1121*, 92-98.

[159] www.merckmillipore.fr, consulté le 28/06/2012.

[160] Nakanishi, K., Minakuchi, H., Soga, N., Tanaka, N., *J. Sol-Gel. Sci. Techn.* 1998, *13*, 163-169.

[161] Nakanishi, K., Soga, N., *B. Chem. Soc. Jap.* 1997, *70*, 587-592.

[162] Ishizuka, N., Minakuchi, H., Nakanishi, K., Soga, N.*, et al.*, *Anal. Chem* 2000, *72*, 1275-1280.

[163] Ishida, A., Yoshikawa, T., Natsume, M., Kamidate, T., *J. Chromatogr. A* 2006, *1132*, 90-98.

[164] Giordano, B. C., Terray, A., Collins, G. E., *Electrophoresis* 2006, *27*, 4295-4302.

[165] Hjerten, S., Liao, J. L., Zhang, R., *J. Chromatogr.* 1989, *473*, 273-275.

[166] Karenga, S., El Rassi, Z., *Electrophoresis* 2011, *32*, 90-104.

[167] Okanda, F. M., El Rassi, Z., *Electrophoresis* 2005, *26*, 1988-1995.

[168] Karenga, S., El Rassi, Z., *J. Sep. Sci.* 2008, *31*, 2677-2685.

[169] Karenga, S., El Rassi, Z., *Electrophoresis* 2010, *31*, 3192-3199.

[170] Fintschenko, Y., Choi, W.-Y., Ngola, S., Shepodd, T., *Fresen. J. Anal. Chem.* 2001, *371*, 174-181.

[171] Ericson, C., Holm, J., Ericson, T., Hjertén, S., *Anal. Chem* 1999, *72*, 81-87.

[172] Gustafsson, O., Mogensen, K. B., Ohlsson, P. D., Liu, Y.*, et al.*, *J. Mech. Eng.* 2008, *18*, 1-7.

[173] Shediac, R., Ngola, S. M., Throckmorton, D. J., Anex, D. S.*, et al.*, *J. Chromatogr. A* 2001, *925*, 251-263.

[174] Yu, C., Davey, M. H., Svec, F., Frechet, J. M. J., *Anal. Chem* 2001, *73*, 5088-5096.

[175] Yu, C., Svec, F., Frechet, J. M. J., *Electrophoresis* 2000, *21*, 120-127.

[176] Watson, M. W. L., Mudrik, J. M., Wheeler, A. R., *Anal. Chem* 2009, *81*, 3851-3857.

[177] Zeng, H.-L., Li, H.-F., Wang, X., Lin, J.-M., *Talanta* 2006, *69*, 226-231.

[178] Zeng, H.-L., Li, H.-F., Lin, J.-M., *Anal. Chim. Acta.* 2005, *551*, 1-8.

[179] Faure, K., Blas, M., Yassine, O., Delaunay, N.*, et al.*, *Electrophoresis* 2007, *28*, 1668-1673.

[180] Robotti, K. M., Yin, H., Brennen, R., Trojer, L., Killeen, K., *J. Sep. Sci.* 2009, *32*, 3379-3387.

[181] Levkin, P. A., Eeltink, S., Stratton, T. R., Brennen, R.*, et al.*, *J. Chromatogr. A* 2008, *1200*, 55-61.

[182] Deverell, T. R., Jason A. Smith, Allan J. Canty, Rosanne M. Guijt, *Sensor. Actuat. B-Chem.* 2010, *155*, 388-396.

[183] Ro, K. W., Liu, J., Knapp, D. R., *J. Chromatogr. A* 2006, *1111*, 40-47.

[184] Stachowiak, T., Rohr, T., Hilder, E. F., Peterson, D.*, et al.*, *Electrophoresis* 2003, *24*, 3689-3693.

[185] Burdick, J. A., Peterson, A. J., Anseth, K. S., *Biomaterials* 2001, *22*, 1779-1786.

[186] Guthrie, J., Jeganathan, M., Otterburn, M., Woods, J., *Polym. Bull.* 1986, *15*, 51-58.

[187] Norman S, A., *J. Photchem. Photobio. A.* 1996, *100*, 101-107.

[188] Yagci, Y., Jockusch, S., Turro, N. J., *Macromolecules* 2010, *43*, 6245-6260.

[189] Crivello, J. V., Sangermano, M., *J. Polym. Sci. A1.* 2001, *39*, 343-356.

[190] Kasapoglu, F., Onen, A., Bicak, N., Yagci, Y., *Polymer* 2002, *43*, 2575-2579.

[191] Kahveci, M. U., Uygun, M., Tasdelen, M. A., Schnabel, W.*, et al.*, *Macromolecules* 2009, *42*, 4443-4448.

[192] Dulay, M. T., Choi, H. N., Zare, R. N., *J. Sep. Sci.* 2007, *30*, 2979-2985.

[193] Corrales, T., Catalina, F., Peinado, C., Allen, N. S., *J. Photchem. Photobio. A.* 2003, *159*, 103-114.

[194] Ledwith, A., Russell, P. J., Sutcliffe, L. H., *J. Am. Chem. Soc.* 1972, 1925-1928.

[195] Johnston, L. J., De Mayo, P., Wong, S. K., *J. Org. Soc.* 1984, *49*, 20-26.

[196] Jiang, X., Luo, X., Yin, J., *J. Photchem. Photobio. A.* 2005, *174*, 165-170.

[197] Decker, C., Jenkins, A. D., *Macromolecules* 1985, *18*, 1241-1244.

[198] Nischang, I., Brueggemann, O., Svec, F., *Anal. Bioanal. Chem.*. 2010, *397*, 953-960.

[199] Cantó-Mirapeix, A., Herrero-Martínez, J. M., Mongay-Fernández, C., Simó-Alfonso, E. F., *Electrophoresis* 2009, *30*, 599-606.

[200] Decker, C., Polymérisation sous rayonnement UV, Techniques de l'ingénieur - AM 3044 2000, pp. 1-14.

[201] Odian, G. G., Principles of polymerization, John Wiley and Sons, 2004, pp. 199-350.

[202] Decker, C., *Polym. Int.* 1998, *45*, 133-141.

[203] Bernabé-Zafón, V., Beneito-Cambra, M., Simó-Alfonso, E. F., Herrero-Martínez, J. M., *J. Chromatogr. A* 2010, *1217*, 3231-3237.

[204] Naghash, H. J., Mallakpour, S., *Iran. Poly. J.* 2004, *13*, 287-295.

[205] Ledwith, A., *Pure. Appl. Chem.* 1977, *49*, 431–441.

[206] Corrales, T., Catalina, F., Peinado, C., Allen, N. S.*, et al.*, *Polymer* 2002, *43*, 4591-4597.

[207] Lee, J. H., Prud'Homme, R. K., Aksay, I. A., *J. Mater. Res.* 2001, *16*, 3536-3544.

[208] Watts, D. C., *Dental Materials* 2005, *21*, 27-35.

[209] Decker, C., *Polym. Int.* 2002, *51*, 1141-1150.

[210] Scherzer, T., Decker, U., *Rad. Phys. Chem.* 1999, *55*, 615-619.

[211] Lecamp, L., Youssef, B., Bunel, C., Lebaudy, P., *Polymer* 1997, *38*, 6089-6096.

[212] Svec, F., Frechet, J. M. J., *Anal. Chem.* 1992, *64*, 820-822.

[213] Svec, F., Frechet, J. M. J., *Macromolecules* 1995, *28*, 7580-7582.

[214] Urban, J., Eeltink, S., Jandera, P., Schoenmakers, P. J., *J. Chromatogr. A* 2008, *1182*, 161-168.

[215] Nischang, I., Teasdale, I., Brüggemann, O., *J. Chromatogr. A* 2010, *1217*, 7514-7522.

[216] Eeltink, S., Hilder, E. F., Geiser, L., Svec, F.*, et al.*, *J. Sep. Sci.* 2007, *30*, 407-413.

[217] Hasegawa, G., Kanamori, K., Nakanishi, K., Yamago, S., *Polymer* 2011, *52*, 4644-4647.

[218] Grafnetter, J., Coufal, P., Tesarova, E., Suchankova, J.*, et al.*, *J. Chromatogr. A* 2004, *1049*, 43-49.

[219] Jiang, T., Jiskra, J., Claessens, H., Cramers, C., *J. Chromatogr. A* 2001, *923*, 215-227.

[220] Ngola, S. M., Fintschenko, Y., Choi, W. Y., Shepodd, T. J., *Anal. Chem* 2001, *73*, 849-856.

[221] Barrioulet, M. P., Delaunay-Bertoncini, N., Demesmay, C., Rocca, J. L., *Electrophoresis* 2005, *26*, 4104-4115.

[222] Waguespack, B. L., Hodges, S. A., Bush, M. E., Sondergeld, L. J., Bushey, M. M., *J. Chromatogr. A* 2005, *1078*, 171-180.

[223] Peters, E. C., Petro, M., Svec, F., Fréchet, J. M. J., *Anal. Chem* 1998, *70*, 2288-2295.

[224] Bernabé-Zafón, V., Beneito-Cambra, M., Simó-Alfonso, E. F., Ramis-Ramos, G., Herrero-Martínez, J. M., *Electrophoresis* 2009, *30*, 1929-1936.

[225] Szumski, M., Buszewski, B., *J. Sep. Sci.* 2009, *32*, 2574-2581.

[226] Greiderer, A., Trojer, L., Huck, C. W., Bonn, G. K., *J. Chromatogr. A* 2009, *1216*, 7747-7754.

[227] Badev, A., Abouliatim, Y., Chartier, T., Lecamp, L.*, et al.*, *J. Photchem. Photobio. A.* 2011, *222*, 117-122.

[228] Mattox, D. M., *Handbook of physical vapor deposition (PVD) processing*, William Andrew Pub 2010.

[229] Kumar, M., Ando, Y., *J. Nanosci. Nanotechno.* 2010, *10*, 3739-3758.

[230] Buchanan, D., *IBM. J. Res. Dev.* 1999, *43*, 245-264.

[231] Ma, K.-S., Reza, F., Saaem, I., Tian, J., *J. Mater. Chem.* 2009, *19*, 7914-7920.

[232] Saaem, I., Ma, K.-S., Marchi, A. N., LaBean, T. H., Tian, J., *ACS Applied Materials & Interfaces* 2010, *2*, 491-497.

[233] Nikolova, D., Dayss, E., Leps, G., Wutzler, A., *Surf. Interface. Anal.* 2004, *36*, 689-693.

[234] Tennico, Y. H., Koesdjojo, M. T., Kondo, S., Mandrell, D. T., Remcho, V. T., *Sensor. Actuat. B-Chem.* 2010, *143*, 799-804.

[235] Jonsson, C., Aronsson, M., Rundstrom, G., Pettersson, C.*, et al.*, *Lab. Chip.* 2008, *8*, 1191-1197.

[236] Sung, D., Shin, D. H., Jon, S., *Biosens. Bioelectron.* 2011, *26*, 3967-3972.

[237] Roy, S., Yue, C. Y., Lam, Y. C., Wang, Z. Y., Hu, H., *Sensor. Actuat. B-Chem.* 2010, *150*, 537-549.

[238] Roy, S., Yue, C. Y., *Plasma. Process. Polym.* 2011, *8*, 432-443.

[239] Zhang, J., Das, C., Fan, Z. H., *Microfluid. Nanofluid.* 2008, *5*, 327-335.

[240] Huang, W.-J., Chang, F.-C., Chu, P. P.-J., *Polymer* 2000, *41*, 6095-6101.

[241] Mecomber, J. S., Murthy, R. S., Rajam, S., Singh, P. N. D.*, et al.*, *Langmuir* 2008, *24*, 3645-3653.

[242] Yang, W., Ranby, B., *Macromolecules* 1996, *29*, 3308-3310.

[243] Pu, Q., Oyesanya, O., Thompson, B., Liu, S., Alvarez, J. C., *Langmuir* 2006, *23*, 1577-1583.

[244] Braun, D., Becker, K. H., *Product R&D* 1971, *10*, 386-388.

[245] Monroe, B. M., Weed, G. C., *Chem. Rev.* 1993, *93*, 435-448.

[246] Dankbar, D. M., Gauglitz, G., *Anal. Bioanal. Chem.* 2006, *386*, 1967-1974.

[247] Schneider, M. H., Tran, Y., Tabeling, P., *Langmuir* 2011, *27*, 1232-1240.

[248] Deng, J., Wang, L., Liu, L., Yang, W., *Prog. Polym. Sci.* 2009, *34*, 156-193.

[249] Deverell, J. A., Rodemann, T., Smith, J. A., Canty, A. J., Guijt, R. M., *Sensor. Actuat. B-Chem.* 2011, *155*, 388-396.

[250] Bai, H., Huang, Z., Yang, W., *J. Polym. Sci. A1.* 2009, *47*, 6852-6862.

[251] Deng, J.-P., Yang, W.-T., Rånby, B., *Macromol. Rapid. Comm.* 2001, *22*, 535-538.

[252] Wang, H., Brown, H. R., *J. Polym. Sci. A1.* 2004, *42*, 253-262.

[253] Wang, H., Brown, H. R., *Macromol. Rapid. Comm.* 2004, *25*, 1095-1099.

[254] Rendl, M., Bönisch, A., Mader, A., Schuh, K.*, et al.*, *Langmuir* 2011, *27*, 6116-6123.

[255] Stachowiak, T., Mair, D., Holden, T., Lee, L. J.*, et al.*, *J. Sep. Sci.* 2007, *30*, 1088-1093.

[256] Li, C., Yang, Y., Craighead, H. G., Lee, K. H., *Electrophoresis* 2005, *26*, 1800-1806.

[257] Flook, K., Agroskin, Y., Pohl, C., *J. Sep. Sci.* 2011, *34*, 2047-2053.

[258] Paull, B., Connolly, D., Currivan, s., *Analyst* 2012, *DOI: 10.1039/c0xx00000x*.

[259] Aydin, M., Arsu, N., *Prog. Org. Coat.* 2006, *56*, 338-342.

[260] Tasdelen Mehmet Atilla, K. V., Talinli Naciye, Yagci Yusuf, *Polymer* 2006, *47*, 7611-7614.

Chapitre II

Etudes préliminaires : choix d'un monolithe adapté à son support et mise en évidence des verrous technologiques

Ce chapitre a fait l'objet :

- **d'une publication** : "Electrochromatography in cyclic olefin copolymer microchips : A step towards field portable analysis". Y. Ladner, G. Crétier, K. Faure, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 8001-8008.
- **d'une communication orale** : "Electrochromatography on COC microchips using methacrylate monolith". K. Faure, Y. Ladner, G. Crétier, 25th International Symposium on Microscale BioSeparations, 21-25 Mars 2010, Prague, République tchèque.
- **d'une communication par affiche** : "Electrochromatographie en microsystème (µEC) : synthèse et caractérisation de phases stationnaires monolithiques dans des dispositifs plastiques". K. Faure, Y. Ladner, G. Crétier, Congrès francophone sur les techniques séparatives et les couplages, 30 Novembre – 03 Décembre 2009, Marseille, France.

Contexte

L'objectif de ce travail était la synthèse d'une phase stationnaire monolithique fortement rétentive dans un microsystème COC. L'utilisation des monomères lauryl acrylate (LA) [1] et lauryl méthacrylate (LMA) [2] permet l'incorporation de chaînes alkyles C_{12} capables de générer une forte rétention. Cependant, la synthèse de ce type de monolithe souffre d'un manque de reproductibilité et il existe peu de données relatives aux performances électrochromatographiques obtenues aussi bien en capillaire qu'en microsystème. Un développement supplémentaire doit donc être réalisé en capillaire avant que le transfert de la synthèse en microsystème soit envisagé. Le monolithe doit permettre des séparations électrochromatographiques dans une large gamme de composition de phase mobile. De plus, une étape de préconcentration en tête de colonne doit pouvoir être mise en place afin de diminuer les limites de détection et les rendre compatibles avec l'analyse d'échantillons réels.

Dans ce chapitre, nous présentons dans la section **II.1**, les détails techniques concernant les modes opératoires expérimentaux utilisés. Dans la section **II.2**, nous décrivons d'abord, au travers d'un manuscrit publié (article 1), le transfert de la synthèse d'un monolithe LMA/EDMA à base de porogènes organiques du format capillaire vers le format microsystème. Les performances de ce monolithe très hydrophobe y sont détaillées en fonction de la taille et de la rétention des solutés et ceci pour différentes compositions de phase mobile. Une simplification de l'étape d'injection en microsystème est aussi proposée. Dans la deuxième partie de la section **II.2**, une optimisation complémentaire de la synthèse du monolithe LMA/EDMA a été réalisée afin d'améliorer sensiblement les performances électrochromatographiques. Mais face aux difficultés rencontrées, nous nous sommes tournés dans la section **II.3** vers la mise en œuvre d'un monolithe à base d'hexyl acrylate (HA), de 1,3-butanediol diacrylate (BDDA) et de porogènes aqueux. Il est montré que ce monolithe HA/BDDA devrait permettre d'atteindre l'objectif visé à condition de résoudre certains verrous technologiques.

II.1. Matériels et méthodes

II.1.1. Synthèse des monolithes organiques en capillaire et en microsystème

II.1.1.1. Préparation du mélange de polymérisation

Pour la synthèse des monolithes organiques en capillaire et en microsystème, deux mélanges réactionnels ont été préparés (**Tableau II.1**). Les structures chimiques des différents monomères utilisés sont présentées en annexe 1.

Tableau II.1 : Composition des deux mélanges de polymérisation préparés.

	Mélange A	Mélange B
Monomère fonctionnel	Lauryl méthacrylate (LMA) [1]	Hexyl acrylate (HA) [1]
Agent réticulant	Ethylene diméthacrylate (EDMA) [1]	1.3-butanediol diacrylate (BDDA) [1]
Monomère chargé	Acide 2-acrylamidopropane sulfonique (AMPS) [1]	Acide 2-acrylamidopropane sulfonique (AMPS) [1]
Porogènes	1-propanol [1]/1.4-butanediol [1]	Acétonitrile (ACN) [3]/Ethanol[3]/ tampon phosphate ($NH_4H_2PO_4$)[2] 5 mM pH 6
Photoinitiateur	Benzoin methyl éther (BME) [1]	Benzoin methyl éther (BME) [1]

[1]Acros Organics (Geel, Belgique), [2]Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) et [3]Carlo Erba SDS (Peypin, France).

La préparation du mélange réactionnel doit être minutieuse afin d'ajuster précisément les proportions de chaque constituant. Une différence de 3% en volume sur la proportion en bon solvant peut engendrer une différence de 900 nm sur le diamètre des pores [3].

Une fois le mélange de polymérisation préparé, celui-ci doit être protégé de la lumière afin d'éviter toute dégradation du photoamorceur en radicaux libres pouvant engendrer un début de polymérisation. Le flacon est donc généralement recouvert d'un film d'aluminium.

Deux étapes importantes sont requises avant l'introduction du mélange de polymérisation dans le capillaire de silice ou dans le canal en COC :

1. une étape d'agitation doit être réalisée afin d'homogénéiser le mélange réactionnel. Une mauvaise homogénéité de la solution peut engendrer une structure monolithique hétérogène.
2. Le flacon doit être ensuite placé dans un bac à ultrasons afin de dégazer le mélange réactionnel. Cette étape cruciale permet, d'une part, d'assurer la bonne homogénéité du mélange, d'autre part, d'éliminer le dioxygène de l'air qui pourrait inhiber la polymérisation [4].

Le mélange réactionnel se conserve généralement 1 mois dans le congélateur à une température de -20°C et à l'abri de la lumière.

II.1.1.2. Synthèse des monolithes organiques photopolymérisés en capillaire

Le processus de synthèse d'un monolithe à l'intérieur d'un capillaire nécessite que ce dernier soit transparent aux UV. Tous les capillaires utilisés dans ce travail et fournis par la société CIL-Cluzeau Info Labo SA (Sainte-Foy-La-Grande, France) sont des capillaires de silice vierge revêtus d'un film Téflon. Ils ont un diamètre interne de 75 µm, un diamètre externe de 375 µm et une longueur de 40 cm.

Le remplissage des capillaires est effectué sous pression d'azote au moyen d'un système en inox de type Nanobaume™ (**Figure II.1**). Le mélange, contenu dans le flacon en verre, est poussé dans le capillaire par application d'une pression constante d'azote de 3 bars. Ce dispositif permet aussi de sécher le capillaire sous un flux d'azote (en conservant le flacon en verre vide).

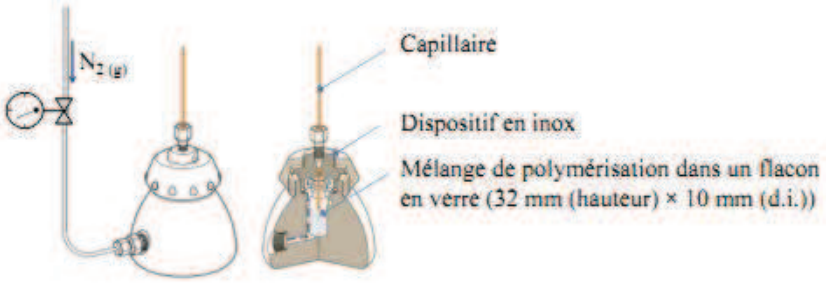


Figure II.1 : Représentation schématique du système de remplissage Nanobaume [5].

La photopolymérisation d'un monolithe à l'intérieur d'un capillaire nécessite au préalable un prétraitement ayant pour but la modification chimique des groupements silanols de la paroi du capillaire. Ce prétraitement permet d'augmenter les possibilités de liaisons entre les fonctions situées sur la paroi et le monolithe en formation afin d'assurer l'ancrage du monolithe aux parois. Cette modification de surface nécessite généralement 5 étapes :

1. rinçage du capillaire de silice vierge avec de la soude 1 M en solution dans un mélange eau/éthanol 50/50 (%v) pendant 15 minutes. Ceci entraîne une dépolymérisation locale du réseau silicate, l'élimination des impuretés et l'activation des groupements silanols libres (Si-OH).
2. rinçage du capillaire avec un mélange eau/éthanol 50/50 (%v) pendant 15 minutes pour ramener le pH à 7.
3. rinçage du capillaire par 0.5 % (%v) d'une solution de 3-(trimethoxysilylpropyl) méthacrylate (γ-MAPS) dans l'acide acétique 6 mM pendant 30 minutes. Ce réactif bifonctionnel, généralement appelé promoteur d'adhésion, réagit avec les groupements silanols de la paroi interne du capillaire. Les fonctions vinyliques ainsi immobilisées à la surface permettent par la suite l'accrochage covalent du réseau polymère à la paroi interne du capillaire.
4. rinçage du capillaire à l'éthanol pendant 10 minutes pour éliminer tous les monomères résiduels.
5. séchage du capillaire sous flux d'azote pendant 15 minutes.

Le mélange réactionnel, préalablement agité et dégazé, est ensuite introduit dans le capillaire pendant 5 minutes, ce qui correspond à la percolation d'environ une dizaine de volume de capillaire. Les extrémités sont ensuite bouchées avec des bouchons de silicone et le capillaire est introduit dans un four UV Biolink (VWR International, Strasbourg, France) (**Figure II.2**) où la polymérisation s'initie. Cet appareil est équipé de 5 lampes UV de 8 watts chacune et calibrées à 365 nm. La synthèse est

réalisée à une intensité constante de 1,7 mW/cm^2. Seule l'influence du temps d'irradiation (ou de l'énergie) a été étudiée dans ce chapitre.

Figure II.2 : Photographie du four UV utilisé [6].

Après synthèse du monolithe, le capillaire est rincé à l'éthanol pendant 1h sous une pression de 50 bars générée par une pompe LC *LC-10AD* (Shimadzu, Marne la Vallée, France). Cette étape est importante car elle permet d'arrêter la polymérisation au cœur du monolithe en éliminant tous les monomères résiduels qui n'ont pas réagi. Un mauvais rinçage peut engendrer une structure monolithique hétérogène de faible perméabilité. Les capillaires sont ensuite stockés avec leurs extrémités plongées dans des flacons contenant le solvant de rinçage pour éviter le séchage de la phase stationnaire.

I.1.1.3. Synthèse des monolithes organiques photopolymérisés en microsystème COC

Les microsystèmes en COC utilisés sont commercialisés par Microfluidic Chipshop GmbH (Jena, Allemagne). Ils possèdent deux canaux et quatre réservoirs leur conférant ainsi une géométrie en croix (**Figure II.3**). Les canaux ont une géométrie carrée de 75 µm × 75 µm. Les réservoirs de type Luer permettant l'introduction des solutions, sont directement moulés dans le microsystème et sont classiquement repérés de la manière suivante : S pour l'échantillon (Sample), SW pour la poubelle de l'échantillon (Sample Waste), B pour l'éluant (Buffer) et BW pour la poubelle de l'éluant (Buffer Waste). I est défini comme l'intersection des deux canaux. La longueur de la branche de séparation (I-BW) est de 81 mm. Les branches I-SW et I-S mesurent 5 mm tandis que la branche I-B mesure 6 mm.

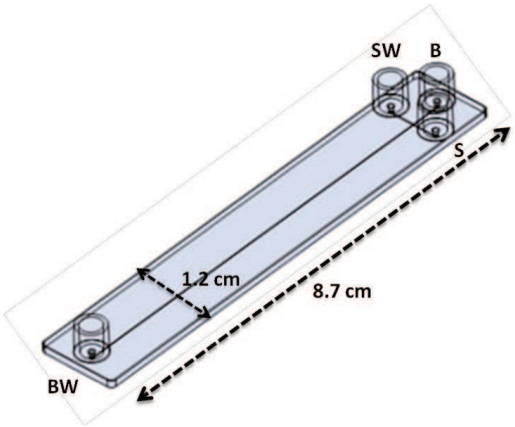


Figure II.3 : Microsystème COC fabriqué par Microfluidic Chipshop [7].

Contrairement aux capillaires de silice, la surface du COC n'est pas modifiée chimiquement avant la synthèse du monolithe. L'introduction du mélange de polymérisation dans les microcanaux est réalisée par l'intermédiaire d'une seringue présentant un embout de type Luer compatible avec la géométrie des réservoirs. Les microcanaux sont abondamment rincés avec le mélange de polymérisation afin d'éliminer toute impureté et toute bulle d'air pouvant perturber la polymérisation. Le microsystème est ensuite introduit dans le four UV où la synthèse du monolithe est réalisée à 365 nm. Tous les monolithes synthétisés en microsystème dans ce chapitre ont été irradiés à une intensité constante de 1.7 mW/cm^2. Tout comme en capillaire, l'influence du temps de polymérisation t (de l'énergie W d'irradiation) a été étudiée en microsystème.

II.1.2. Evaluation des performances séparatives des monolithes organiques par électrochromatographie

II.1.2.1. Electrochromatographie en capillaire

II.1.2.1.1. Instrument utilisé

Les étapes de rinçage post-synthèse et l'évaluation des performances électrochromatographiques du monolithe sont réalisées au moyen d'un appareil HP3DCE (Agilent, Massy, France) qui est équipé d'un détecteur UV à barrette de diodes (190-600 nm) et d'un générateur de tension (**Figure II.4**). La tension délivrée peut être fixée entre – 30 kV et + 30 kV.

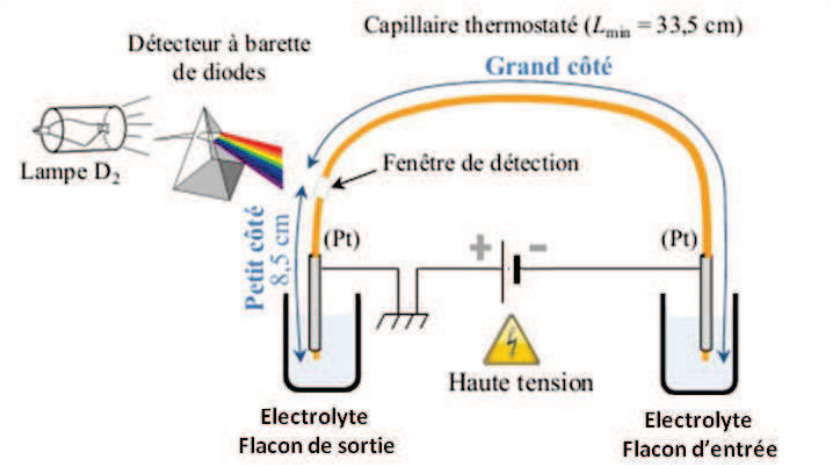


Figure II.4 : Représentation schématique d'un appareillage d'électrophorèse [5].

La configuration de l'appareillage d'électrophorèse impose une longueur minimale totale de capillaire de 33,5 cm. La synthèse des monolithes est donc généralement réalisée dans des capillaires de 40 cm qui sont recoupés après synthèse pour s'affranchir des structures gélifiées formées aux extrémités du capillaire sur quelques millimètres, ceci à cause de la présence de dioxygène.

Les séparations sont réalisées sur le petit côté du capillaire et la longueur de séparation est de 8,5 cm. L'application d'un champ électrique de - 910 V/cm entre les flacons de sortie et d'entrée permet

de faire migrer l'électrolyte dans le capillaire par électroosmose. Les solutés sont injectés électrocinétiquement à partir d'un flacon d'échantillon placé en sortie en appliquant un champ électrique de - 120 V/cm pendant 5 s. Toutes les étapes de rinçage et d'analyse sont réalisées à 25°C.

II.1.2.1.2. Etape de rinçage post-synthèse

Après l'étape de rinçage post-synthèse à l'éthanol à l'aide de la pompe LC, le capillaire est rincé à l'éthanol à l'aide de l'appareil d'électrophorèse sous une pression de 7 bars durant 2 heures. La fenêtre de détection est créée sous l'effet des irradiations UV qui entraîne une dégradation du monolithe [8]. La formation de cette zone vide est nécessaire pour améliorer la sensibilité de détection car le bruit de fond observé en détectant à travers le monolithe dont la matrice acrylate génère une forte absorption UV serait trop important. Ensuite, le capillaire est rincé puis équilibré avec une phase mobile ACN/eau 70/30 (%v) + 5 mM Lithium dodecyl sulfate (LiDS) + 2 mM $NH_4H_2PO_4$ sous une pression de 7 bars et un champ électrique de - 750 V/cm. La durée de cette étape est en moyenne de 30 minutes, ce qui correspond au temps moyen nécessaire à l'obtention d'un courant et d'une ligne de base stables. Cependant, cette durée de rinçage peut varier suivant la morphologie et la mobilité électroosmotique du monolithe. Ce temps est d'autant plus court que la mobilité électroosmotique est grande.

II.1.2.1.3. Evaluation des performances électrochromatographiques du monolithe

La mobilité électroosmotique μ_{eo}, les facteurs de rétention k_i et l'efficacité N sont évalués pour chaque monolithe synthétisé. Ces trois grandeurs permettent de définir les performances électrochromatographiques du monolithe. La valeur de la mobilité électrosmotique μ_{eo} est obtenue en injectant l'acétone qui est une molécule supposée non-retenue par le monolithe (détection à 254 nm). Pour définir les deux autres grandeurs, trois familles de solutés sont injectées :

- les alkylbenzènes (détection à 214 nm) sont utilisés pour observer l'influence de la longueur de la chaine alkyl hydrophobe sur les performances électrochromatographiques du monolithe.
- les hydrocarbures aromatiques polycycliques ou HAP (détection à 254 nm) sont injectés pour observer l'influence du nombre de cycles aromatiques et donc de la taille du soluté sur les performances électrochromatographiques du monolithe.
- les pesticides (détection à 214 nm) sont injectés afin d'évaluer la capacité du monolithe à séparer des solutés ayant des rétentions très proches.

Tous les solutés proviennent de Sigma-Aldrich et sont solubilisés dans un mélange ACN/eau de composition identique à celle de la phase mobile utilisée. Leurs structures chimiques sont présentées en annexe 2.

Toutes les phases mobiles utilisées contiennent du dodecylsulfate de lithium (LiDS). Le surfactant LiDS est introduit dans la composition de la phase mobile afin d'éviter un assèchement du monolithe quand la phase mobile devient plus riche en eau.

La mobilité électroosmotique μ_{eo} est calculée à partir de la pente de la droite représentant l'évolution de la vitesse linéaire du marqueur de temps mort (acétone) en fonction du champ électrique appliqué (**Figure II.5**). La vitesse linéaire est déterminée en calculant le rapport de la longueur de séparation au temps de migration de l'acétone.

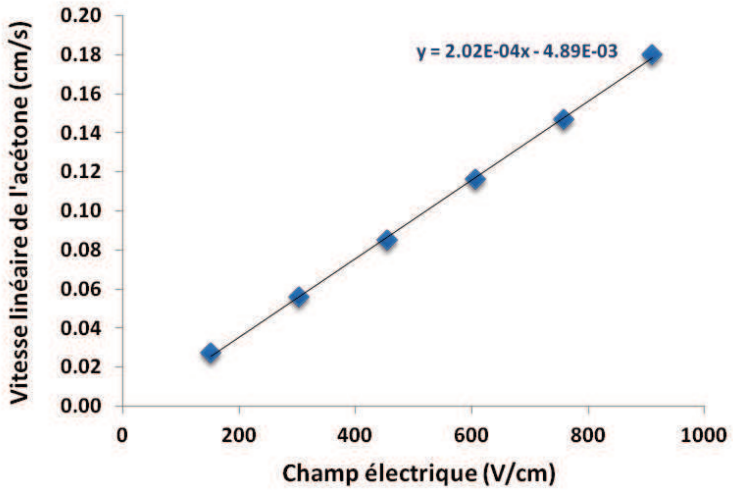


Figure II.5 : Graphique permettant de calculer la mobilité électroosmotique μ_{eo}. Phase mobile: ACN/eau 70/30 (v/v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$. Monolithe HA/BDDA.

II.1.2.2. Electrochromatographie en microsystème

II.1.2.2.1. Instrument utilisé

Les étapes de rinçage post-synthèse et l'évaluation des performances électrochromatographiques du monolithe en microsystème sont réalisées au moyen d'un dispositif comprenant un générateur de tension et un microscope inversé.

Un potentiostat programmable (Micralyne, Canada) a été utilisé pour appliquer les tensions (0 à 6 kV) au niveau de chacun des puits du microsystème par l'intermédiaire d'électrodes en platine. Tous les programmes de potentiels, la visualisation des injections électrocinétiques et l'enregistrement de données sont contrôlés à partir du logiciel Labview 7.1 (National Instrument, Austin, Texas, USA).

Le microscope inversé (IX 71, Olympus, France) permet de détecter les solutés migrant à l'intérieur des canaux du microsystème (**Figure II.6**).

Figure II.6 : Photographie du microscope inversé Olympus IX 71 et représentation schématique du système optique [9].

La lumière fluorescente, générée par la lampe à vapeur de mercure (non représentée sur la **figure II.6**) et focalisée par un condenseur **(1)**, arrive sur un cube de filtres **(2)** transmettant la lumière à une longueur d'onde d'excitation caractéristique du fluorophore présent dans le canal du microsystème **(3).** Ce fluorophore émet ensuite une lumière fluorescente dans toutes les directions de l'espace qui est collectée par un détecteur CCD (Charge Coupled Device) **(4)**. Le détecteur CCD est constitué d'une surface photosensible plane qui est dopée de manière à acquérir des propriétés photoélectriques, c'est à dire qu'un photon incident est susceptible d'y produire une charge électrique. Le logiciel NI Vision (Alliance Vision, Montélimar, France) transcrit ce signal électrique en un signal numérique qui permet de visualiser l'électrochromatogramme sur le logiciel Azur (AzurConcept, Launaguet, France).

Plusieurs grossissements peuvent être utilisés afin d'adapter la zone de détection à la dimension du canal : ×4, ×10 et ×20. La roulette focus **(5)** permet de régler la netteté de l'image observée sur l'écran de l'ordinateur.

Les cubes de filtres jouent un rôle important dans l'optimisation de la détection. Le filtre d'excitation positionné à incidence normale de la lumière générée par la lampe à vapeur de mercure, transmet cette lumière à une longueur d'onde d'excitation λ_{ex} caractéristique du fluorophore (**Figure II.7**). Cette lumière excitatrice est transmise par un miroir dichroïque placé à 45° jusqu'au fluorophore présent dans le canal du microsystème. Le miroir dichroïque réfléchit les longueurs d'onde inférieures ou supérieure à la longueur d'onde de coupure λ_c et transmet les longueurs d'onde égale à λ_c. Le fluorophore ainsi excité émet, dans toutes les directions de l'espace, une lumière fluorescente à une longueur d'onde d'émission λ_{em} supérieure à celle de la lumière excitatrice λ_{ex}. Cette lumière émise traverse le miroir dichroïque, puis passe au travers d'un filtre d'arrêt, qui transmet les longueurs d'onde égale ou supérieures à λ_{em} et empêche la lumière visible de contribuer à l'information d'image. Enfin, cette lumière émise est collectée par le détecteur CCD.

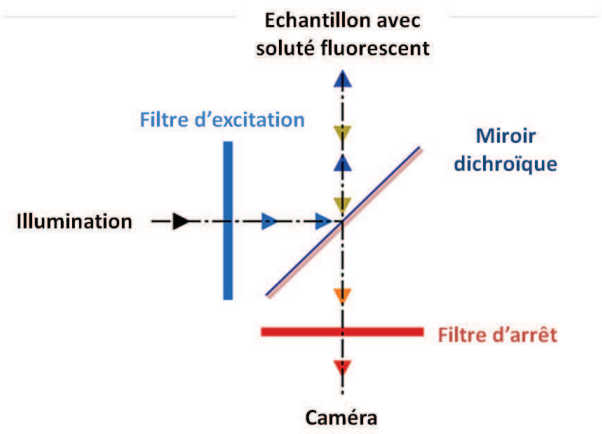


Figure II.7 : Schéma d'un cube de filtre.

Différents cubes de filtres peuvent être utilisés suivant le type de solutés analysé (**Tableau II.2**) :

Tableau II.2 : Liste des cubes de filtres utilisés

solutés	λ_{ex} (nm)	λ_c (nm)	λ_{em} (nm)
HAP	330	330-390	>400
Amines primaires	400	> 430	> 500

II.1.2.2.2. Etape de rinçage post-synthèse

Après synthèse du monolithe, le microsystème en COC est abondamment rincé avec une phase mobile ACN/eau 85/15 (%v) + 2 mM $NH_4H_2PO_4$ + 5 mM LiDS pendant 30 minutes en appliquant un champ électrique suffisamment important pour qu'il y ait un courant de quelques microampères dans chaque canal du microsystème. La durée de cette étape est en moyenne de 30 minutes, temps nécessaire à l'obtention d'un courant et d'une ligne de base stables. Les microsystèmes non utilisés sont conservés dans l'éthanol pour éviter l'assèchement du monolithe.

II.1.2.2.3. Evaluation des performances électrochromatographiques du monolithe

Contrairement à ce qui est fait en format capillaire, seuls les HAP sont injectés en microsystème pour évaluer les performances électrochromatographiques du monolithe car, parmi nos solutés tests, ce sont les seuls qui sont naturellement fluorescents.

Les facteurs de rétention, la mobilité électroosmotique et la vitesse linéaire de la phase mobile ne sont pas évalués en raison de l'absence d'un marqueur de temps mort fluorescent. Il est donc impossible de représenter classiquement la courbe de van Deemter par H = f ($\bar{u}$). Cependant, comme la vitesse linéaire de la phase mobile est directement proportionnelle au champ électrique de séparation, les courbes de van Deemter en microsystème sont représentées par la variation de la hauteur équivalente à un plateau théorique en fonction du champ électrique de séparation (H = f(E)).

II.1.3. Caractérisations morphologiques des monolithes organiques

La microscopie électronique à balayage est utilisée pour observer la morphologie structurale du monolithe. Une observation de l'homogénéité de la structure ainsi que de l'ancrage du monolithe aux parois est réalisée pour chaque monolithe synthétisé. Une estimation de la taille des nodules est également faite.

Les clichés MEB ont été obtenus avec un appareil Neoscope JCM-5000 (Jeol, Tokyo, Japon) (**Figure II.8**). Les observations sont faites directement sur des coupes transversales de capillaire ou de microsystème. Ces coupes sont effectuées à l'aide d'une lame céramique pour les capillaires et d'une disqueuse et d'un cutter pour les microsystèmes. Les échantillons coupés, d'une épaisseur inférieure à 5 mm, sont tout d'abord fixés sur un support avec de la laque argent. Un dépôt d'une couche conductrice d'or à la surface du support est ensuite réalisé à l'aide d'un métalliseur par pulvérisation cathodique. Ceci est nécessaire pour limiter les phénomènes de charge à la surface du matériau non-conducteur.

Figure II.8 : Photographie du MEB Jeol Neoscope JCM-5000 [10].

L'observation de l'homogénéité de la structure monolithe et de l'ancrage du monolithe aux parois du capillaire ou du microsystème est réalisée respectivement avec un grossissement de ×1100 et ×5000 (**Figure II.9**). La taille des nodules est déterminée en calculant la moyenne d'au moins 10 nodules sur différentes parties du monolithe à partir des images MEB obtenues avec un grossissement ×5000. L'incertitude de mesure de la taille des nodules est de ± 0.01 µm. La structure du monolithe est considérée comme homogène quand le coefficient de variation (CV) obtenu sur l'estimation de la taille des globules est inférieur à 3 %. Toutes les analyses MEB sont réalisées sous une tension de filament de 5 ou 10 kV.

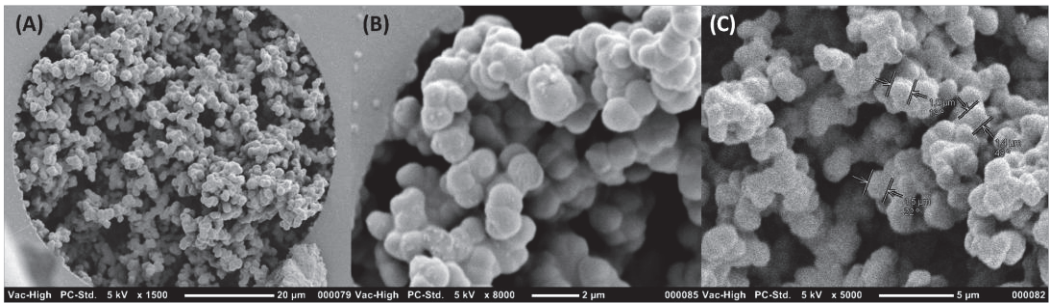


Figure II.9 : Images MEB d'un monolithe méthacrylate synthétisé en capillaire. (A) Grossissement ×1100 pour l'observation générale de la structure monolithe, (B) Grossissement ×5000 pour observer la qualité de l'ancrage du monolithe au paroi et (C) pour mesurer la taille des nodules.

II.2. Synthèse d'une phase stationnaire monolithique à base de porogènes organiques : monolithe LMA/EDMA

II.2.1. Article 1 : Electrochromatography in cyclic olefin copolymer microchips : a step towards field portable analysis

Cette section est présentée sous forme d'une publication qui décrit l'optimisation de la synthèse d'un monolithe organique à base de monomères lauryl méthacrylate (LMA) et d'éthylène diméthacrylate (EDMA) en capillaire, puis le transfert de cette synthèse en microsystème. Le monomère LMA a été choisi afin de générer une structure monolithique présentant de longues chaines alkyles hydrophobes (C_{12}). Le but est d'obtenir un monolithe organique qui soit très rétentif vis-à-vis des solutés apolaires.

L'introduction du LMA dans la composition du mélange de polymérisation (noté mélange A dans le tableau **II.1**) nécessite l'utilisation de porogènes organiques permettant de solubiliser ce monomère. Les porogènes 1,4-butanediol et 1-propanol ont été préférés au dodécanol et au cyclohexanol en raison de leur faible viscosité, ce qui facilite leur introduction dans les microcanaux en COC. Les proportions de chaque constituant du mélange **A** nécessaire à la synthèse de ce monolithe ont été optimisées à partir des travaux du groupe de Herrero-Martinez [2, 11, 12].

Tout d'abord, le travail expérimental a été réalisé en format capillaire pour caractériser la robustesse de la synthèse, pour montrer l'influence du temps de polymérisation sur les performances séparatives du monolithe et pour étudier le comportement du monolithe à différentes compositions de phase mobile.

Ensuite, la synthèse du monolithe a été transférée en format microsystème. La comparaison des performances électrochromatographiques du monolithe LMA obtenues en capillaire et en microsystème montre que le transfert n'a altéré ni les efficacités, ni les sélectivités. D'autre part, un nouveau mode d'injection (injection directe) a été développé afin de simplifier l'étape d'injection en microsystème et de rendre l'outil analytique plus compatible avec l'analyse-sur-site. Ce mode d'injection simple permet d'obtenir des performances similaires à celles obtenues en injection classique (injection dynamique).

Journal of Chromatography A, 1217 (2010) 8001–8008

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma

Electrochromatography in cyclic olefin copolymer microchips: A step towards field portable analysis

Y. Ladner, G. Crétier, K. Faure*

Laboratoire des Sciences Analytiques, UMR UCBL - CNRS 5180, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, 43 boulevard du 11 Novembre 1918, bâtiment Curien, 69622 Villeurbanne, France

ARTICLE INFO

Article history:
Available online 11 August 2010

Keywords:
Methacrylate monolith
Cyclic olefin copolymer
Microchip electrochromatography

ABSTRACT

In order to develop a portable and disposable instrument for on-site analysis of neutral compounds, a lauryl methacrylate monolith has been synthesized into a cyclic olefin copolymer microdevice for reversed-phase electrochromatography purposes. This monolith was tested in capillary to evaluate electrochromatographic performances in terms of electroosmotic flow (EOF) mobility, retention and efficiency prior to its transfer into the microfluidic device. The produced monolithic bed exhibited a good run-to-run repeatability, column-to-column reproducibility and batch-to-batch reproducibility, with relative standard deviation (RSD) values below 9% for EOF mobility, retention factors and heights of theoretical plate. The electrochromatographic performances of the monolith were optimized by reducing irradiation time. Photopolymerization time of 10 min was found to be the best process in order to obtain a robust, retentive and efficient system. The on-chip performances of this monolith were evaluated in detail for the reversed-phase electrochromatographic separation of polycyclic aromatic hydrocarbons, with plate heights reaching down to 15 μm when working at optimal velocity. Aiming at the maximum simplification of instrumental fabrication and operation, a direct injection from a 2 μL droplet was compared with more conventional dynamic injection process.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In the large domain of analytical sciences, the field of action sometimes needs to come out from the labs to meet the sampling point. To carry out an efficient analytical strategy on the field requires a simple analytical method that can be accessed by non-chemists and a portable instrumentation eventually disposable to avoid cross contamination. On-site electrophoresis techniques have already been developed for the separation of charged compounds. Typical examples of such on-site microsystems are the instrument conceived by Crockett et al. [1,2] for the analysis of explosives in soil or the Mars organic analyzer developed by Mathies' group [3,4].

If zone electrophoresis [5] and micellar electrokinetic chromatographic (MEKC) [6,7] are well suited techniques for miniaturisation, the robust separation of neutral solutes requires an interactive stationary phase for chromatographic separation. In literature, two strategies are considered for the implementation of chromatography in microfluidic chip: a "top-down" method consists in the miniaturisation of conventional liquid chromatography (LC) instruments and will use pressure as the liquid driving force (chip-LC) [8,9], while the "bottom-up" idea is the use of a stationary phase in microchip by employing electroosmosis mechanism to bring the fluids into movement (chip electrochromatographic or chip-EC) [10]. One company (Agilent) now markets a chip-LC instrument based on a polyimide device that integrates a trapping column, separation column, and electrospray source [11]. However, the chip-LC system uses conventional LC pumps and a modified injection valve. These features make the overall instrument non-portable and non-disposable.

The chip-EC approach, by implementing both injection and separation within the very same device, is suitable for single use, especially if the device is cost effective. Moreover, the driving force is generated by two electrodes and a power supply, which is easily portable. Therefore, implementing electrochromatography in plastic device seems to be a good strategy to realize an on-site analyzer for neutral solutes.

The advantages of polymer-based microfluidic devices include the reduced costs, relative ease of fabrication and availability of a wide range of plastics with different properties [12,13]. As a rigid polymer, poly(methyl methacrylate) (PMMA) has been particularly useful for microfluidic chips with the features of low price, high optic transparency, and excellent electric and mechanical properties [14]. However, it is not compatible with chromatography organic solvents. Cyclic olefin copolymer (COC) is of particular interest due to its combination of excellent UV transparency, low

* Corresponding author. Tel.: +33 472431078.
E-mail address: karine.faure@univ-lyon1.fr (K. Faure).

0021-9673/$ – see front matter © 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.chroma.2010.07.076

autofluorescence, high mechanical strength and compatibility with a broad range of chemicals and solvents [15,16].

Various stationary phases have been incorporated in microchip for electrochromatography purposes, such as particle [17], collocated monolith support structures (COMOSS) [10,18] and monoliths [19–21]. The porous polymer monolithic materials that have emerged in the early 1990s [22,23], have become popular as stationary phases for LC and capillary electrochromatography (CEC) [24]. One of the advantages of monoliths over packed materials is the ease of preparation and non-requirement of frits [21,25,26]. The first syntheses of organic monoliths for chip-EC purposes were carried out in glass chips [19,27–30]. The main challenge in the synthesis of monolithic columns in COC device is that the hydrophobic nature of the material requires that there is no water in the polymerization mixture. The introduction of aqueous solutions in COC microchannel is difficult and results in non-homogeneous monolith despite all precautions. On the contrary, non-aqueous porogenic solvent leads to highly homogeneous monolithic structure. In a previous paper [31], we demonstrated that an acrylate-based monolith could be synthesized *in situ* in COC microchannels and subsequently used as an efficient stationary phase for electrochromatography of hydrophobic compounds. Separation of non-polar compounds was obtained through a reversed-phase behavior, with relatively good efficiencies. However, reproducibility issues were highlighted, mainly due to the presence of volatile methanol in the polymerization mixture. A formulation based on 1-propanol and 1,4-butanediol as non-aqueous porogens was first introduced by Huo and colleagues in 2007 [32] and developed further on by Herrero-Martinez's group [33–36]. These two solvents were preferred in our work to conventional dodecanol/cyclohexanol system because their low viscosity makes easier electrokinetic rinsing of microchannels after monolith synthesis. The monolith presented here is similar to the one developed by Herrero's group, except that a negative charge is incorporated to generate a cathodic electroosmotic flow. This formulation was tested in capillaries before implementation in the COC microsystem in order to evaluate electrochromatographic performances in terms of EOF mobility, solute retention and efficiency.

2. Experimental

2.1. Materials

Fused-silica capillaries with a UV-transparency coating and an inner diameter of 75 μm were purchased from CIL-Cluzeau Info Labo SA (Sainte-Foy-La-Grande, France). Lauryl methacrylate (LMA), 1,4-butanediol, 2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid (AMPS), ethylene dimethacrylate (EDMA) and benzoin methyl ether were obtained from Acros Organics (Noisy-Le-Grand, France). Sodium phosphate, lithium dodecyl sulfate (LiDS), various polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) (naphthalene, anthracene, fluoranthene, pyrene, benzo-a-anthracene and perylene), 3-trimethoxysilyl propyl methacrylate (Bindsilane), ammonium phosphate ($NH_4H_2PO_4$), sodium hydroxide (NaOH) and acetic acid (CH_3COOH) were from Sigma–Aldrich (Isle-d'Abeau, France). Acetonitrile and ethanol were HPLC-grade from SDS (Peypin, France). Concentrations of individual PAHs were chosen according to their fluorescence and absorbance in UV.

The microfluidic devices made of cyclic olefin copolymer (COC) was fabricated by Microfluidic Chipshop GmbH (Jena, Germany). Two types of microfluidic chips were used: the first one has a conventional two cross-intersecting channels and four reservoirs. Injection arms are 6 mm long. The second one is a single channel with two reservoirs only. In both cases, the length of separation channel is 81 mm and the channels are 75 μm deep by 75 μm wide. The chips are available with directly molded reservoirs. According to the literature, reservoirs will be defined as S (sample), SW (sample waste), buffer (B) and buffer waste (BW).

2.2. Instrumentation

The illumination system used to perform photopolymerization was a Bio-link cross-linker (VWR International, Strasbourg, France) equipped with five 8W UV tubes, emitting at 365 nm.

Capillary experiments were performed using Agilent^{3D} CE system equipped with DAD UV detector set up at 214 and 254 nm. An LC pump (Shimadzu LC 10AD, Tokyo, Japan) is used to rinse the capillary after its fabrication. Controls of the electrochromatographic system and data acquisition were carried out by Chemstation system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany).

Microchip analyses were monitored by inverted fluorescence microscopic system (IX-71, Olympus, France) equipped with a 100 W mercury lamp and 330 nm excitation filter (collection above 400 nm) (XF02-2, Omega, USA) for the detection of fluorescent PAH. A CCD camera was combined with NI Vision software (Alliance Vision, France) for detection processing. High-power supply (Micralyne, Canada) was used to apply electric fields to the microchannels through platinum electrodes placed in the reservoirs. All system operations were performed with Labview 7.1 (National Instrument, Austin, TX, USA).

2.3. Preparation of monolithic columns in capillary

Capillary pre-treatment procedure was carried out in order to enhance covalent attachment of the monolith to the capillary walls. The inner wall of the fused-silica capillary was rinsed with 1 M NaOH for 15 min to eliminate any impurities present in the capillary, then rinsed with a mixture of ethanol/water (50/50) and finally flushed with a 0.5% (v/v) solution of 3-(trimethoxysilyl) propyl methacrylate in 6 mM acetic acid for 30 min. Thereafter, the capillary was rinsed with water and dried under nitrogen stream. Polymerization mixture was introduced in pre-treated capillary under gas pressure (2 bar) for 10 min. The capillary ends were then sealed with silicon.

Polymerization mixture was prepared as follows. The porogenic mixture was made up of 55.2% (w/w) of 1-propanol and 4.8% (w/w) of 1,4-butanediol. Porogenic mixture was dissolved in monomer mixture containing 24% (w/w) of LMA and 16% (w/w) of EDMA. The ratio of monomer to porogenic mixtures was 40:60 (w/w). AMPS (0.25% (w/w) of monomers) is added in the polymerization mixture in order to support the electroosmotic flow. Benzoin methyl ether was used as radical photoinitiator (0.5% (w/w) of monomers). Photopolymerization was carried out at 365 nm for different irradiation times. After polymerization, the monolithic column was rinsed with ethanol using a LC pump to remove any remaining reactant. A UV detection window was created by depolymerisation of the monolith under exposure to a deuterium lamp, inside the CE instrument.

2.4. Preparation of monolithic columns in microchip

Unlike capillaries, COC microsystems were used as received without any pre-treatment. The microsystem was simply washed with 1-propanol to remove any impurity. The same polymerization mixture as in capillaries was then introduced in the microchannels by pressure using a syringe. The microchip was submitted to a subsequent irradiation at 365 nm for different irradiation times. Channels were then rinsed with methanol by applying an electric field of 402 V/cm to remove any remaining reactant. Cross-shaped channel chip was fully filled with monolith. Single channel chip was

fully filled and excedent monolith was scrapped off from reservoirs with a thin spatula.

2.5. Electrochromatography procedures in capillary

The electric field is applied over the capillary length (33 cm) and effective length is 8.5 cm. Before CEC runs, each monolithic column was placed in the CEC instrument and equilibrated with mobile phase 70/30 (v/v) ACN/water + 2 mM $NH_4H_2PO_4$ + 5 mM LiDS by applying a stepwise increase in voltage from 5 to 25 kV, until a stable baseline current was observed. Mobile phase was always prepared with a total concentration of 2 mM $NH_4H_2PO_4$ and 5 mM LiDS whatever the percentage of ACN. LiDS was introduced to avoid that the monolith dries when the percentage of water in mobile phase composition is important. The sample solution was electrokinetically injected at 5 kV for 5 s. All CEC runs were performed at 25 °C.

2.6. Electrochromatography procedures in microchip

The microchip was subsequently rinsed with mobile phase 70/30 (v/v) ACN/water + 2 mM $NH_4H_2PO_4$ + 5 mM LiDS for 30 min by applying an electrical field across every channel. The effective length can be modulated following the position of laser beam.

Two types of injection were used in this study: dynamic injection and simple direct injection. Dynamic injection is divided into three steps: pinched sampling, expansion and separation. Pinched injection was realized by applying 1 kV on sample reservoir S, while holding the other reservoirs B and BW respectively at 0.85 and 4.8 kV. SW remained at ground. This step allows the migration of all species into the channel cross-section without diffusion in the separation channel. During expansion, 1 kV is applied through sample reservoir while B, BW and SW were kept at ground in order to increase the injected volume. The injected volume can be modulated by the duration of the expansion step. In our study, we chose an 8 s expansion step at 1 kV, which seemed a good compromise between signal level and efficiency loss. During separation, 5 kV was applied to the buffer reservoir (B) while the buffer waste reservoir (BW) was kept at ground and the injection reservoirs S and SW were placed at 4.5 kV to avoid leakage phenomenon.

In the simple direct injection mode, a single electric field is applied across the separation channel. The configuration is similar to capillary since a single channel with inlet and outlet reservoirs was used. The main advantage of this method is to avoid voltage programming. This injection is composed of four steps: sampling step, injection, rinsing and separation step (Fig. 1). In the sampling step, a droplet of 2 μL of sample mixture is placed in the hole of the inlet reservoir. An electric field of 567 V/cm is then applied during several seconds to inject the sample mixture in the channel (injection step). The inlet reservoir is then fully washed with mobile phase which avoids sample leakage. Finally, an electric field of 567 V/cm is applied during separation step.

3. Results and discussion

3.1. Robustness of synthesis

Robustness of the monolith synthesis in capillary was evaluated in terms of long-term repeatability, capillary-to-capillary and batch-to-batch reproducibilities. This test was carried out on a 30 min photopolymerized monolith, with a standard mixture of 6 alkylbenzenes and a 70/30 (v/v) ACN/water + 2 mM $NH_4H_2PO_4$ + 5 mM LiDS mobile phase. As shown in Fig. 2, the six neutral compounds are effectively separated according to their relative hydrophobicity. Using this standardized test, long-term repeatability was determined by using the very same capillary

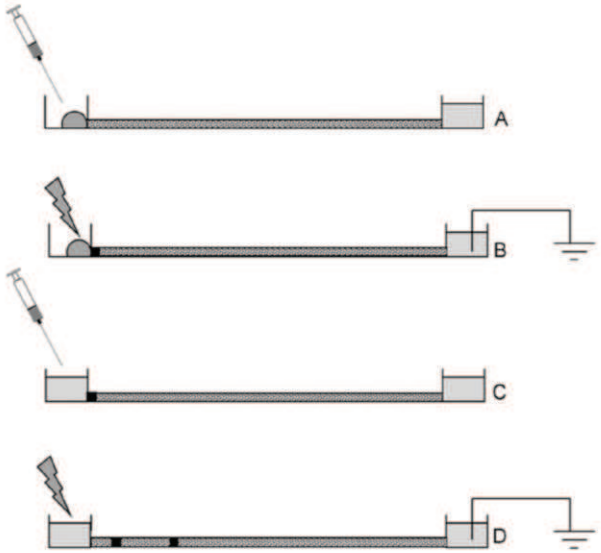


Fig. 1. Scheme of the simple direct injection. (A) Sampling step, (B) injection step, (C) rinsing step and (D) separation step.

over 30 days. Capillary-to-capillary reproducibility was determined for five columns prepared with the same polymerization mixture whereas batch-to-batch reproducibility was evaluated for eight columns prepared with different polymerization mixtures having the same composition.

The results obtained for these tests are presented in Table 1. Plate heights were in the range of 9 μm at 757 V/cm corresponding to the highest velocity reachable. Long-term repeatability test showed that analysis could be carried out for up to 30 days without any loss of performances. Indeed, EOF mobility, retention factors and plate heights relative standard deviations (RSD) are less than 8, 5 and 7% respectively. The capillary-to-capillary and batch-to-batch reproducibilities are also satisfactory since the RSD values for the three parameters are between 5 and 9%. Retention factors, EOF mobility and efficiency values indicate a suitable monolith manufactory process. These results prove that the monolith structure is robust over time and its synthesis highly reproducible.

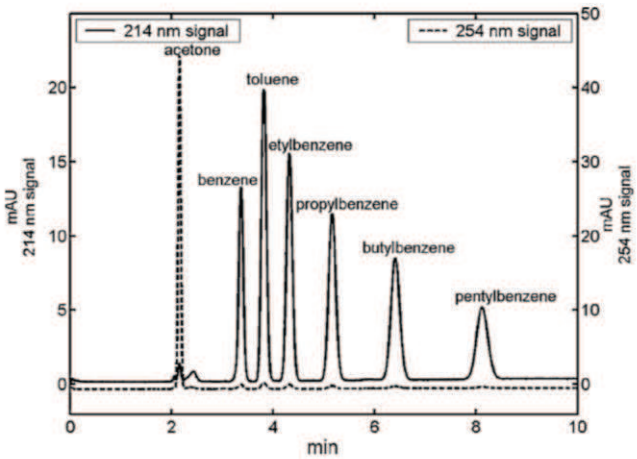


Fig. 2. Reversed-phase electrochromatographic separation of six alkylbenzenes. Separation field strength: 757 V/cm. Mobile phase: 70/30 (v/v) ACN/water + 2 mM $NH_4H_2PO_4$ + 5 mM LiDS. Benzene at 4.5 mM, toluene at 3.7 mM, ethylbenzene at 3.3 mM, propylbenzene at 2.9 mM, butylbenzene at 2.6 mM and pentylbenzene at 19 mM. Effective length: 8.5 cm.

Table 1
Long-term repeatability, capillary-to-capillary reproducibility and batch-to-batch reproducibility expressed in RSD on electroosmotic mobility (μ_{eo}), retention factors (k) and plate heights (H).

	Long-term repeatability		Capillary-to-capillary reproducibility		Batch-to-batch reproducibility	
	Mean	RSD (%)	Mean	RSD (%)	Mean	RSD (%)
μ_{eo} ($cm^2 V^{-1} s^{-1}$)	1.33×10^{-4}	8	1.44×10^{-4}	9	1.47×10^{-4}	9
k	1.58	5	1.59	7	1.53	5
H (μm)	8.8	7	9.5	7	8.9	7

Effective length: 8.5 cm. Mobile phase: 70/30 (v/v) ACN/water + 2 mM $NH_4H_2PO_4$ + 5 mM LiDS. Electrokinetic injection: 5 s and 5 kV. Sample: acetone (non-retained solute) + propylbenzene. Separation field strength: 767 V/cm.

3.2. Influence of irradiation time during the polymerization

Fig. 3A shows the Van Deemter curves of different solutes for 30 min irradiation. The test solutes used, toluene, anthracene and triphenylene, are representative of one, three and five aromatic rings, respectively. It appeared that plate height decreases with decreasing the number of aromatic rings. We think that this issue is due to monolith morphology. Although a number of parameters in the preparation of the monolithic columns affect the porous properties, some key variables such as monomer proportion, composition of the porogen and content of the cross-linker are frequently used to change the average pore size [37]. We studied here the influence of irradiation energy on polymerization process by varying irradiation time.

Several exposure times were evaluated between 5 and 30 min. Irradiation time below 5 min was not used, since it is too short to achieve the polymerization of monolithic beds. Two identical columns were prepared for each energy dose.

The Van Deemter curves of toluene, anthracene and triphenylene obtained for 30, 20, 10 and 5 min irradiation are presented in Fig. 3. It appears that photopolymerization of 5 min results in high efficiency (low plate heights) and no discrepancy between solutes of different numbers of aromatic rings. The monolith synthesis based on non-aqueous porogens provides lower efficiency than monoliths based on aqueous porogens, since the very first attempts provided $H = 20$ μm on PAH [32], while the more recent developments by Herrero-Martinez group improved performances up to $H = 9–15$ μm [34,38] on PAH. In regards to the constraints imposed by our group to realize an efficient transfer from capillary to COC chip, the obtained monolith presents similar performances to the ones found in the literature.

SEM photographs showed significant differences in morphology according to irradiation time. A representative example of porous structure of the monoliths photopolymerized during 5, 10, 20 and 30 min are shown in Fig. 4A, B, C and D respectively. An increase in nodule size is observed at increasing exposure times (size of nodules: 0.9 μm for 5 min, 1.5 μm for 10 min, 2 μm for 20 min and 2.0 μm for 30 min). According to monolithic polymerization process, nodules size increases and pores size decreases when the irradiation time increases [39]. A monolith of small pores (long irradiation time) may result in a steric effect for large solutes, which will generate a loss in efficiency. Monoliths with large pores (small irradiation time) do not exhibit any difference in efficiency for various solute sizes.

But looking closer, at maximum electrical field (757 V/cm), the linear velocity is lower for an irradiation of 5 min. Indeed, the electroosmotic mobility suffers a loss of 35% when irradiation time decreases from 30 to 5 min. In addition, the retention factors for the three test compounds increase slightly from 30

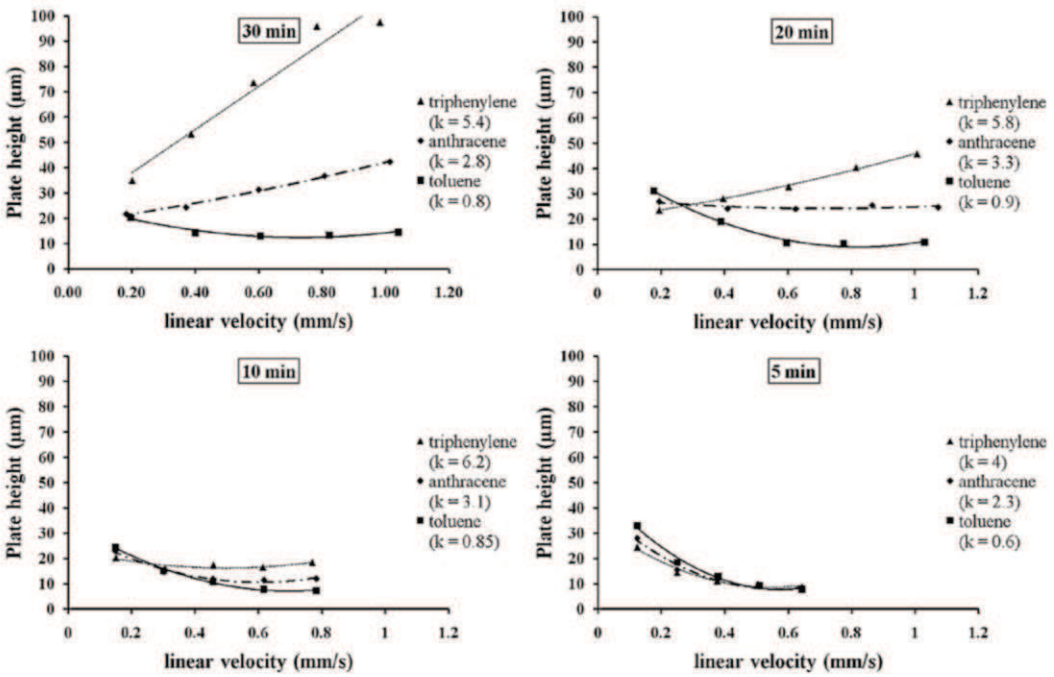


Fig. 3. Van Deemter curves obtained from toluene (3.7 mM), anthracène (0.22 mM) and triphenylene (2 mM) analysis on lauryl methacrylate monolithic for different irradiation time (30, 20, 10 and 5 min). Mobile phase 70/30 (v/v) ACN/water + 2 mM $NH_4H_2PO_4$ + 5 mM LiDS.

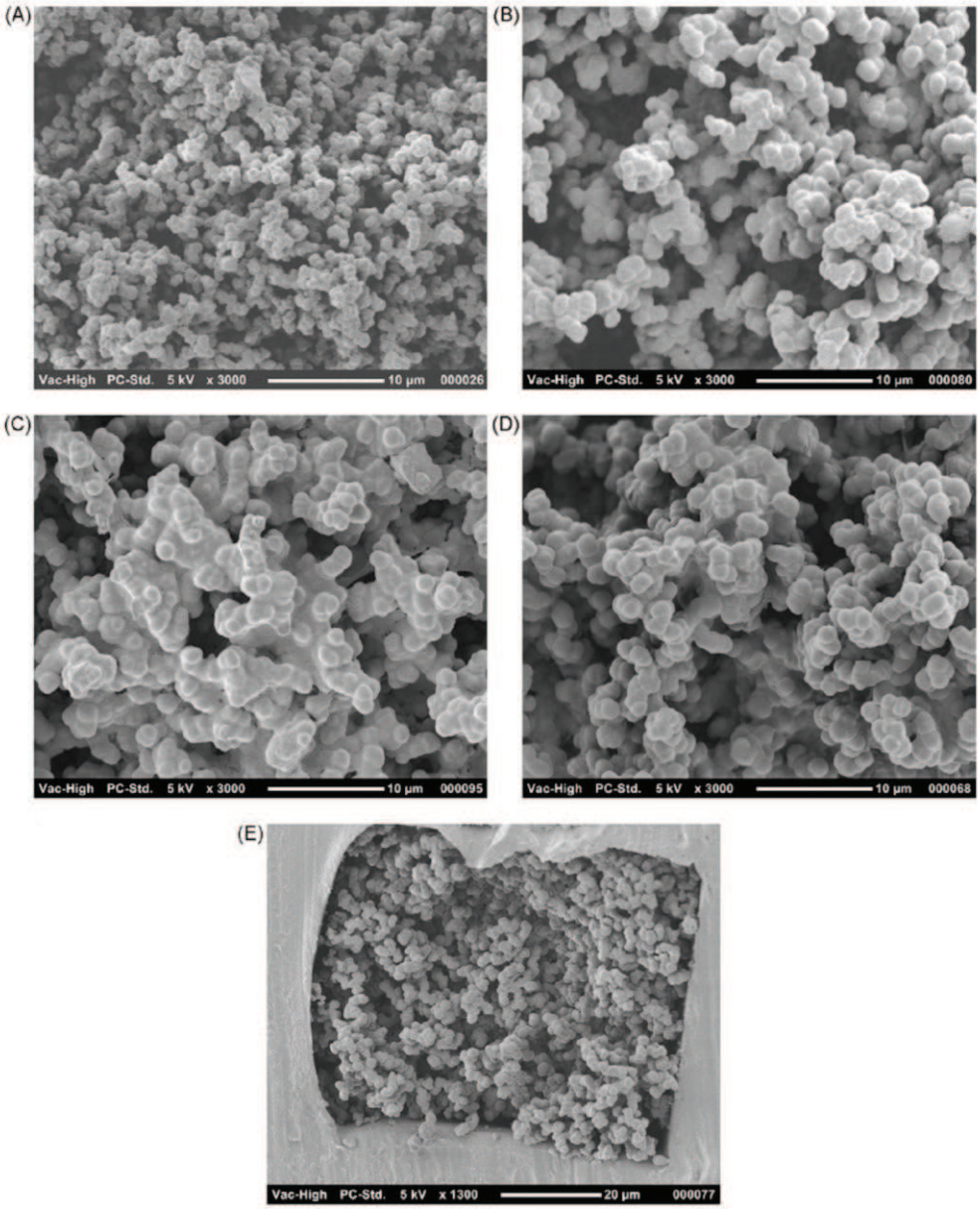


Fig. 4. Scanning electron micrographs of lauryl methacrylate monolith in fused-silica capillary (A–D) and in COC microchannel (E). Polymerization by UV-irradiation at several exposure times: (A) 5 min, (B) 10 min, (C) 20 min and (D) 30 min. (E) Overview of the channel section of a COC microchannel filled with monolith; bar scale of 20 µm.

to 10 min irradiation (RSD less than 2.5%) and decrease by 25% from 10 to 5 min irradiation (see keys of Fig. 3). This is due to the fact that charged monomers (SO_3^- groups) responsible for the EOF generation, and alkyl monomers providing retention, may not be fully incorporated in the polymerization process within 5 min time.

The stability of the capillaries for different time irradiations was also examined. Good long-term repeatability and good capillary-to-capillary reproducibility were exhibited for time irradiation between 10 and 30 min. At 5 min irradiation, however, the long-term repeatability is short (<5 days) due to a weak anchorage of the monolith to the inner wall of the capillary. So, the best compromise between efficiency, retention and stability is to carry out a 10 min synthesis.

3.3. *Influence of the mobile phase composition*

The monolithic stationary phase obtained for 10 min irradiation was evaluated under a large range of analytical conditions. Fig. 5A shows that the electroosmotic mobility increases when the percentage of ACN in the mobile phase is decreased. This effect could be attributed to the adsorption of LiDS onto the monolith, which becomes more and more important when the percentage of acetonitrile decreases, leading to a larger density of charges adsorbed onto the surface [40]. Without surfactant in the mobile phase, a decrease of EOF should be observed with decreasing acetonitrile content [41].

Fig. 5B shows the dependence of retention factors k of three alkylbenzenes (benzene, toluene and ethylbenzene) on the per-

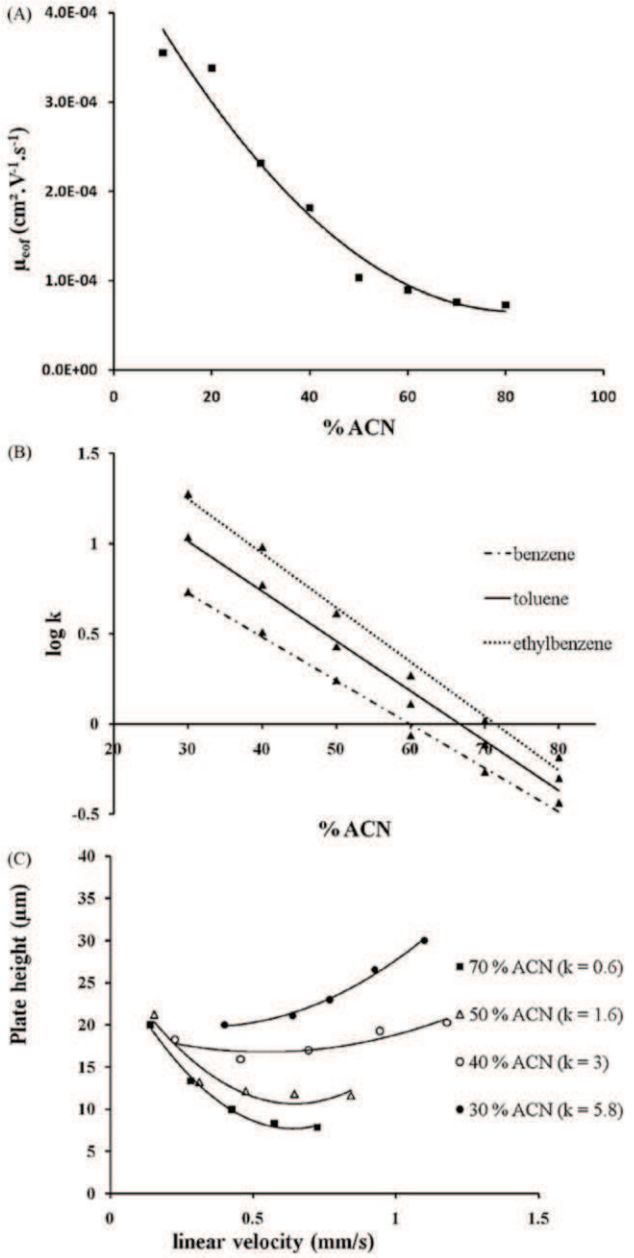


Fig. 5. Evaluation of the monolithic stationary phase obtained for 10 min irradiation. (A) Electroosmotic mobility vs. percentage of acetonitrile in mobile phase. (B) Logarithm of the retention factors for benzene, toluene and ethylbenzene as a function of the mobile phase composition. (C) Van Deemter curve of benzene for different percentage of acetonitrile. Mobile phase: ACN/water + 2 mM $NH_4H_2PO_4$ + 5 mM LiDS. Solute concentrations: benzene at 4.5 mM, toluene at 3.7 mM and ethylbenzene at 3.3 mM.

centage of ACN (v/v) in the mobile phase. It can be observed that log k linearly decreases with increasing concentration of ACN and the slope of the curve increases with the relative hydrophobicity of the analytes. This is a linear model over a large range of retention ($0.3 < k < 19$). This feature is indicative of true reversed-phase electrochromatography behavior.

The efficiencies obtained for benzene at the different mobile phase compositions are shown in Fig. 5C. An increase of plate height with increasing amount of water and consequently increasing retention was observed. This effect could be attributed to a swelling of monolith in these conditions and is currently studied. Indeed, the factors that affect the relationship between efficiency and retention are numerous and the type of solute and the swelling phenomenon of the stationary phase in the presence of organic modifier appear to be of importance in this issue [36].

3.4. Transfer into COC microsystem

The transfer of monolith synthesis into cyclic olefin copolymer commercial device was straightforward. The polymerization mixture was simply introduced in the channels without any pretreatment. The chip was then irradiated under UV light for 10 min, which is possible due to the good optical properties of COC.

As observed on the SEM imaging (Fig. 4E), the resulting monolith is homogeneous all over the volume of the channel. On the inner wall of the chip, no anchoring was provided. This was not necessary since no pressure is applied across the stationary phase and the ruggedness of the walls appeared sufficient to avoid any movement. The size of nodules is 1.8 µm. Several attempts to decrease nodules sizes have shown that 5 min of photopolymerization is not sufficient because the monolith is heterogeneous over the volume of the channel. Indeed, a large dead volume appears between the chip wall and the monolith, which allows a deformation of plug profile and subsequent band broadening.

Fig. 6A and B compares the separations of five fluorescent PAH obtained respectively in capillary with UV detection and microsystem with fluorescence detection. As the response of PAH in fluorescence detection is different to UV detection, two PAH mixtures with different concentrations were prepared. Dynamic injection on a fully filled chip was used for the microsystem separation. The quality of the two separations seems to be equivalent. However, theoretical plate height for anthracene is in the order of 12 µm in capillary and 17 µm in microsystem. A slight loss in efficiency is therefore noticed due to transfer. Unfortunately, it is impossible to compare EOF mobilities and retention factors between these two systems. Indeed, no EOF marker such as acetone and thiourea could be used in the microchip format because these compounds are not fluorescent.

The repeatability of microsystem separation has been tested for five successive injections. RSD values are less than 4% on retention times and less than 11% on efficiencies. In addition, three chips were made in the same conditions with the same polymerization mixture to evaluate the chip-to-chip reproducibility. Relative standard deviation (RSD) is less than 5% on retention time and less than 8% on efficiencies.

To conclude, the transfer into COC microsystem is completed. Monolith photopolymerized 10 min inside a COC chip is robust and gives good electrochromatographic performances. To the best of our knowledge, the only work on photoinitiated monolith, made exclusively with non-aqueous porogen in microsystem, that could be found in the literature, reports the synthesis of an acrylate monolith for COC with a methanol/2-propanol porogen, providing 12 µm plate heights [42]. If these results may appear to be better than the ones presented here, the batch-to-batch reproducibility was not satisfactory, due to methanol volatility.

3.5. Towards simplicity of injection process

Dynamic injection is a complex process which required several steps (pinched sampling step and expansion step), a cross design, four electrodes and a voltage programming. Towards simplification of use, a very simple direct injection of droplets is introduced here, as described in the experimental section, which requires only a single channel with localized monolith, two electrodes and no voltage programming. This integrated system (reservoirs and separation channel) is advantageous over a single capillary that would require an external reservoir system, which may be expensive and

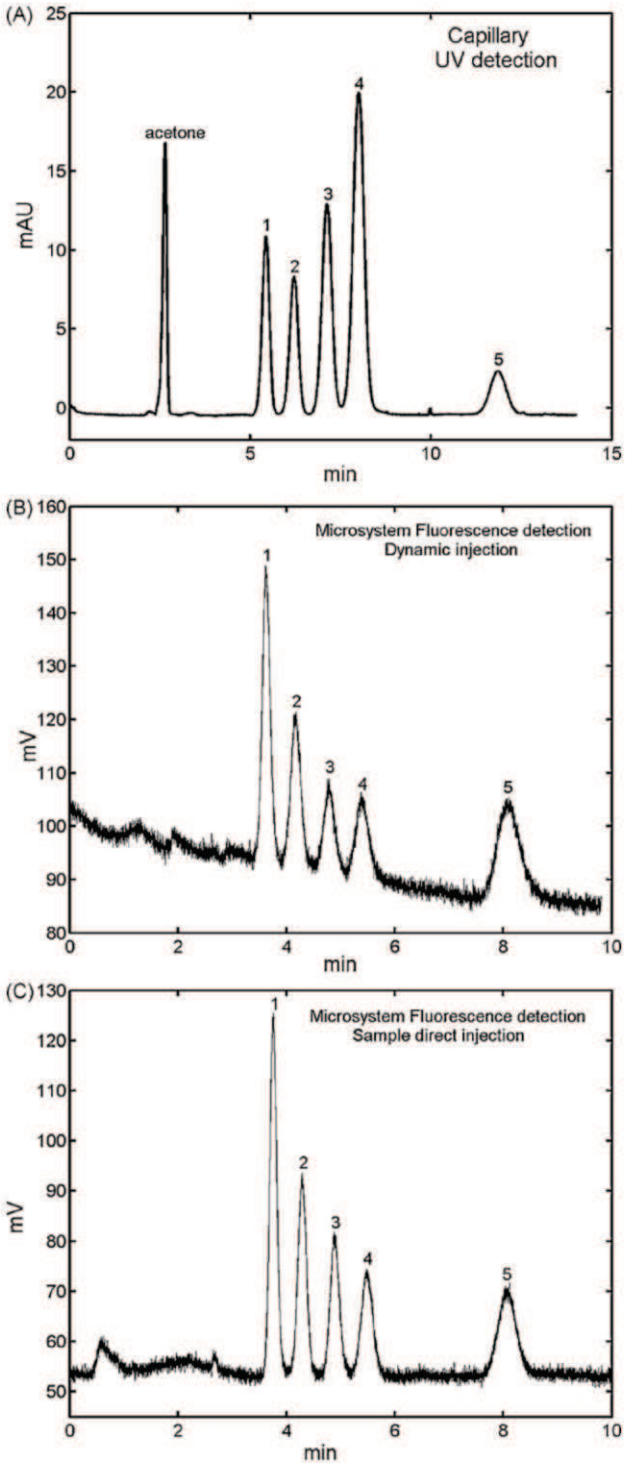


Fig. 6. Reversed-phase electrochromatographic separation of five PAHs, namely (1) anthracene, (2) fluoranthene, (3) pyrene, (4) benzo-[a]-anthracene and (5) perylene. Separation field strength: 560 V/cm. Mobile phase 85/15: (v/v) ACN/water + 2 mM $NH_4H_2PO_4$ + 5 mM LiDS. Effective length for capillary separation: 8.5 cm; for microsystem separation: 6.5 cm. Solute concentration: for capillary separation and UV detection 0.36 mM anthracene, 4.23 mM fluoranthene, 18.6 mM pyrene, 4.2 mM benzo-a-anthracene and 1 mM perylene; for microsystem separation and fluorescence detection: 1.5 mM of anthracene, 0.13 mM of fluoranthene, 1.33 mM of pyrene, 0.6 mM of benzo-a-anthracene and 3 mM of perylene.

non-disposable. Here, the overall electrochromatographic system can be disposed after analysis, due to the low cost of COC material and microsystem fabrication.

Electrochromatograms obtained for dynamic injection and simple direct injection are compared in Fig. 6B and C. Simple direct injection provides the same separation as dynamic injection but leads to a small efficiency loss (17 μm in dynamic injection and 19 μm in simple direct injection for anthracene). This efficiency loss is minimal compared to the gain in simplicity of use.

The repeatability of separation has been tested for six successive direct injections. RSD values are less than 1.5% on retention times and less than 11% on efficiencies. By comparing with the results obtained for dynamic injection, it is concluded that simple direct injection is a viable process for on-site analysis.

4. Conclusion

In this work, we have demonstrated the robust synthesis of monolith, using a non-aqueous formulation, for the efficient implementation of electrochromatography on polymeric microsystem. Separation of non-polar hydrophobic compounds was obtained through reversed-phase behavior, with relatively good efficiencies for a monolith photopolymerized during 10 min. Photopolymerization at this irradiation time is the best compromise to obtain a robust homogenous structure and good electrochromatographic performances. We developed a direct injection process, which contributes to the instrumental simplification towards on-site analysis. Further research is currently being carried out to improve electrochromatography performances of the monolith and to extend its application range to other analytes such as those of biological interest.

Acknowledgement

The authors wish to thank the French National research Agency for funding project ANR-07-PCVI-003601.

References

[1] A.B. Crockett, H.D. Craig, T.F. Jenkins, W.E. Sisk, in: EPA/540/R-97/501, Federal Facilities Forum Issue, US Environmental Protection Agency, Office of Sold Waste and Emergency Response, 1996.
[2] A.B. Crockett, T.F. Jenkins, H.D. Craig, W.E. Sisk, R. Cold Regions, N.H. Engineering Lab Hanover, 1998.
[3] T.N. Chiesl, W.K. Chu, A.M. Stockton, X. Amashukeli, F. Grunthaner, R.A. Mathies, Anal. Chem. 81 (2009) 2537.
[4] 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. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102 (2005) 1041.
[5] D. Wu, J. Qin, B. Lin, J. Chromatogr. A 1184 (2008) 542.
[6] J.P. Kutter, S.C. Jacobson, N. Matsubara, J.M. Ramsey, Anal. Chem. 70 (1998) 3291.
[7] S. Lin, A.S. Fischl, X. Bi, W. Parce, Anal. Biochem. 314 (2003) 97.
[8] J. Xie, Y. Miao, J. Shih, Y.-C. Tai, T.D. Lee, Anal. Chem. 77 (2005) 6947.
[9] I.M. Lazar, P. Trisiripisal, H.A. Sarvaiya, Anal. Chem. 78 (2006) 5513.
[10] M. Pumera, Talanta 66 (2005) 1048.
[11] Y. Hongfeng, K. Killeen, J. Sep. Sci. 30 (2007) 1427.
[12] T. Stachowiak, D. Mair, T. Holden, L.J. Lee, F. Svec, J.M.J. Fréchet, J. Sep. Sci. 30 (2007) 1088.
[13] K. Faure, M. Blas, O. Yassine, N. Delaunay, G. Cretier, M. Albert, J.L. Rocca, Electrophoresis 28 (2007) 1668.
[14] G. Chen, J. Guo, X. Xu, Microchim. Acta 159 (2007) 191.
[15] C. Li, Y. Yang, H.G. Craighead, K.H. Lee, Electrophoresis 26 (2005) 1800.
[16] T. Rohr, D.F. Ogletree, F. Svec, J.M.J. Frechet, Adv. Funct. Mater. 13 (2003) 264.
[17] B.S. Broyles, S.C. Jacobson, J.M. Ramsey, Anal. Chem. 75 (2003) 2761.
[18] B. He, N. Tait, F. Regnier, Anal. Chem. 70 (1998) 3790.
[19] D.J. Throckmorton, T.J. Shepodd, A.K. Singh, Anal. Chem. 74 (2002) 784.
[20] W. Pingli, T. Dingyin, Z. Lihua, L. Zhen, Z. Yukui, J. Sep. Sci. 32 (2009) 2629.
[21] P.A. Levkin, S. Eeltink, T.R. Stratton, R. Brennen, K. Robotti, H. Yin, K. Killeen, F. Svec, J.M.J. Fréchet, J. Chromatogr. A 1200 (2008) 55.
[22] S. Hjerten, J.-L. Liao, R. Zhang, J. Chromatogr. 473 (1989) 273.
[23] F. Svec, J.M.J. Frechet, Anal. Chem. 64 (1992) 820.
[24] F. Svec, J. Sep. Sci. 28 (2005) 729.
[25] N.W. Smith, A.S. Carter-Finch, J. Chromatogr. A 892 (2000) 219.
[26] Q.-H. Wan, J. Chromatogr. A 782 (1997) 181.

[27] C. Ericson, J. Holm, T. Ericson, S. Hjerten, Anal. Chem. 72 (2000) 81.
[28] S.M. Ngola, Y. Fintschenko, W.Y. Choi, T.J. Shepodd, Anal. Chem. 73 (2001) 849.
[29] R. Shediac, S.M. Ngola, D.J. Throckmorton, D.S. Anex, T.J. Shepodd, A.K. Singh, J. Chromatogr. A 925 (2001) 251.
[30] G. Proczek, V. Augustin, S. Descroix, M.-C. Hennion, Electrophoresis 30 (2009) 515.
[31] K. Faure, M. Albert, V. Dugas, G. Crétier, R. Ferrigno, P. Morin, J.-L. Rocca, Electrophoresis 29 (2008) 4948.
[32] Y. Huo, P.J. Schoenmakers, W.T. Kok, J. Chromatogr. A 1175 (2007) 81.
[33] C.-M. Amparo, M.H.-M. José, M.-F. Carlos, F.S.-A. Ernesto, Electrophoresis 29 (2008) 4399.
[34] V. Bernabé-Zafón, A. Cantó-Mirapeix, E.F. Simó-Alfonso, G. Ramis-Ramos, J.M. Herrero-Martínez, Electrophoresis 30 (2009).
[35] V. Bernabé-Zafón, M. Beneito-Cambra, E.F. Simó-Alfonso, J.M. Herrero-Martínez, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 3231.
[36] V. Bernabé-Zafón, M. Beneito-Cambra, E.F. Simó-Alfonso, G. Ramis-Ramos, J.M. Herrero-Martínez, Electrophoresis 30 (2009) 3748.
[37] E. Vlakh, T. Tennikova, J. Sep. Sci. 30 (2007) 2801.
[38] A. Cantó-Mirapeix, J.M. Herrero-Martínez, C. Mongay-Fernández, E.F. Simó-Alfonso, Electrophoresis 30 (2009) 599.
[39] C. Viklund, F. Svec, J.M.J. Frechet, K. Irgum, Chem. Mater. 8 (1996) 744.
[40] J.C. Valette, A.C. Bizet, C. Demesmay, J.L. Rocca, E. Verdon, J. Chromatogr. A 1049 (2004) 171.
[41] M.M. Dittmann, G.P. Rozing, J. Chromatogr. A 744 (1996) 63.
[42] K. Faure, M. Albert, V. Dugas, G. Crétier, R. Ferrigno, M. Morin, J. Rocca, Electrophoresis 29 (2008) 4948.

II.2.2. Optimisation de la synthèse du monolithe LMA/EDMA en capillaire

L'article 1 montre que l'ajustement de la durée d'irradiation permet d'améliorer la structure du monolithe et par conséquent ses performances électrochromatographiques. Cependant, les résultats obtenus ne sont pas tout à fait satisfaisants, car l'efficacité reste faible et dépend fortement de la taille du soluté et de la composition de la phase mobile.

Afin de résoudre ces problèmes, l'optimisation de la composition du mélange réactionnel a été entreprise. En effet, de nombreuses études ont montré l'importance de la proportion de chaque constituant du mélange à polymériser sur les caractéristiques poreuses et sur les performances séparatives du monolithe obtenu [12-15]. Dans cette partie, le point de départ de l'étude réalisée en capillaire est le mélange réactionnel décrit dans l'article 1. Les rapports massiques initiaux monomères/porogènes, LMA/EDMA et 1-propanol/1,4-butanediol sont donc respectivement à 40/60, 60/40 et 90/10. Les quantités d'AMPS et de BME correspondent chacune à 0.5 % de la masse totale en monomères.

II.2.2.1. Effet du rapport massique monomères/porogènes

L'effet de la proportion en porogènes dans le mélange de polymérisation a été étudié en priorité car c'est l'un des paramètres les plus influents sur la taille des pores, la taille des nodules et l'homogénéité de la structure monolithique [15]. L'objectif est l'obtention d'une structure homogène avec des nodules de petite taille (< 1 µm).

Pour cela, 4 mélanges de polymérisation ont été préparés en faisant varier la proportion en porogènes de 80% à 50% (**Figures II.10 à II.13**). Les rapports massiques LMA/EDMA et 1-propanol/1,4-butanediol ont été maintenus constants, respectivement à 60/40 et 90/10 pour chaque mélange préparé. Les proportions massiques en AMPS et en BME ont également été maintenues constantes et égales à 0.5 % de la masse totale en monomères. Comme il a été démontré précédemment que la durée d'irradiation influençait les performances séparatives du monolithe, plusieurs durées d'irradiation ont été testées pour un même mélange réactionnel.

Les images MEB de la **figure II.10** montrent qu'un pourcentage massique de 80 % de porogènes conduit à la formation de structures monolithiques remplissant partiellement le capillaire, et ceci quelle que soit la durée d'irradiation. Les tailles des nodules varient de 0.8 à 2.6 µm (CV < 3 %) pour des durées d'irradiation allant de 10 à 30 min. Le monolithe photopolymérisé pendant 10 minutes présente une taille de globule intéressante pour l'obtention de bonnes performances séparatives (d'après les conclusions de l'article 1). Cependant, ce monolithe n'est pas robuste car il est expulsé en dehors du capillaire lors de son rinçage sur la pompe LC du fait d'un mauvais ancrage.

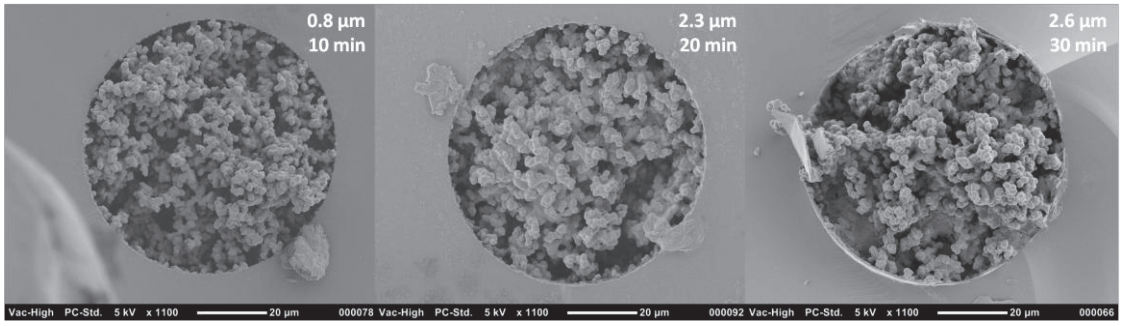


Figure II.10: Images MEB de 3 capillaires irradiés 10, 20 et 30 minutes synthétisés avec 80 % wt de porogènes. CV < 3 % sur la détermination de la taille des nodules. Grossissement ×1100. Tension 10 kV.

Une diminution de 10 % de la masse totale en porogènes (70 % en poids par rapport à la masse totale) engendre une structure monolithique homogène remplissant tout le volume du capillaire (**Figure II.11**). La taille des nodules est cependant un peu élevée (1.8 µm et 2.4 µm à 10 et 20 minutes d'irradiation respectivement) par rapport au précédent monolithe décrit dans l'article 1. La détermination de la taille des nodules a été réalisée avec des CV inférieurs à 3 %.

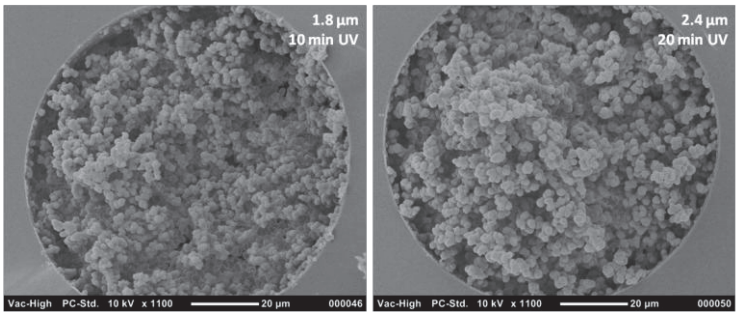


Figure II.11 : Images MEB de 2 capillaires irradiés 10 et 20 minutes synthétisés avec 70 % wt de porogènes. CV < 3 % sur la détermination de la taille des nodules. Grossissement ×1100. Tension 10 kV.

En diminuant encore de 10 % la proportion massique en porogènes (60 % en poids par rapport à la masse totale), les capillaires sont totalement remplis d'un monolithe parfaitement homogène (**Figure II.12**) et possédant des nodules de très petites tailles, environ 1 µm pour 10 minutes d'irradiation et 2 µm pour 20 minutes d'irradiation. Ces résultats confirment que la taille des nodules augmente avec le temps d'irradiation et sont identiques à ceux présentés dans l'article 1 où le mélange réactionnel a la même composition.

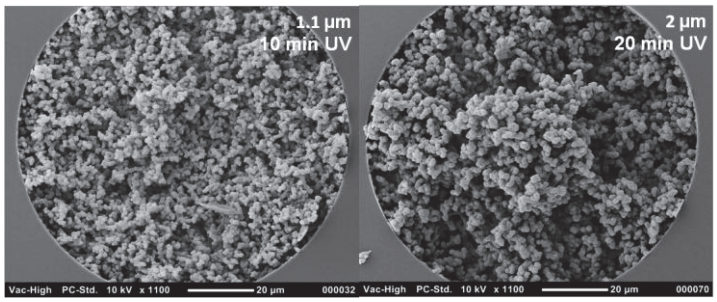


Figure II.12 : Images MEB de 2 capillaires irradiés 10 et 20 minutes synthétisés avec 60 % wt de porogènes. CV < 3 % sur la détermination de la taille des nodules. Grossissement ×1100. Tension 10 kV.

Pour une teneur plus faible en porogènes (50 % en poids par rapport à la masse totale), les capillaires préparés sont totalement remplis par une structure compacte et peu perméable quel que soit le temps d'irradiation (**Figure II.13**).

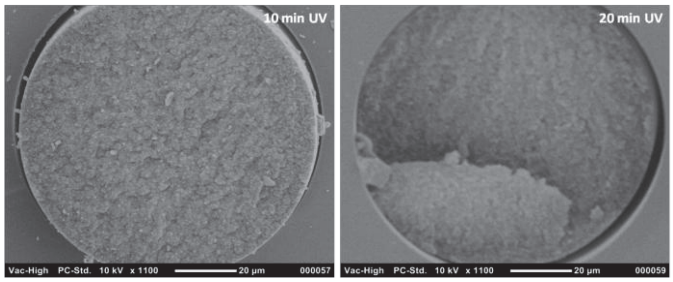


Figure II.13 : Images MEB de 2 capillaires irradiés 10 et 20 minutes synthétisés avec 50 % wt de porogènes. Grossissement ×1100. Tension 10 kV.

A la vue de ces résultats, le mélange de polymérisation contenant 60 % de porogènes semble donner la meilleure structure monolithique pour une photopolymérisation de 10 minutes (W = 0.95 J/cm^2 à P = 1.7 mW/cm^2). Ces conditions sont retenues pour la suite de l'étude. Les performances électrochromatographiques du monolithe obtenu ont été décrites dans l'article 1.

II.2.2.2. Effet de la proportion massique en photoinitiateur

La variation de la morphologie du monolithe en fonction de la quantité de photoinitiateur a déjà été observée dans la littérature par Bernabé-Zafon et al [2]. L'étude de l'influence de la quantité de photoinitiateur sur la structure et les performances électrochromatographiques (H, k_i et μ_{eo}) du monolithe a été réalisée en préparant différents mélanges de polymérisation avec une proportion massique en BME variant de 0.5 à 3 % par rapport à la masse totale en monomères. Pour des teneurs en BME inférieures à 0.5 %, la photopolymérisation ne démarre pas et aucun monolithe ne se forme. Les rapports massiques monomères/porogènes, LMA/EDMA et 1-propanol/1,4-butanediol ont été fixés respectivement à 40/60, 60/40 et 90/10 pour chaque mélange préparé. La quantité d'AMPS a également été maintenue constante à 0.5 % de la masse totale en monomères. Chaque monolithe a été polymérisé pendant 10 minutes (W = 0.95 J/cm^2 à P = 1.7 mW/cm^2) dans un capillaire préalablement vinylisé.

La **figure II.14** montre que la morphologie du monolithe varie avec la quantité d'initiateur présent dans le mélange de polymérisation. Ainsi, la taille des nodules varie de 1.5 à 0.9 µm (CV < 3 %) pour des concentrations en BME allant de 0.5 à 2.5 %. Le fait de doubler la quantité de photoinitiateur de 0.5 à 1 % ne modifie pas la morphologie du monolithe. Une concentration en BME de 2 ou 2.5 % semble être l'optimum puisque les tailles de nodules obtenues sont inférieures à 1 µm. L'augmentation de la concentration en photoamorceur augmente la vitesse de polymérisation ainsi que le nombre de radicaux formés. La concentration de monomères présents autour de ces radicaux devient plus faible, ce qui entraîne la formation d'une structure monolithique présentant un grand nombre de nodules de plus petite taille. Pour des concentrations plus importantes en BME (3 %), la

taille des nodules augmente sensiblement à cause de l'effet écran du photoinitiateur (cf. Chapitre 1, partie I.4.3).

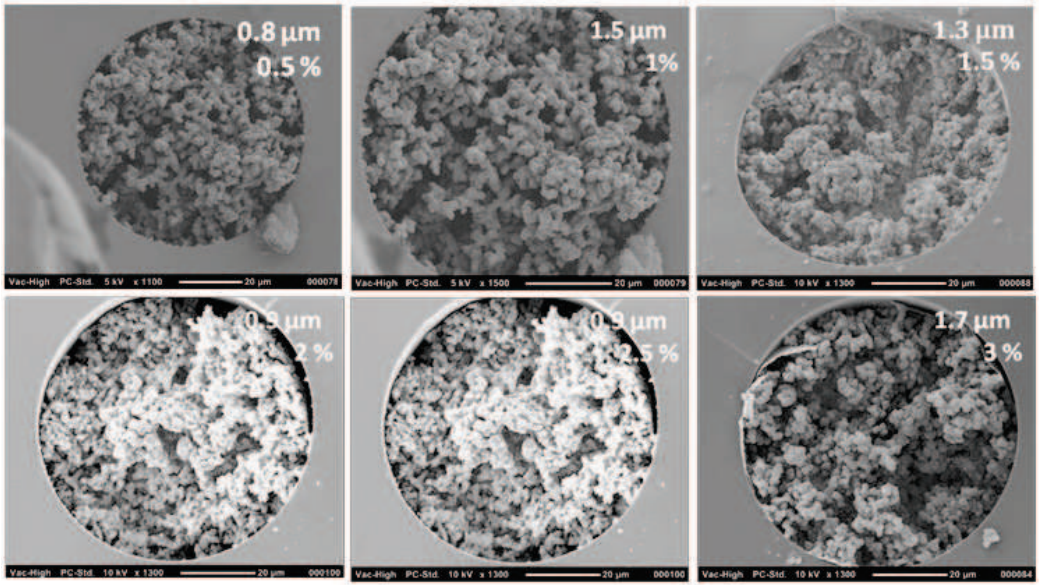
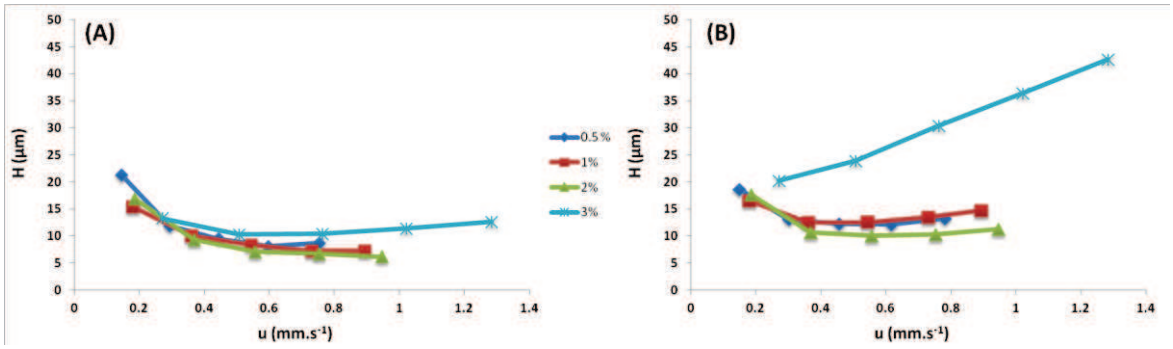


Figure II.14 : Images MEB de 6 capillaires irradiés 10 minutes pour différents pourcentages massiques en BME. CV < 3 % sur la détermination de la taille des nodules. Grossissement ×1100. Tension 10 kV.

L'évolution des performances électrochromatographiques a été observée en déterminant H, k_i et μ_{eo} pour chaque monolithe synthétisé et utilisé avec la même phase mobile : ACN/eau 85/15 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$. Les **figures II.15A** et **B** représentent les courbes de van Deemter du butylbenzène et du benzo-a-anthracène obtenues pour les différents monolithes préparés avec les différents pourcentages massiques de BME. Ces deux solutés ont été choisis car ils présentent des tailles et des rétentions très différentes qui leur confèrent des performances inégales sur le monolithe décrit dans l'article 1 pour un temps d'irradiation de 10 minutes. Les résultats obtenus ici montrent une diminution de H quand le pourcentage d'initiateur varie de 0.5 à 2 % puis une augmentation de H entre 2 et 3 %.



Figures II.15 : Evolution des courbes de Van Deemter pour (A) le butylbenzène et (B) le benzo-a-anthracène à différents pourcentages massique de BME. Phase mobile : ACN/eau 70/30 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$. Injection : 5 s à 125 V/cm. Longueur de séparation : 8.5 cm. Butylbenzène à 2.6 mM et benzo-a-anthracène à 0.6 mM.

La combinaison des analyses MEB et des résultats électrochromatographiques permet d'établir une corrélation entre quantité d'initiateur, structure monolithique et performances électrochromatographiques (**Tableau II.3**). Une augmentation de 60 % de la mobilité électroosmotique est observée lorsque le pourcentage massique de BME augmente de 0.5 à 3 %. Cela résulte d'une incorporation plus importante d'AMPS dans la structure du monolithe durant l'étape de polymérisation.

Tableau II.3 : Corrélation entre quantité d'initiateur, structure monolithique et performances électrochromatographiques. Phase mobile : ACN/eau 70/30 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$. Injection : 5 s à 125 V/cm. Longueur de séparation : 8.5 cm. Butylbenzène à 2.6 mM et benzo-a-anthracène à 0.6 mM. CV < 3 % sur la détermination de la taille des nodules.

Pourcentage en BME (%)	Taille des nodules (µm)	μ_{eo} ($\times 10^{-4}$ $cm^2.V^{-1}.s^{-1}$)	$k_{butylbenzène}$	$k_{benzo\text{-}a\text{-}anthracène}$	$H_{butylbenzène}$ (µm) à la vitesse optimale	$H_{benzo\text{-}a\text{-}anthracène}$ (µm) à la vitesse optimale
0.5	1.5	1	2.2	5	8	15
1	1.3	1	2.1	4.9	7	12
2	0.9	1.4	2.1	4.6	7	10
3	1.7	1.7	2	4.6	10	20

Par contre, les facteurs de rétention du butylbenzène et du benzo-a-anthracène varient peu quand le pourcentage massique de BME passe de 0.5 à 3 %. Comme la rétention est un indicateur de l'incorporation des chaines alkyles dans le monolithe, ces résultats indiquent que l'incorporation des monomères alkyles dans la phase stationnaire monolithique est peu dépendante de la concentration en photoinitiateur.

Enfin, l'augmentation de la proportion d'initiateur, de 0.5 à 2 %, se traduit par une diminution de la taille des nodules, de 1.5 à 0.9 µm (CV < 3 %), et une augmentation de 35 % de l'efficacité pour le benzo-a-anthracène (H passe de 15 à 10 µm). Ainsi, pour un pourcentage massique en BME de 2 %, il est possible d'obtenir H < 10 µm à la vitesse optimale pour deux solutés ayant des tailles et des rétentions très différentes. L'efficacité n'est donc plus dépendante de la taille et de la rétention des solutés comme c'était le cas pour le monolithe décrit dans l'article 1.

Les résultats obtenus montrent clairement qu'un pourcentage massique de 2 % en BME par rapport à la masse totale des monomères semble conduire à un monolithe ayant un bon flux électroosmotique, une capacité de rétention importante et de bonnes efficacités. Cependant, des tests de reproductibilité intra-lot de la synthèse du monolithe LMA/EDMA à partir du mélange optimisé ont montré des CV supérieurs à 20 % sur les 3 grandeurs électrochromatographiques (H, k et μ_{eo}). Ces problèmes de reproductibilité peuvent être dus à un manque de solubilité du photoinitiateur dans un mélange composé de porogènes organiques. En effet, pour le monolithe contenant seulement 1 % de BME, les CV obtenus sur H, k_i et μ_{eo} sont inférieurs à 7%.

II.2.2.3. Effet du rapport massique LMA/EDMA

Le processus de formation des pores dans un monolithe est contrôlé par la solubilité des chaînes polymères en croissance dans le solvant porogène. Le changement de proportion de l'un des monomères entraîne une modification de composition du polymère en croissance et donc de sa solubilité dans le milieu. Une concentration élevée en agent réticulant dans le mélange précurseur conduit à la formation de nuclei réticulés insolubles qui précipitent à un stade précoce de la polymérisation. Les nombreux nuclei fortement réticulés formés au cours de cette étape sont de fait peu gonflés par le porogène et restent de taille relativement petite. La taille des espaces vides formés reste également faible.

Afin d'étudier l'effet de la proportion d'agent réticulant dans le mélange de polymérisation sur la structure monolithique, sept mélanges ont été préparés avec différentes quantités d'EDMA allant de 30 à 60 % par rapport à la masse totale en monomères. Les rapports massiques monomères/porogènes et 1-propanol/1,4-butanediol ont été maintenus respectivement à 40/60 et 90/10 pour chaque mélange préparé. Les quantités d'AMPS et de BME ont été fixées respectivement à 0.5 % et 1 % de la masse totale en monomères. Le temps d'irradiation est fixé à 10 minutes ($W = 0.95\ J/cm^2$ à $P = 1.7\ mW/cm^2$).

Le **tableau II.4** résume les tailles de nodules et les performances électrochromatographiques obtenues à partir des différents monolithes synthétisés. L'étude MEB a montré que l'augmentation de la proportion massique en EDMA de 30 à 50 % entraîne une diminution progressive de la taille des nodules jusqu'à 0.9 µm. Une structure très dense de type gel est obtenue pour un rapport massique LMA/EDMA de 40/60.

Tableau II.4 : Influence du rapport massique LMA/EDMA sur H, k_i et μ_{eo}. Phase mobile : ACN/eau 70/30 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$. Injection : 5 s à 125 V/cm. Longueur de séparation : 8.5 cm. Benzo-a-anthracène à 0.6 mM. CV < 3 % sur la détermination de la taille des nodules.

Rapport massique LMA/EDMA	Taille des nodules (µm)	μ_{eo} ($\times 10^{-4}\ cm^2.V^{-1}.s^{-1}$)	$k_{benzo\text{-}a\text{-}anthracène}$	$H_{benzo\text{-}a\text{-}anthracène}$ (µm) à la vitesse optimale
70/30	2.1	1.12	3.5	16
60/40	0.9	1.08	4	12
50/50	0.9	1.16	4.5	7
40/60	1.1	1.11	3.6	14

La mobilité électroosmotique qui est de l'ordre de $1.10 \times 10^{-4}\ cm^2.V^{-1}.s^{-1}$ varie peu avec le rapport massique LMA/EDMA. L'incorporation des groupements sulfonates à la surface du monolithe via l'AMPS n'est donc pas influencée par la proportion en monomère hydrophobe/réticulant dans le mélange de polymérisation.

De plus, une augmentation de la rétention du pyrène (et de tous les solutés testés) est observée quand le pourcentage massique d'EDMA présent dans le mélange de polymérisation passe de 30 à 50

% par rapport à la masse totale en monomères. Le changement de proportion en EDMA entraîne une modification de la solubilité du polymère en croissance dans le milieu et l'incorporation des chaînes alkyles issues du monomère LMA devient plus importante, d'où une augmentation de la rétention. La rétention maximale est obtenue pour le rapport massique LMA/EDMA de 50/50. Avec un pourcentage massique de 60 % en EDMA par rapport à la masse totale de monomères, la rétention diminue car, avec la structure gélifiée obtenue, l'accès des solutés aux pores du monolithe est moins facile, ce qui engendre des rétentions plus faibles.

Enfin, H diminue de 16 à 7 µm (CV < 3 %) quand le pourcentage massique en EDMA par rapport à la masse totale en monomères varie de 30 à 50 %. Pour des teneurs plus élevées en EDMA (> 50 %), H augmente rapidement jusqu'à 14 µm. Cette évolution est corrélée à celle de la taille des nodules.

L'optimisation du rapport massique LMA/EDMA a permis d'améliorer les efficacités de 35 % et les facteurs de rétention de 40 % par rapport au monolithe décrit dans l'article 1 (LMA/EDMA de 60/40 (% en poids). Grâce à cette optimisation, il est possible d'obtenir H < 10 µm indépendamment de la taille et de la rétention des solutés.

II.2.2.4. Effet de la teneur en 1-propanol

La nature et la proportion des porogènes sont des paramètres importants pour le contrôle de la morphologie du monolithe. En effet, en affectant la solvatation du polymère, la composition du solvant porogène agit directement sur les phénomènes de séparation de phase et donc sur la morphologie du réseau final. Il existe parmi les 2 porogènes utilisés un bon solvant et un mauvais solvant. Le mauvais solvant, en permettant une précipitation rapide des chaînes polymériques formées, favorise la formation précoce des nuclei. Ces derniers se trouvent gonflés par le monomère qui est thermodynamiquement un meilleur solvant pour le polymère que l'agent porogène. Ces nuclei en croissance vont alors fusionner par coalescence, pour conduire en fin de polymérisation, à la formation de gros nodules. Lorsque l'on ajoute dans le porogène un meilleur solvant du polymère, ce solvant entre en compétition avec le monomère. La concentration locale en monomères dans les nuclei est alors plus faible, la polymérisation qui se poursuit dans les nuclei mais également en solution, conduit à la formation de nodules de petite taille [13]. Le but de l'étude présentée ci-dessous est d'augmenter la proportion en bon solvant dans le mélange de polymérisation pour diminuer la taille des nodules afin d'obtenir de meilleures performances électrochromatographiques.

Des expériences préliminaires ont montré que le bon solvant est le 1-propanol tandis que le 1,4-butanediol est le mauvais solvant [2]. Afin d'étudier l'influence de la proportion de 1-propanol dans le mélange de polymérisation sur la structure du monolithe LMA/EDMA, 3 mélanges ont été préparés avec différentes quantités de 1-propanol variant de 90 à 94 % par rapport à la masse totale en porogènes. Les rapports massiques monomères/porogènes et LMA/EDMA ont été fixés respectivement à 40/60 et 50/50 d'après les précédentes conclusions. Les quantités d'AMPS et de BME ont été fixés respectivement à 0.5 % et 1 % de la masse totale en monomères. Chaque monolithe a été photopolymérisé pendant 10 minutes (W = 0.95 J/cm^2 à P = 1.7 mW/cm^2).

L'étude MEB montre clairement que la taille des nodules dépend du pourcentage massique en 1-propanol (**Figure II.16**). La taille des nodules diminue de 1 à 0.7 µm (CV < 3 %) quand le pourcentage massique de 1-propanol augmente de 90 à 94 % par rapport à la masse totale en porogènes. Ces résultats sont en parfait accord avec la théorie [2, 3]. Cependant, plus la taille des nodules diminue, plus le réseau monolithique devient dense et peu perméable, plus il est difficile de rincer sous pression le capillaire après synthèse du monolithe et un mauvais rinçage peut altérer de manière significative la reproductibilité des analyses électrochromatographiques.

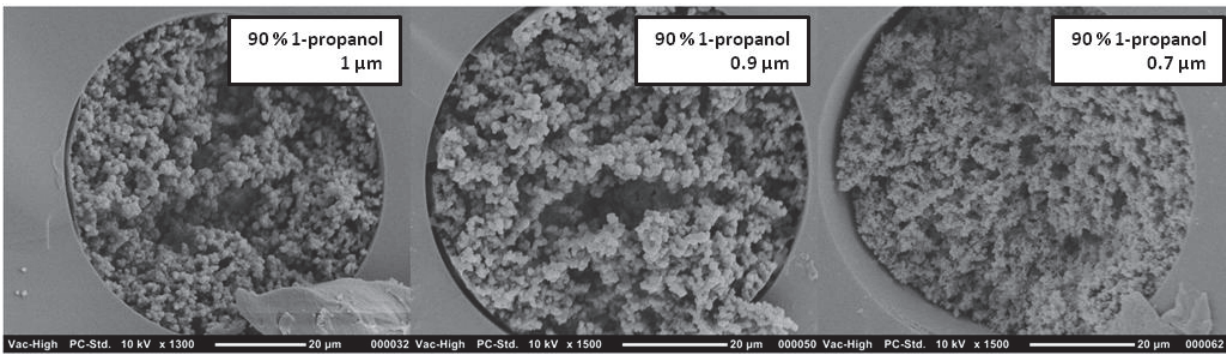


Figure II.16 : Images MEB de 3 capillaires irradiés 10 minutes pour différents pourcentages massiques en 1-propanol. CV < 3 % sur la détermination de la taille des nodules. Grossissement ×1500. Tension 10 kV.

Ces monolithes présentent des performances électrochromatographiques similaires : μ_{eo} = 1.10 × 10^{-4} $cm^2.V^{-1}.s^{-1}$, k_i = 4.5 pour le benzo-a-anthracène et H = 7 µm pour tous les types de solutés. La variation du pourcentage massique en bon solvant modifie donc très peu la structure et les performances séparatives du monolithe. Ce paramètre n'est donc pas le plus influent dans l'optimisation de la synthèse du monolithe. Des mauvaises reproductibilités de la synthèse du monolithe LMA/EDMA ont été observées avec 92 et 94 % de 1-propanol (CV > 20 % sur H, k et μ_{eo}). A contrario, la synthèse du monolithe avec 90 % de 1-propanol est très répétable (CV < 7 % sur H, k_i et μ_{eo}). Pour toutes ces raisons, un rapport massique 1-propanol/1,4-butanediol de 90/10 (% wt) a été défini comme l'optimum, ce qui est similaire au mélange initial décrit dans l'article 1.

II.2.2.5. Effet de la teneur en AMPS

Le flux électroosmotique (FEO) généré dépend de la densité de charges à la surface du monolithe. Dans le but d'augmenter le FEO et donc de réduire le temps d'analyse, des monolithes contenant des teneurs croissantes d'AMPS ont été réalisés. Quatre mélanges ont été préparés avec différentes quantités d'AMPS : 0.5, 1, 2 et 5 % par rapport à la masse totale en monomères. Les rapports massiques monomères/porogènes, LMA/EDMA et 1-propanol/1,4-butanediol ont été maintenus respectivement à 40/60 (% wt), 50/50 (% wt) et 90/10 (% wt) d'après les précédentes études. Les quantités d'AMPS et de BME ont été fixées constantes respectivement à 0.5 % et 1 % de la masse totale en monomères. Le temps d'irradiation à 365 nm était de 10 minutes (W = 0.95 J/cm^2 à P = 1.7 mW/cm^2).

Lorsque le pourcentage d'AMPS varie de 0.5 à 1 % par rapport à la masse totale de monomères, μ_{eo} varie de 1 × 10^{-4} $cm^2.V^{-1}.s^{-1}$ à 1.4 × 10^{-4} $cm^2.V^{-1}.s^{-1}$. Comme attendu, le FEO est donc plus élevé pour

des quantités plus importantes d'AMPS. Cela s'accompagne malheureusement d'une dégradation de H pour le benzo-anthracène (15 µm au lieu de 8 µm) due à une augmentation de la taille des nodules d'un facteur 2 (2 µm au lieu de 1 µm, CV < 3 % sur la détermination de la taille des nodules). Cette augmentation de la taille des nodules est engendrée par une augmentation locale de la concentration en monomères autour des nucléi. La rétention, quant à elle, reste constante quelle que soit la quantité d'AMPS ajoutée dans la composition du mélange de polymérisation. L'AMPS n'influence donc pas dans l'incorporation des monomères.

Des problèmes de solubilité de l'AMPS apparaissent pour des proportions massiques supérieures à 2 % par rapport à la masse totale en monomères. Cela s'accompagne d'un manque de reproductibilité intra-lot et inter-lot de la synthèse du monolithe dans ces conditions (CV > 30 % sur H, k_i et μ_{eo}). Un pourcentage massique d'AMPS de 0.5 % a été défini comme optimal pour concilier bonnes efficacités, rétentions importantes et FEO correct.

II.2.2.6. Conclusion et perspectives

Par rapport au monolithe décrit dans l'article 1, l'optimisation de la proportion de chacun des constituants du mélange réactionnel a permis des gains de 35 % et de 40 % respectivement sur les efficacités et les rétentions. Il est ainsi possible d'obtenir H = 7 µm à la vitesse optimale sur les alkylbenzènes et les HAP. Ces ajustements de la composition du mélange de polymérisation ont aussi permis que l'efficacité soit indépendante de la taille et de la rétention des solutés.

Cependant, des études complémentaires ont mis en évidence un comportement similaire du monolithe initial et du monolithe optimisé lorsque la phase mobile devient très riche en eau : une dégradation très importante des efficacités est observée. L'apparition de phase stagnante due au gonflement du monolithe sous l'effet d'une phase mobile aqueuse peut expliquer cette dégradation [11].

Une évaluation de la capacité du monolithe à préconcentrer les solutés en tête de capillaire a été également réalisée en faisant varier la composition du mélange de solubilisation de l'échantillon (fluoranthène). La composition de la phase mobile est maintenue constante : ACN/eau 85/15 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$. Lorsque l'échantillon est solubilisé dans un mélange de composition identique à celle de la phase mobile, il y a une relation linéaire entre la hauteur et l'aire du pic pour des temps d'injection inférieurs à 15 s (**Figure II.17**). La dispersion engendrée par l'augmentation du volume injecté reste négligeable. Au-delà de 15 s d'injection, il n'y a plus de linéarité entre hauteur et surface de pic, ce qui traduit un élargissement très important du pic pour des volumes injectés plus importants.

Lorsque l'échantillon est solubilisé dans un mélange plus riche en eau et moins éluant que la phase mobile (ACN/eau 50/50 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$), il n'y a aucune proportionnalité entre la hauteur et l'aire du pic. Il y a donc un élargissement très important du pic qui se produit dès que le volume injecté augmente. Il est impossible de préconcentrer le soluté en tête de capillaire de séparation.

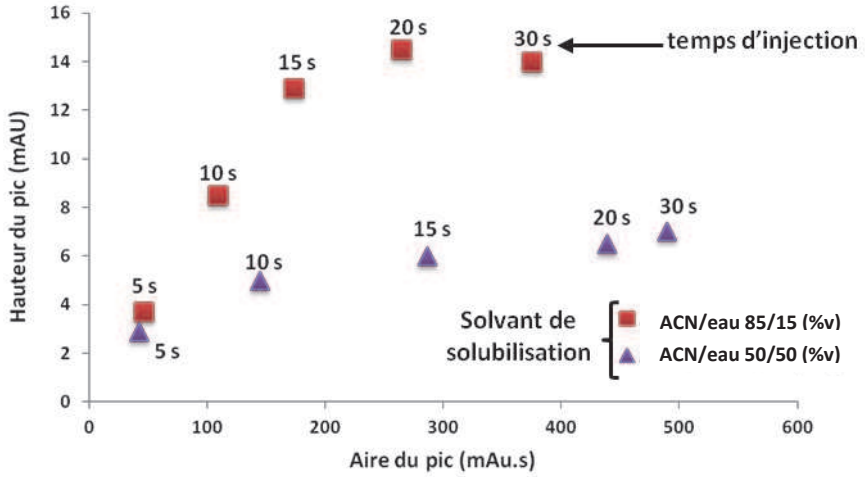


Figure II.17 : Variation de la hauteur en fonction de l'aire du pic du fluoranthène à 50 ppm pour différents temps d'injection et différentes compositions de mélange de solubilisation. Phase mobile : ACN/eau 70/30 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$. Injection : 125 V/cm. Longueur de séparation : 8.5 cm.

La synthèse du monolithe organique LMA/EDMA à base de porogènes organiques (mélange optimisé) en microsystème est robuste et donne des performances séparatives identiques par rapport à d'autres travaux similaires [1]. Néanmoins, la forte dégradation des performances électrochromatographiques en présence de phase mobile très aqueuse ainsi que l'impossibilité de pratiquer une étape de préconcentration ne permettent pas de considérer ce monolithe comme viable pour la suite de notre travail. En effet, cette phase stationnaire monolithique ne remplit pas les critères requis énoncés au début de ce chapitre. Il est donc nécessaire de s'orienter vers une nouvelle phase stationnaire monolithique.

II.3. Synthèse d'une phase stationnaire monolithique à base de porogène aqueux : monolithe HA/BDDA

Le choix d'un monolithe à base d'hexyl acrylate (HA) et de 1,3-butanediol diacrylate (BDAA) est fondé sur les bonnes performances séparatives obtenues avec ce type de phase stationnaire (efficacités de 250 000 plateaux/m (H = 5 µm) et possibilité de préconcentrer) aussi bien en capillaire de silice [8, 16, 17] qu'en microsystème en verre [18, 19]. La composition initiale du mélange de polymérisation utilisé dans ce chapitre est basée sur les travaux de Barrioulet *et al* [16]. L'acétonitrile, l'éthanol et l'eau sont les porogènes servant à moduler la structure poreuse du monolithe HA/BDDA. L'utilisation d'un porogène aqueux à base de tampon phosphate n'empêche pas la solubilisation des monomères HA et BDDA. Seul le photoinitiateur AIBN, ayant une absorbance UV maximale à 254 nm peu compatible avec l'environnement COC, a été remplacé par la BME plus adaptée.

Ainsi, la composition du mélange réactionnel utilisé dans cette partie est la suivante :

- monomères/porogènes : 34.5/65.5 (% en poids)
- monomères : 66.4/33.6 hexyl acrylate/ 1.3-butanediol diacrylate (% en poids)
- porogènes : 54/23/23 ACN/EtOH/Tampon phosphate 5 mM (% en poids)
- AMPS : 0.5 % par rapport à la masse totale en monomères
- BME: 0.5 % par rapport à la masse totale en monomères

II.3.1. Caractérisation électrochromatographique du monolithe HA/BDDA

La caractérisation électrochromatographique du monolithe HA/BDDA est réalisée en capillaire en injectant des solutés tests tels que les alkylbenzènes, les HAP et les pesticides. La composition de la phase mobile est maintenue constante à ACN/eau 70/30 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$.

II.3.1.1. Test de la robustesse de la synthèse en capillaire

La robustesse de la synthèse du monolithe HA/BDDA en termes de répétabilité sur plusieurs jours et reproductibilité inter-lot a été évaluée en observant les CV obtenus sur H, k_i et μ_{eo}. L'étude de la répétabilité sur plusieurs jours correspond à l'évaluation de la stabilité des performances séparatives du monolithe tous les 10 jours pendant 60 jours. L'étude de la reproductibilité inter-lot correspond à l'évaluation des performances électrochromatographiques des monolithes obtenus à partir de différents mélanges réactionnels de même composition mais préparés indépendamment. Pour cela, 6 synthèses ont été réalisées. Dans un premier temps, pour des raisons pratiques, nous avons décidé de fixer le temps d'irradiation à 10 min (W = 0.95 J/cm^2 à P = 1.7 mW/cm^2). Ces tests de robustesse ont été effectués en injectant un mélange de 5 alkylbenzènes et un mélange de 5 pesticides. Ces composés neutres sont séparés suivant leurs hydrophobicités comme le montre la **Figure II.18**.

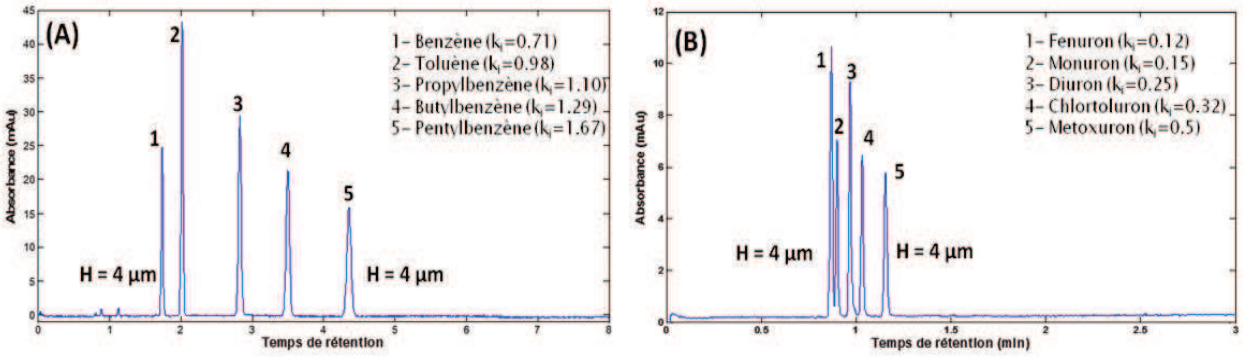


Figure II.18 : Séparations électrochromatographiques de (A) 5 alkylbenzènes et (B) de 5 pesticides. Champ électrique de séparation : 757 V/cm. Phase mobile : ACN/eau 70/30 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$. Injection : 125 V/cm pendant 5 s. Longueur de séparation : 8.5 cm. Concentration des alkylbenzènes : benzène à 4.5 mM, toluène à 3.7 mM, éthylbenzène à 3.3 mM, propylbenzène à 2.9 mM, butylbenzène à 2.6 mM et pentylbenzène à 1.9 mM. Concentration des pesticides : fénuron à 3 mM, monuron à 2.8 mM, diuron à 2.6 mM, chlortoluron à 2.5 mM, metoxuron à 2 mM.

La **figure II.18A** montre qu'il est possible d'obtenir H = 4 µm à la vitesse optimale quelles que soient la taille et la rétention du soluté. La **figure II.18B** illustre que le monolithe HA/BDDA est capable de séparer des solutés ayant des rétentions très proches ($0.12 < k_i < 0.5$) grâce à l'obtention des hautes efficacités (H = 4 µm). Ces résultats sont en parfait accord avec ceux obtenus dans la littérature [8, 16, 17, 19].

Les résultats des tests de robustesse sont présentés dans le **tableau II.5**. Les tests de répétabilité sur plusieurs jours montrent que les analyses électrochromatographiques peuvent être réalisées pendant plus 60 jours sans perte de performances. En effet, les CV obtenus pour H, k et μ_{eo} sont inférieurs à 5 %. De plus, la reproductibilité inter-lot de la synthèse du monolithe HA/BDDA est également satisfaisante avec des CV compris entre 4 et 8 % pour les 3 grandeurs électrochromatographiques. Ces résultats prouvent que la structure monolithique est robuste pendant plus de 2 mois et que sa synthèse est très répétable.

Tableau II.5 : Reproductibilité inter-lot de la synthèse du monolithe HA/BDDA. Champ électrique de séparation : 757 V/cm. Phase mobile : ACN/eau 70/30 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$. Injection : 125 V/cm pendant 5 s. Longueur de séparation : 8.5 cm. propylbenzène à 2.9 mM

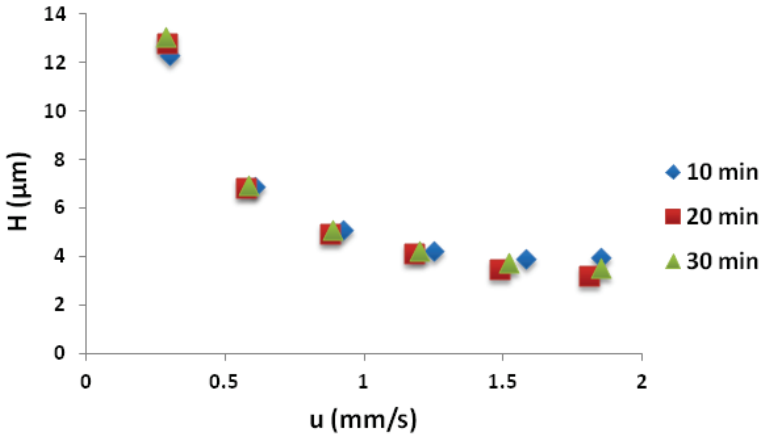
Grandeurs électrochromatographiques	Moyenne	CV Durée de vie du capillaire	CV Reproductibilité inter-lot
μ_{eo} ($cm^2.V^{-1}.s^{-1}$)	2×10^{-4} $cm^2.V^{-1}.s^{-1}$	< 5%	< 4 %
$k_{propylbenzène}$	1.10	< 5 %	< 4 %
H (µm)	4.0	< 4 %	< 8 %

D'une manière générale, la mobilité électroosmotique et les efficacités du monolithe HA/BDDA sont plus élevées que celles obtenues avec le monolithe LMA/EDMA. Ainsi, μ_{eo} et N mesuré sur le propylbenzène sont deux fois plus grands pour le monolithe HA/BDDA que pour le monolithe LMA/EDMA (cf article 1). Seule la capacité de rétention du monolithe HA/BDDA est plus faible que celle du monolithe LMA/EDMA en raison de l'incorporation de chaînes alkyles plus courtes (C_6 au lieu de C_{12}) dans la structure monolithique.

II.3.1.2. Influence de la durée d'irradiation

Les résultats obtenus dans la partie II.2 de ce chapitre ont montré l'importance de la durée d'irradiation sur la structure et les performances séparatives du monolithe. Il est donc nécessaire d'étudier l'effet du temps d'irradiation sur le monolithe HA/BDDA.

La **figure II.19** montre les courbes de van Deemter obtenues pour le benzo-a-anthracène à 10, 20 et 30 minutes d'irradiation. Il apparait que H est indépendant de la durée d'irradiation contrairement à ce qui se produit avec le monolithe LMA/EDMA. Cette tendance est observée pour différents solutés de taille et rétention variables.



Figures II.19 : Courbes de Van Deemter obtenues sur le monolithe HA/BDDA pour différentes durées d'irradiation. Soluté : benzo-a-anthracène. Phase mobile : ACN/eau 70/30 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$. Injection : 5s à 125 V/cm. Longueur de séparation : 8.5 cm. Benzo-a-anthracène à 0.6 mM.

L'étude MEB a montré l'obtention de structures monolithiques semblables à celles obtenues par Augustin et al [8]. Les capillaires sont remplis de monolithe parfaitement homogène présentant des tailles de nodules égales à 0.9 µm (CV < 3 %) quelle que soit la durée d'irradiation. Ceci explique que H soit indépendant du temps d'irradiation. De plus, le monolithe est parfaitement ancré à la paroi du capillaire pour des temps d'irradiation compris entre 10 et 30 minutes. Pour des temps inférieurs à 10 minutes, des problèmes d'ancrage du monolithe apparaissent. La mobilité électroosmotique μ_{eo} est aussi constante et égale à 2×10^{-4} $cm^2.V^{-1}.s^{-1}$ quel que soit le temps d'irradiation. L'incorporation des groupements sulfonates via les monomères chargés AMPS est totale au bout de 10 minutes d'irradiation.

Enfin, la rétention des solutés ne varie pas quand le temps d'irradiation varie de 10 à 30 minutes (**figure II.20**). Ceci suggère que l'incorporation des monomères hexyl acrylate dans la structure monolithique est complète et s'effectue en moins de 10 minutes.

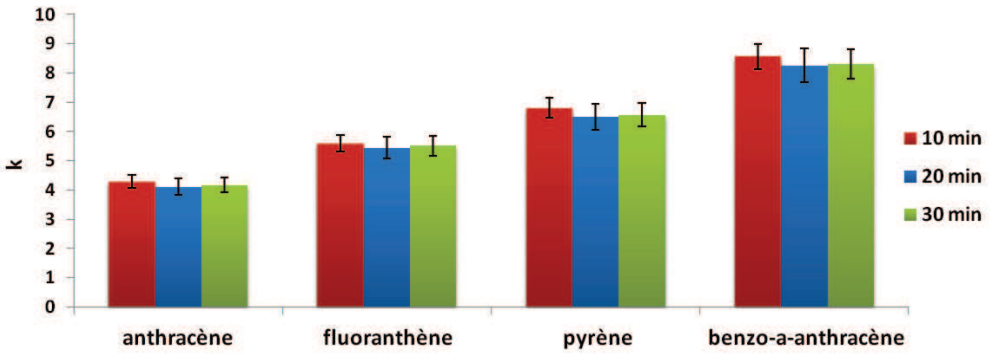


Figure II.20 : Variation de la rétention k des HAP en fonction du temps d'irradiation. Phase mobile : ACN/eau 70/30 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$. Injection : 125 V/cm pendant 5 s. Longueur de séparation : 8.5 cm. Anthracène à 1.5 mM, fluoranthène à 0.13 mM, pyrène à 1.33 mM et benzo-a-anthracène à 0.6 mM.

Un temps d'irradiation de 10 minutes à une intensité de 1.7 mW/cm^2 (W = 0.95 J/cm^2) permet l'obtention rapide d'une structure monolithique robuste et performantes. Ces conditions d'irradiation sont donc choisies pour la suite de l'étude.

II.3.1.3. Influence de la composition de la phase mobile

Le monolithe HA/BDDA a aussi été évalué dans une large gamme de composition de phase mobile. La **figure II.21A** montre que la mobilité électroosmotique reste constante quand le pourcentage d'ACN dans la phase mobile diminue. Cet effet, différent de celui observé avec le monolithe LMA/EDMA (cf article 1), montre que l'adsorption du LiDS à la surface du monolithe est négligeable en raison des chaines alkyles C6 plus courtes.

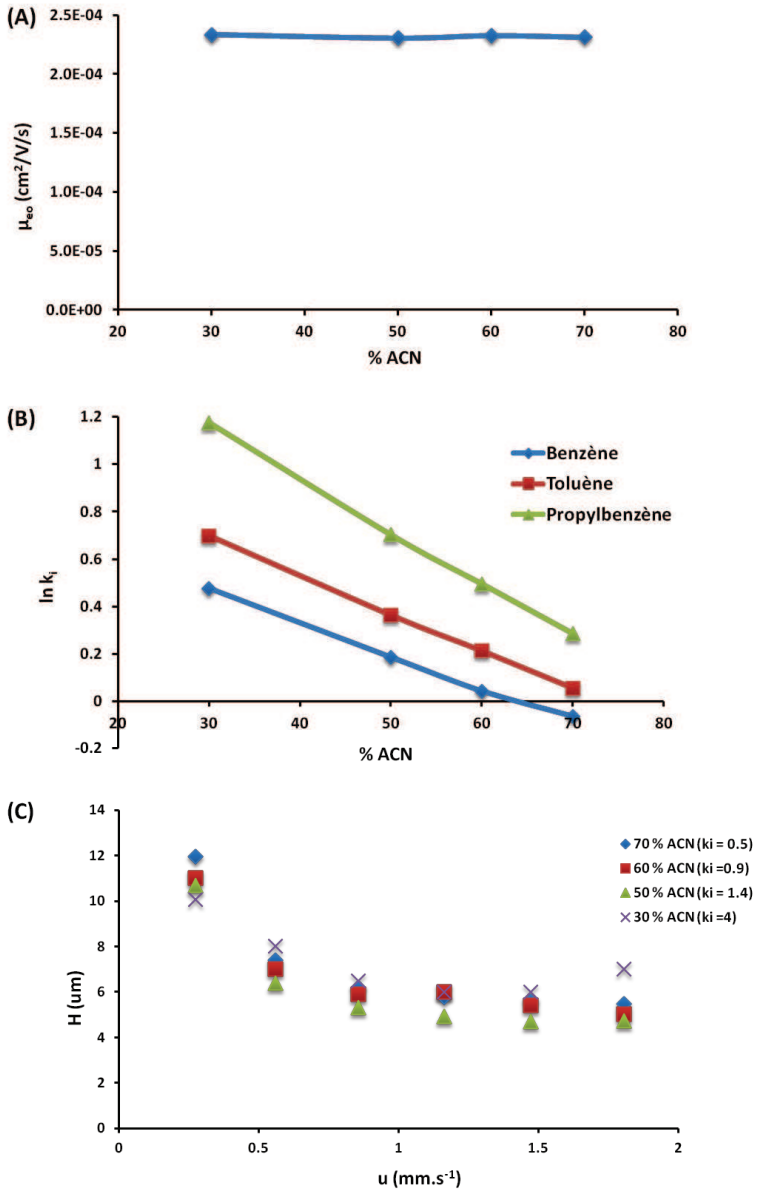


Figure II.21 : Evaluation du comportement du monolithe HA/BDDA pour différentes compostions de phase mobile. (A) Variation de μ_{eo} en fonction du pourcentage d'ACN dans la phase mobile. (B) Variation de Ln k obtenue pour le benzène, toluène et éthylbenzène en fonction de la composition de la phase mobile. (C) Courbes de van Deemter du benzène pour différents pourcentage d'acétonitrile. Phase mobile : ACN/eau + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$. Injection : 5 s à 125 V/cm. Longueur de séparation : 8.5 cm. Concentrations des solutés : benzène à 4.5 mM, toluène à 3.7 mM et éthylbenzène à 3.3 mM.

La **figure II.21B** montre la dépendance des facteurs de rétention k_i de trois alkylbenzènes (benzène, toluène et ethylbenzène) sur le pourcentage d'ACN dans la phase mobile. Il est observé que log k_i diminue linéairement avec l'augmentation de la concentration en ACN et que la pente des droites augmente avec l'hydrophobicité des solutés. Cet effet, déjà observé précédemment avec le monolithe LMA/EDMA, est caractéristique d'un comportement d'électrochromatographie à polarités des phases inverses.

Enfin, d'après les courbes de van Deemter tracées pour le benzène à différentes compositions de phase mobile (**figure II.21C**), H est indépendant de la rétention. Contrairement à ce qui a été observé pour le monolithe LMA/EDMA, il n'y a donc pas de dégradation de l'efficacité du monolithe HA/BDDA pour des phases mobiles riches en eau.

Le monolithe HA/BDDA présente donc un comportement très satisfaisant lorsqu'il est soumis à différentes compositions de phase mobile. La préconcentration des solutés en tête de capillaire de séparation doit être testée avant d'envisager le transfert de la synthèse en microsystème.

II.3.1.4. Préconcentration de solutés apolaires en capillaire

La **figure II.22** montre les variations de la hauteur du pic en fonction de l'aire du pic du fluoranthène pour différentes compositions du mélange de solubilisation, la composition de la phase mobile étant maintenue constante à ACN/eau 70/30 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$. Lorsque l'échantillon est solubilisé dans un mélange plus riche en eau (donc moins éluant) que la phase mobile (ACN/eau 50/50 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$), la hauteur du pic augmente proportionnellement avec l'aire du pic (représentative de la quantité) dans un large domaine de temps d'injection. Il est ainsi possible d'injecter de grands volumes d'échantillon sans élargissement du pic. Le monolithe HA/BDDA est donc capable de préconcentrer des solutés en tête de colonne lorsque l'échantillon est solubilisé dans un mélange moins éluant que la phase mobile.

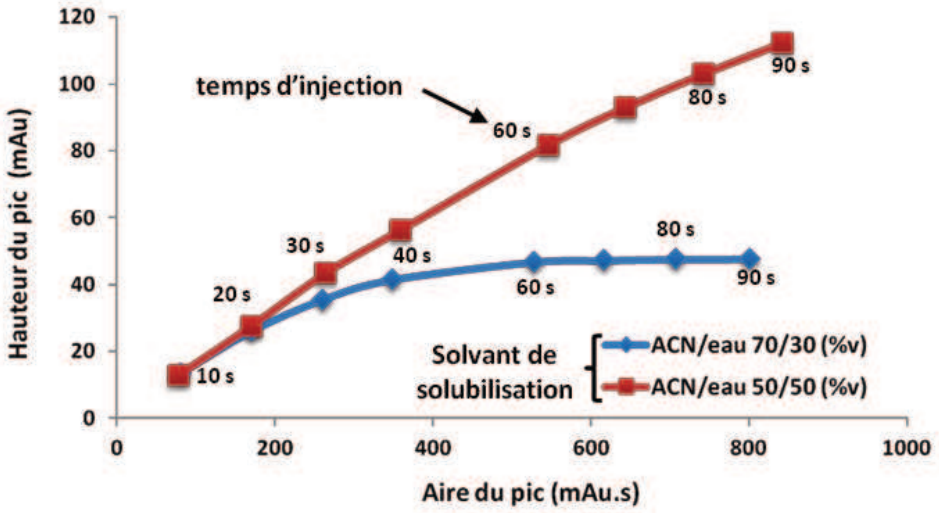


Figure II.22 : Variations de la hauteur pic en fonction de l'aire du pic du fluoranthène à 50 ppm pour différentes compositions de mélange de solubilisation. Monolithe HA/BDDA. Phase mobile : ACN/eau 70/30 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$. Injection : 125 V/cm. Longueur de séparation : 8.5 cm.

Le monolithe HA/BDDA photopolymérisé en capillaire permet de palier à tous les problèmes recensés avec le monolithe LMA/EDMA. Ainsi, des efficacités d'au moins 200 000 plateaux/m ont été observées pour tout type de solutés (tailles et rétentions différentes) et ce, quelle que soit la composition de la phase mobile. De plus, il est possible de mettre en œuvre une étape de préconcentration en tête de capillaire de séparation afin de diminuer la limite de détection. Le transfert de ce monolithe performant en microsystème peut donc être maintenant réalisé.

II.3.2. Transfert de la synthèse en microsystème

Pour le transfert de la synthèse du monolithe HA/BDDA en microsystème COC, le mélange de polymérisation est simplement introduit dans les canaux en COC sans prétraitement préalable. Le microsystème est ensuite irradié pendant 10 minutes à 365 nm (W = 0.95 J/cm^2 à P = 1.7 mW/cm^2). Les solutés sont introduits dans le canal de séparation par injection directe (cf article 1).

Comme observé sur la **figure II.23**, le monolithe acrylate forme une structure homogène présentant une taille de nodules de 1 µm (CV < 3 %). La structure monolithique en microsystème est donc similaire à celle obtenue en capillaire. Néanmoins, le monolithe n'est pas ancré aux parois du microsystème en COC. La présence d'une zone vide entre la paroi du COC et le monolithe peut être une source d'élargissement des bandes de solutés.

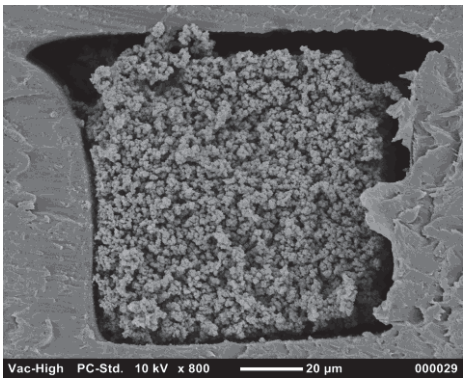


Figure II.23 : Images MEB d'un monolithe HA/BDDA photopolymérisé pendant 10 minutes en microsystème COC. Grossissement ×1500. Tension 10 kV.

La **figure II.24A** montre les courbes de van Deemter obtenues pour l'anthracène en capillaire et en microsystème COC. Des efficacités de 32000 plateaux/m (H = 30 µm) sont observées en microsystème tandis qu'elles sont de l'ordre de 200 000 plateaux/m (H = 5 µm) en capillaire où le monolithe est ancré. Une perte d'efficacité d'un facteur 6 est donc observée lors du transfert de la synthèse du monolithe en microsystème. Cette dégradation d'efficacité est illustrée sur la **figure II.24B** qui compare une séparation de 3 HAP en microsystème COC et en capillaire de silice.

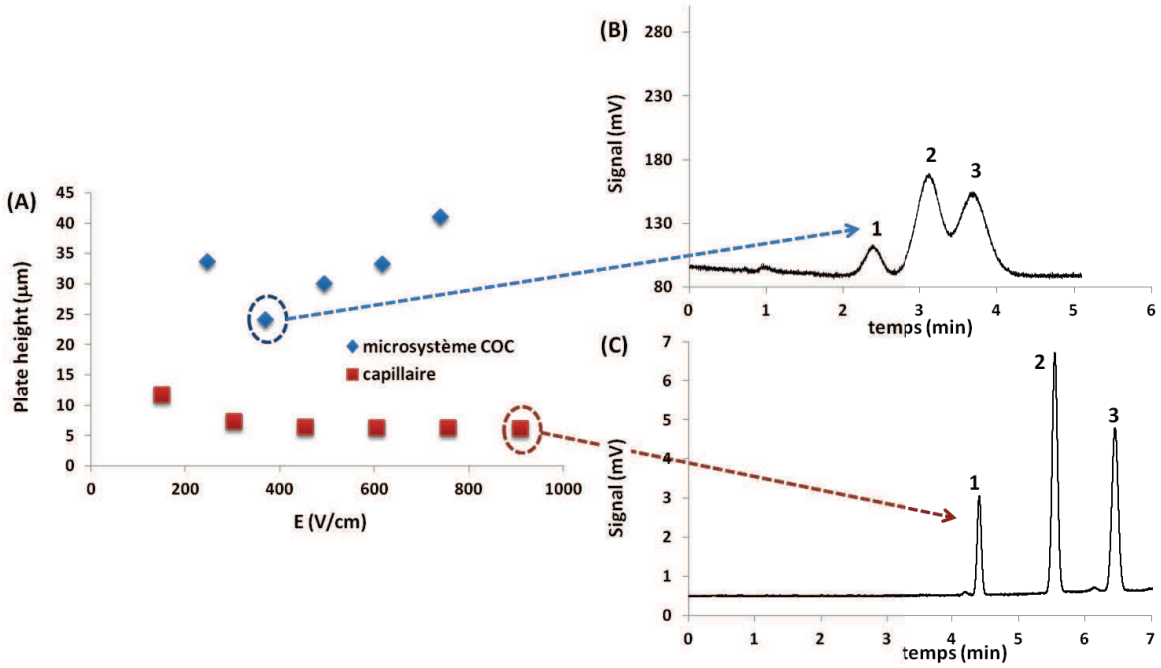


Figure II.24 : (A) Courbes de van Deemter obtenues pour l'anthracène en capillaire et en microsystème COC. Séparation de 3 HAP (B) en microsystème COC et (C) en capillaire (1. Anthracène, 2. Fluoranthène, 3. Pyrène). Phase mobile : ACN/eau 70/30 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$. Injection : 125 V/cm. Longueur de séparation : 3.5 cm en microsystème et 8.5 cm en capillaire.

II.4. Conclusion et perspectives

Contrairement au monolithe LMA/EDMA, le monolithe HA/BDDA est une phase stationnaire performante conduisant en capillaire à des efficacités de 250 000 plateaux/m, ceci indépendamment de la taille et de la rétention des solutés ainsi que de la composition de la phase mobile. Il est compatible avec une étape de préconcentration permettant la diminution des limites de détection. Le monolithe HA/BDDA est donc parfaitement viable pour le développement d'un outil miniaturisé.

Cependant, l'absence d'ancrage du monolithe HA/BDDA à la surface du COC semble être responsable de la dégradation des performances séparatives du monolithe lors du transfert de sa synthèse en microsystème. La mise en place d'un protocole permettant l'ancrage du monolithe à la paroi du COC est nécessaire. Cette étude fait l'objet du chapitre 3.

II.5. Références bibliographiques

[1] Faure, K., Albert, M., Dugas, V., Crétier, G., *et al.*, *Electrophoresis* 2008, *29*, 4948-4955.

[2] Bernabé-Zafón, V., Beneito-Cambra, M., Simó-Alfonso, E. F., Herrero-Martínez, J. M., *J. Chromatogr. A* 2010, *1217*, 3231-3237.

[3] Viklund, C., Svec, F., Frechet, J. M. J., Irgum, K., *Chem. Mater.* 1996, *8*, 744-750.

[4] Decker, C., Jenkins, A. D., *Macromolecules* 1985, *18*, 1241-1244.

[5] Abi-Jaoudé, M., *Thèse*, Université Claude bernard Lyon 1, Villeurbanne 2011.

[6] www.vilber.com/products/crosslinker0.html, consulté le 20/04/2012.

[7] www.microfluidic-chipshop.com, consulté le 20/04/2012.

[8] Augustin, V., Jardy, A., Gareil, P., Hennion, M. C., *J. Chromatogr. A* 2006, *1119*, 80-87.

[9] www.olympusamerica.com/seg_section/product.asp?product=1023, consulté le 20/04/2012.

[10] www.jeol.com/products/electronoptics/scanningelectronmicroscopessem/highvacuumlow vaccum/jcm5000neoscope/tabid/559/default.aspx., consulté le 20/04/2012.

[11] Bernabé-Zafón, V., Beneito-Cambra, M., Simó-Alfonso, E. F., Ramis-Ramos, G., Herrero-Martínez, J. M., *Electrophoresis* 2009, *30*, 1929-1936.

[12] Amparo, C.-M., José, M. H.-M., Carlos, M.-F., Ernesto, F. S.-A., *Electrophoresis* 2008, *29*, 4399-4406.

[13] Svec, F., Frechet, J. M. J., *Macromolecules* 1995, *28*, 7580-7582.

[14] Nischang, I., Teasdale, I., Brüggemann, O., *J. Chromatogr. A* 2010, *1217*, 7514-7522.

[15] Jiang, T., Jiskra, J., Claessens, H. A., Cramers, C. A., *J. Chromatogr. A* 2001, *923*, 215-227.

[16] Barrioulet, M. P., Delaunay-Bertoncini, N., Demesmay, C., Rocca, J. L., *Electrophoresis* 2005, *26*, 4104-4115.

[17] Delaunay-Bertoncini, N., Demesmay, C., Rocca, J.-L., *Electrophoresis* 2004, *25*, 3204-3215.

[18] Proczek, G., Augustin, V., Descroix, S., Hennion, M.-C., *Electrophoresis* 2009, *30*, 515-524.

[19] Augustin, V., Proczek, G., Dugay, J., Descroix, S., Hennion, M. C., *J. Sep. Science.* 2007, *30*, 2858-2865.

Chapitre III

Fonctionnalisation du substrat COC

Ce chapitre a fait l'objet :

- **d'une publication** : "New one-step method for the simultaneous synthesis and anchoring of organic monolith inside COC microchip channels". Y. Ladner, A. Bruchet, G. Crétier, V. Dugas, J. Randon, K. Faure, Lab Chip, 2012, 12, 1680-1685.
- **d'un dépôt de brevet français** : "Procédé de greffage d'un polymère monolithe sur un substrat et dispositif micro-fluidique". Y. Ladner, A. Bruchet, G. Crétier, J. Randon, K. Faure (n° FR 1156586).
- **d'une communication orale** : "Microsystèmes électrochromatographiques en COC : vers la possibilité d'analyses sur site avec des analyseurs jetables". Y. Ladner, G. Crétier, K. Faure, Congrès francophone sur les techniques séparatives et les couplages, 23 – 25 Mars 2012, Toulouse, France.
- **de deux communications par affiche** : "One-pot method for the simultaneous synthesis and anchoring of organic monolith inside COC microchip channel". Y. Ladner, A. Bruchet, V. Dugas, J. Randon, G. Crétier, K. Faure, Lab on a Chip European Congress, 28 – 29 Mars 2012, Edimbourg, Ecosse.

  "Microsystèmes électrochromatographiques en COC : vers la possibilité d'analyses sur site avec des analyseurs jetables". Y. Ladner, G. Crétier, K. Faure, Journée Société Chimique de France, 9 Juin 2011, Chambéry, France.

Contexte

Dans le précédent chapitre, nous avons décrit la synthèse en capillaire d'un monolithe HA/BDDA qui est robuste et performant quelles que soient la phase mobile utilisée, la taille et la rétention des solutés séparés. Cependant, lors du transfert de la synthèse en microsystème, l'absence de point d'ancrage à la surface des parois entraîne une dégradation importante des performances séparatives du monolithe acrylate. Un ancrage est aussi indispensable pour éviter le déplacement du monolithe lors des analyses et préserver la robustesse du dispositif. L'élaboration d'un protocole permettant d'ancrer le monolithe organique aux parois du microsystème en COC par des liaisons covalentes est donc l'objectif de ce chapitre.

Le substrat COC est un plastique contenant uniquement du carbone et de l'hydrogène. Il est donc difficile de réaliser un ancrage de la phase stationnaire sur ce substrat. La technique la plus fréquemment utilisée est un procédé en deux ou trois étapes [1-5]. Dans un premier temps, la surface est activée via une abstraction et modifiée (simultanément ou ultérieurement) par un monomère bifonctionnel. On parle de fonctionnalisation de la surface du COC. Dans un deuxième temps, le monolithe est synthétisé au contact de la surface fonctionnalisée. Les fonctions acrylates présentes sur les parois du fait de la fonctionnalisation sont alors être incorporées à la structure monolithique, ancrant ainsi la phase stationnaire au substrat de manière covalente. Le procédé d'ancrage le plus courant est basé sur le mécanisme d'abstraction d'hydrogène induit par la benzophénone (BP) qui est un photoinitiateur de type II.

Après avoir donné quelques détails techniques et expérimentaux sur les modes opératoires utilisés dans ce chapitre (section III.1), nous présentons dans la section III.2 les résultats obtenus avec ce procédé d'ancrage multi étape mettant en œuvre la benzophénone. Nous verrons que cette stratégie présente de nombreux inconvénients tels que la formation d'homopolymères due à des irradiations de longues durées, un manque de reproductibilité de la synthèse du monolithe et l'utilisation de la benzophénone dont les propriétés photochimiques sont peu compatibles avec l'environnement COC. Pour palier à tous ces problèmes, nous proposons dans la section III.3, à travers une publication (article 2) un nouveau procédé de synthèse et d'ancrage des monolithes acrylates à l'intérieur des microsystèmes plastiques. Ce procédé se déroule en une seule étape et utilise des photoinitiateurs de type I tels que la benzoin méthyl éther (BME) ou l'azobisisobutyronitrile (AIBN). Ces photoamorceurs sont à l'origine d'un mécanisme majoritaire générant des radicaux libres pouvant initier la polymérisation et d'un mécanisme minoritaire permettant d'abstraire des atomes d'hydrogène à la surface du matériau afin d'y greffer des monomères [6-8]. Ce procédé développé et breveté en 2011, permet de diminuer considérablement le temps de préparation du microsystème électrochromatographique et d'accroître sa robustesse.

III.1. Matériels et méthodes

Le protocole de synthèse des monolithes organiques en microsystème COC et la mise en œuvre des microsystèmes (injection, préconcentration, séparation et détection) ont été décrits dans la partie II.1. Cette partie « Matériels et Méthodes » est uniquement dédiée à la description des protocoles de fonctionnalisation et des techniques de caractérisation mises en œuvre pour vérifier l'efficacité de la fonctionnalisation.

III.1.1. Fonctionnalisation de surfaces en COC via des initiateurs de type II

Des plaques de COC ont été greffées par des monomères hydrophiles sous irradiation UV via la benzophénone (qui est un photoinitiateur de type II) selon un processus décrit par Stachowiak et al [9] et détaillé dans la partie I.5.3.

Deux protocoles sont possibles : l'un en deux étapes (protocole 1) [1, 9] , l'autre en une étape (protocole 2) [2, 5, 10-12] :

- protocole 1 : Dans une première étape, une solution de benzophénone de 0 à 5 % en poids dans l'acétone, est introduite entre deux plaques de COC de 1 mm d'épaisseur. Son irradiation à 365 nm initie le processus d'abstraction d'hydrogène qui génère un radical sur la surface du COC et un radical ketyl en solution. En absence de monomère, ces radicaux se recombinent et se lient par liaison covalente à la surface du COC pour former des groupements semi-pinacol. L'irradiation UV est effectuée à une intensité P constante de 1,7 mW/cm^2 tandis que plusieurs temps ou énergies d'irradiation sont testées. Les plaques sont ensuite séparées et rincées intensivement avec de l'eau et de l'éthanol.

Dans une seconde étape, une solution de polyéthylène glycol méthacrylate (noté PEGMA) (Acros Organics, Noisy-Le-Grand, France) à 0.1 M dans l'acétone est introduite entre les deux plaques, puis l'ensemble est à nouveau irradié à 365 nm avec une intensité P de 1.7 mW/cm^2 pendant 10 minutes, ce qui correspond à une énergie d'irradiation de 0.95 J/cm^2 qui est optimale selon les travaux de Stachowiak [9]. Les plaques sont ensuite séparées et rincées à l'eau et à l'éthanol pour éliminer les monomères n'ayant pas réagi. Enfin, les plaques sont placées dans un bain à ultrasons de manière à éliminer tout homopolymère non ancré, puis séchées. Le COC étant uniquement composé de carbone et d'hydrogène, toute molécule restant ancrée au substrat est le résultat d'une abstraction d'hydrogène [2-4, 9].

Ce même protocole a également été appliqué aux microcanaux en COC. Les différentes solutions sont introduites par capillarité. A chacune des étapes, le microsystème est irradié à 365 nm avec une puissance de 1.7 mW/cm^2 pendant différentes durées de manière à étudier l'influence du temps d'irradiation. Le canal est ensuite rincé à l'éthanol, puis le microsystème est séché à 35°C dans un four (GC-17A, Shimadzu, Marne la Vallée, France) pour évaporer l'éthanol.

- **protocole 2** : D'après la littérature [2, 5, 10-12], il est possible de combiner les deux étapes du protocole 1 en une seule. Ce nouveau protocole a été mis en œuvre uniquement en microcanal COC

Un mélange unique a été préparé contenant 0.03 M PEGMA et entre 0 et 5 % (en poids) de benzophénone dans de l'acétone. Ce mélange est introduit par capillarité dans le canal en COC qui est ensuite irradié à 365 nm avec une puissance de 1.7 mW/cm^2 pendant 30 minutes. Le canal est ensuite rincé à l'éthanol, puis séché à 35°C.

III.1.2. Suivi du taux de greffage par mesure d'angle de contact sur surface plane et dans un microcanal

Le PEGMA étant un monomère hydrophile et le COC un polymère connu pour ses propriétés hydrophobes, le taux de greffage de PEGMA sur le COC peut être suivi par mesure d'angle de contact. Ces mesures peuvent être réalisées sur surfaces planes de COC ou directement à l'intérieur des microcanaux de COC.

Dans le cas des plaques en COC, la mesure s'effectue en déposant une goutte d'eau déionisée de 3.3 µL à la surface du substrat à l'aide de l'instrument Digidrop Contact Meter (GBX, Bourg de Péage, France), à température ambiante. Le logiciel Windrop^{++} détermine le contour de la goutte et calcule l'angle de contact grâce à des méthodes d'interpolation.

Lors du dépôt d'une goutte d'eau sur une surface plane, l'angle de contact est défini comme l'angle Θ que fait la tangente à la goutte au point triple solide-liquide-gaz (**Figure III.1**)

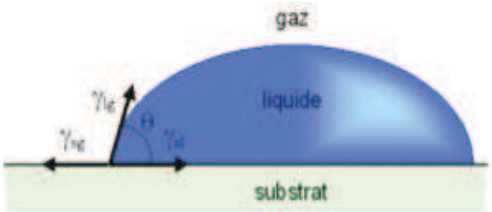


Figure III.1 : Représentation schématique d'une goutte posée sur une surface horizontale.

La mesure de l'angle de contact rend compte de l'aptitude du liquide à s'étaler sur la surface par mouillabilité. Elle permet de calculer les énergies de surface du liquide et du solide et de discriminer la nature polaire ou apolaire des interactions à l'interface liquide-solide [9, 13, 14].

Plus le matériau a d'affinité avec l'eau, plus la goutte s'étale et plus l'angle de contact est faible (caractère hydrophile). Moins il y a d'affinité entre le solide et le liquide, plus la goutte reste sphérique et plus l'angle de contact est élevé (caractère hydrophobe). Des exemples de différents types de gouttes obtenues sont montrés sur la **figure III.2**.

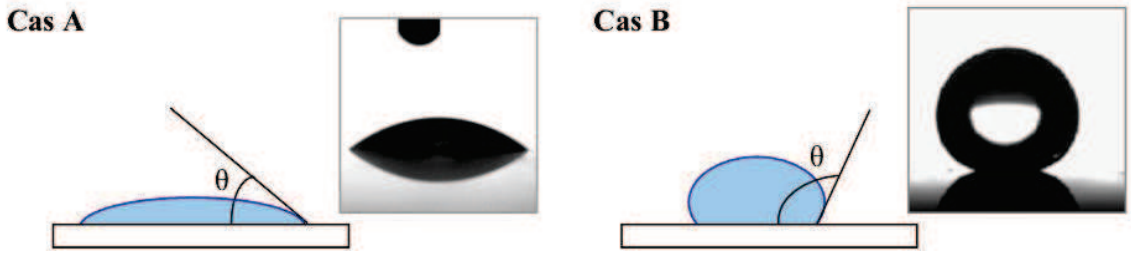


Figure III.2 : Schéma et photographie d'une goutte d'eau déposée sur une surface hydrophile (cas A) et hydrophobe (cas B).

La forme de la goutte à la surface du solide est régie par 3 paramètres (**Figure III.1**) :

- ✓ la tension interfaciale solide-liquide γ_{SL}.
- ✓ la tension interfaciale solide-gaz γ_{SG}.
- ✓ la tension interfaciale liquide-gaz γ_{LG}.

Ces trois grandeurs sont reliées par l'équation de Young :

$$-\gamma_{SG} + \gamma_{SL} + \gamma_{LG} cos\theta = 0 \qquad \textbf{(III.1)}$$

Seuls γ_{LG} et θ sont mesurables. Plusieurs modèles ont été développés pour déterminer γ_{SL} et γ_{SG} [15-17]. Toute modification du caractère hydrophile de la surface solide modifie γ_{SL} principalement et dans une moindre mesure γ_{SG}, ce qui se visualise par une modification de θ.

Il est également possible de déterminer l'angle de contact à l'intérieur d'un microcanal en COC. En effet, l'interface air/eau résultant du dépôt d'une goutte peut rendre compte de l'état de surface des parois du microcanal. Cette observation, permise par la transparence du matériau, s'inspire de la méthode de mesure de l'angle de contact (**Figure III.3**). Plus la paroi du canal a de l'affinité avec l'eau, plus l'eau s'étale et plus l'interface air/eau a la forme d'un ménisque (caractère hydrophile). Dans le cas contraire, l'interface air/eau présente un profil plat (caractère hydrophobe), avec un angle θ proche de 90°.

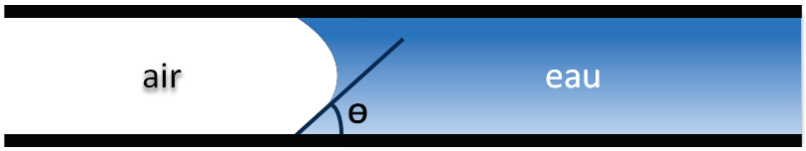


Figure III.3 : Schéma de l'interface air/eau dans un canal.

En pratique, 1 µL d'eau déionisée est déposée à l'aide d'une seringue dans un réservoir du microsystème COC. L'eau remplit partiellement le canal par capillarité. La caméra du microscope inversé Olympus permet de visualiser l'interface air/eau dans le canal en COC. La mesure de l'angle Θ entre la tangente au ménisque et la paroi se fait manuellement sur les images numérisées à partir du logiciel ImageJ.

III.1.3. Protocole d'ancrage du monolithe dans un canal en COC fonctionnalisé via la benzophénone

Pour permettre l'ancrage du monolithe lorsque le COC est fonctionnalisé via un photoinitiateur de type II tel que la benzophénone (protocoles 1 et 2 décrits dans la partie III.1.1), le monomère monofonctionnel PEGMA est remplacé par l'éthylène diméthacrylate (EDMA) qui est un monomère bifonctionnel. La deuxième fonction acrylate du réactif non impliquée dans la liaison avec le substrat peut ensuite réagir avec les monomères du mélange de polymérisation pour ancrer le monolithe HA/BDDA par réaction radicalaire [5]. Le protocole de synthèse du monolithe est le même que celui décrit dans la partie II.2.

III.2. Fonctionnalisation du COC à l'aide de photoinitiateur de type II

III.2.1. Mesure de l'angle de contact sur des plaques COC fonctionnalisées PEGMA

La fonctionnalisation de plaques en COC par des monomères hydrophiles PEGMA via la benzophénone (BP) a tout d'abord été réalisée afin de vérifier que ce type de photoinitiateur permet de greffer des monomères à la surface du COC. Le protocole 1 détaillé dans la partie III.1.1. a été choisi pour cette étude afin de comparer les angles de contact mesurés sur nos plaques avec ceux obtenus par Stachowiak [9].

La **figure III.4** montre l'évolution de l'angle de contact de l'eau en fonction du temps d'irradiation de la première étape pour différentes concentrations en benzophénone. La deuxième étape est toujours réalisée à 365 nm avec une intensité de 1.7 mW/cm² pendant 10 minutes. On remarque tout d'abord qu'en l'absence de photoinitiateur (courbe verte), la présence de monomère PEGMA ne suffit pas à induire son ancrage sur la paroi en COC et ceci quelle que soit la durée d'irradiation. Lorsque la BP est présente dans le mélange, une variation importante de l'angle de contact est observée durant les 10 premières minutes d'irradiation. Cette variation correspond à l'accroissement du nombre de sites actifs créés par abstraction d'hydrogène à la surface du COC (points d'ancrage du PEGMA) au fur et à mesure que le temps d'irradiation augmente. Comme les sites actifs ne peuvent être formés que par abstraction des atomes d'hydrogène, la BP joue un rôle crucial dans l'ancrage des monomères hydrophiles à la surface du COC [9, 18-20].

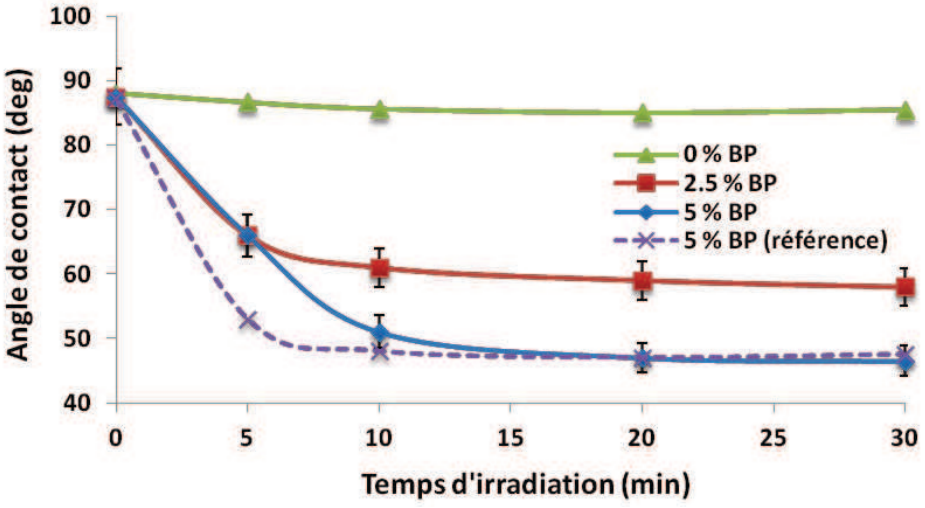


Figure III.4 : Effet du temps d'irradiation et de la concentration en BP sur l'angle de contact de l'eau sur la surface COC fonctionnalisée PEGMA (protocole 1). Concentrations en BP variant de 0 à 5 % wt. 0.1 M PEGMA dans de l'acétone.

Au delà de 10 minutes d'irradiation, quelle que soit la concentration en BP, l'angle atteint une valeur minimale qui n'évolue plus. Ce résultat suggère que toutes les molécules de benzophénone ont réagi au bout de 10 minutes d'irradiation. Cependant, cette valeur minimale de l'angle de contact dépend de la concentration en photoinitiateur. L'angle de contact minimal est de 60 degrés pour 2.5 % de BP et de 50 degrés avec 5 % de BP.

La variation d'angle de contact observée pour 5% de BP est similaire à celle obtenue par le groupe de Stachowiak (courbe violette) [9]. Ce groupe a cependant obtenu plus rapidement un angle de contact de 50 degrés du fait de l'utilisation lors des 2 étapes, d'une intensité UV de 15 mW/cm^2 qui est 10 fois plus importante que celle utilisée dans notre protocole. Si cette intensité UV plus importante n'a pas d'influence sur le nombre de sites actifs créés au moment de la première étape(même taux de greffage final), elle a pour effet, au niveau de la deuxième étape, d'augmenter la vitesse de polymérisation (équation **I.45**) et donc de diminuer le temps de fonctionnalisation nécessaire.

La concentration de 5 % en BP a été définie par Stachowiak *et al* [9] comme étant la concentration nécessaire pour obtenir un taux de greffage maximal de PEGMA à la surface du COC. Comme nos résultats concordent avec ceux de Stachowiak, cette concentration en photoinitiateur est donc utilisée par la suite pour fonctionnaliser *in-situ* les parois des microsystèmes en COC. Des concentrations plus importantes en BP n'ont pas été testées car des effets écrans entraînant un taux de greffage de PEGMA moins important ont été observés par Stachowiak et al [9]. Un temps d'irradiation de 30 minutes est utilisé afin de s'assurer que la fonctionnalisation du COC est complète.

III.2.2. Fonctionnalisation d'un canal COC par du PEGMA et observation de l'interface air/eau

Après fonctionnalisation du microsystème par du PEGMA, l'observation de l'interface air/eau permet de mettre en évidence la modification chimique de la surface du matériau directement dans le microcanal (milieu fermé). La **figure III.5A** montre que l'absence de prétraitement de la surface du COC conduit à une interface air/eau présentant un profil plat. L'eau ne semble pas s'étaler sur les parois du COC. L'angle de contact Θ est de 85°, ce qui suggère que ce matériau présente un caractère fortement hydrophobe.

Dans le cas d'un prétraitement du COC par du PEGMA selon le protocole 1 décrit dans la partie III.1.4, l'eau a tendance à s'étaler sur les parois et l'interface air/eau présente la forme d'un ménisque (figure **III.5B**). La forte diminution de l'angle de contact (de 85 à 58°) traduit le caractère hydrophile du matériau fonctionnalisé.

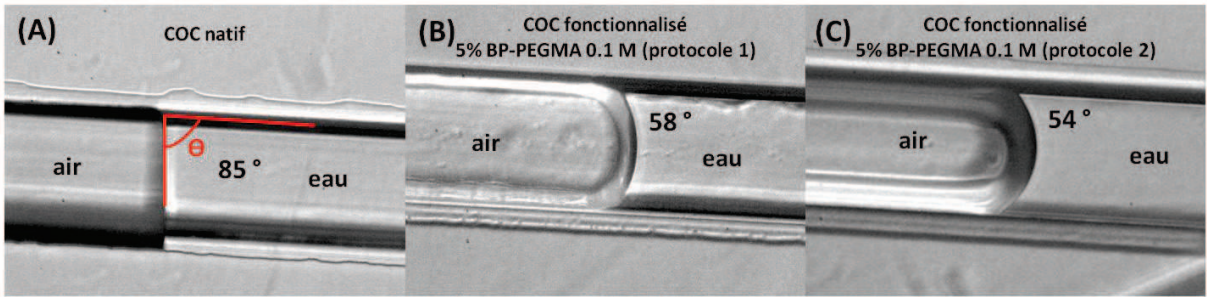


Figure III.5 : Observation de l'interface air/eau dans un canal COC (A) natif, (B) fonctionnalisé PEGMA selon le protocole 1 et (C) fonctionnalisé PEGMA selon le protocole 2.

Le protocole 1 de fonctionnalisation, faisant appel à une abstraction d'hydrogène par la benzophénone suivie par d'une polymérisation initiée par la surface du COC, a donc pu être mis en œuvre sur des plaques de COC, mais également transféré de manière directe *in-situ* dans des canaux. Le taux de greffage semble similaire dans les deux formats, avec l'obtention d'un angle de contact de 50 degrés sur plaque et 58 degrés en microcanal.

Dans les microcanaux en COC, le protocole 2 (en une seule étape) a aussi été utilisé. La **figure III.5C** montre un microcanal fonctionnalisé à l'aide d'un mélange unique (BP + PEGMA). Le taux de greffage obtenu selon ce protocole est relativement proche de celui obtenu en deux étapes, puisque les angles de contact mesurés sont de 54 et 58 degrés, respectivement.

Le protocole 2, réalisé en une étape, est plus rapide et nécessite moins de manipulation. Cependant, la mise en contact de la BP et d'un monomère engendre un risque de formation d'homopolymères initiée par l'abstraction d'hydrogène sur la molécule monomère. Ces homopolymères peuvent être source d'obstruction des microcanaux et leur élimination nécessitent de longs rinçages post-fonctionnalisation.

III.2.3. Synthèse et ancrage du monolithe HA/BDDA dans un canal COC fonctionnalisé EDMA

Afin de favoriser l'ancrage du monolithe à venir, la surface des microcanaux est fonctionnalisée par des monomères bifonctionnels EDMA en lieu et place du PEGMA. Pour cela, le protocole en une seule étape utilisant un mélange BP/EDMA est mis en œuvre.Des fonctions acrylates libres sont ainsi implantées sur les parois. Lors de la synthèse du monolithe, ces fonctions se retrouvent incorporées à la structure au même titre que les autres monomères, créant ainsi un lien permanent entre paroi et phase stationnaire.

La **figure III.6** montre que la fonctionnalisation préalable du COC par des monomères EDMA semble permettre l'ancrage du monolithe sur les parois puisque des nodules interconnectés sont fixés à la surface du COC. De plus, le monolithe présente une structure homogène avec des tailles de nodules de 0.9 µm. La structure monolithique obtenue en microsystème est donc similaire à celle obtenue en capillaire, ce qui suggère que la fonctionnalisation du COC ne modifie pas la morphologie du monolithe HA/BDDA.

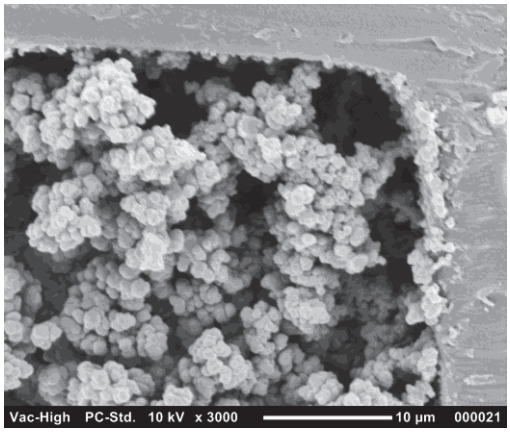


Figure III.6 : Images MEB d'un monolithe HA/BDDA ancré sur les parois du COC par l'intermédiaire d'une fonctionnalisation EDMA. Grossissement ×3000. Tension 10 kV.

Une caractérisation électrochromatographique du monolithe obtenu a permis d'évaluer la robustesse de la synthèse ainsi que les performances séparatives du monolithe acrylate. Les tests de robustesse sont effectués en séparant un mélange standard de 4 HAP avec une phase mobile ACN/eau 70/30 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$ et un champ électrique de 757 V/cm correspondant à la vitesse optimale de séparation (**Figure III.7**).

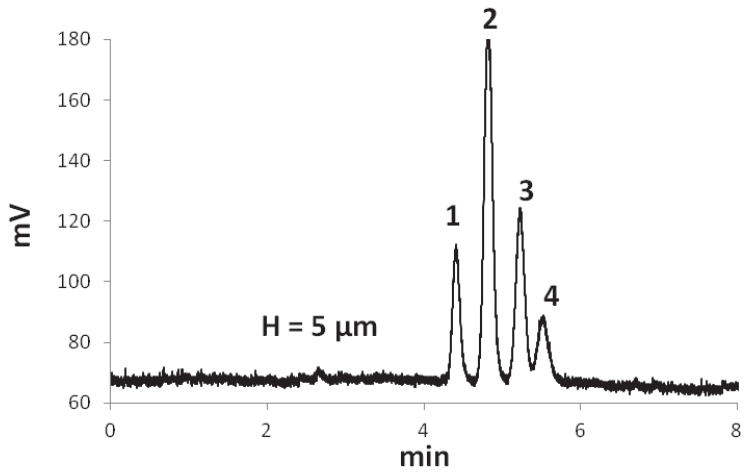


Figure III.7 : Séparation électrochromatographique de 4 HAP. $E_{separation}$ = 620 V/cm. Phase mobile : ACN/eau 70/30 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$. Injection : 125 V/cm pendant 5 s. Longueur de séparation : 3.5 cm. Solutés : (1) anthracène à 0.36 mM, (2) fluoranthène à 4.23 mM, (3) pyrène à 18.6 mM et (4) benzo-a-anthracène à 4.2 mM.

La hauteur équivalente à un plateau théorique H est égale à 5 µm sur les 4 HAP. Les efficacités obtenues dans cette expérience sont donc identiques à celles obtenues en capillaire. Cependant, les tests de reproductibilité inter-lot ont montré des CV supérieurs à 50 % sur H. Ce manque de robustesse de la synthèse du monolithe HA/BDDA en microsystème COC semble être dû à l'absence d'ancrage du monolithe sur la paroi COC pour de nombreuses synthèses, comme le montre la **figure III.8**.

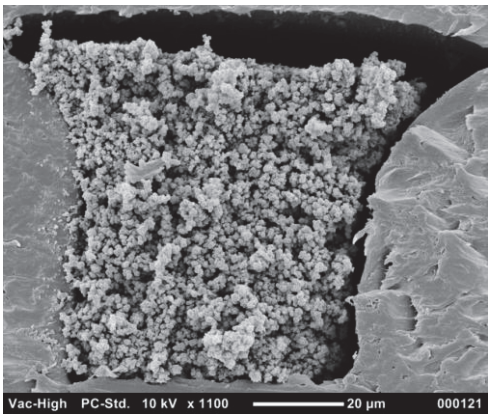


Figure III.8 : Images MEB d'un monolithe HA/BDDA mal ancré dans un canal COC par l'intermédiaire d'une fonctionnalisation EDMA. Grossissement ×1100. Tension 10 kV.

La forte sensibilité de la benzophénone à la présence de dioxygène O_2 dans le mélange de polymérisation (qui peut engendrer une inhibition de la réaction d'abstraction d'hydrogène à la surface du COC [21-23]) peut être responsable de ce manque de robustesse. De plus, la benzophénone présente un faible rendement quantique à 365 nm [1, 11]. Cette faible réactivité de la benzophénone semble conduire à une activation relativement faible de la surface qui ne permet pas

de greffer suffisamment de monomères bifonctionnels (EDMA) et donc d'induire un grand nombre de points d'ancrage du monolithe sur les parois.

L'ancrage du monolithe acrylate sur les parois du COC par l'intermédiaire du mécanisme d'abstraction d'hydrogène de la benzophénone n'est donc pas une méthode viable car peu reproductible. Un nouveau protocole robuste et performant doit être mis en place afin de pouvoir synthétiser et ancrer in-situ le monolithe HA/BDDA dans un canal COC.

III.3. Synthèse et ancrage simultanés du monolithe dans des microcanaux en COC à l'aide de photoinitiateur de type I

Cette étude a fait l'objet de la publication reproduite dans la partie III.3.1. Elle décrit le développement d'un nouveau procédé permettant la synthèse et l'ancrage d'un monolithe HA/BDDA dans des microcanaux en COC en une seule étape. Ce procédé est réalisé sous photo-activation à partir d'un mélange contenant des monomères multi-insaturés (HA et BDDA), un monomère chargé (AMPS), un agent initiateur de polymérisation (BME) et des agents porogènes (ACN/éthanol/tampon phosphate 5 mM pH 6). Une teneur importante en initiateur de type I permet de générer simultanément une abstraction d'hydrogène à la surface du substrat par l'agent initiateur et une polymérisation-réticulation des monomères présents, ce qui conduit à la formation en une seule étape d'un monolithe poreux greffé par liaison covalente à la surface du substrat.

Le travail expérimental a été tout d'abord orienté vers la mise en évidence du mécanisme d'abstraction des atomes d'hydrogène à la surface du COC par des photoinitiateurs de type I (BME et AIBN). Ensuite, l'étude a porté sur l'influence du pourcentage massique en photoinitiateur dans le mélange de polymérisation sur la morphologie du monolithe à l'intérieur du canal en COC et sur les performances séparatives du microsystème obtenu.

Si l'ancrage du monolithe permet une amélioration des performances électrochromatographiques, ces performances restent, à l'optimum, inférieures à celles observées en capillaire et les études complémentaires présentées à la fin de ce chapitre (partie III.3.2) ont pour but d'identifier l'origine de la différence d'efficacité enregistrée entre les formats microsystème et capillaire.

III.3.1. Article 2 : New « one-step » method for the simultaneous synthesis and anchoring of organic monolith inside COC microchip channel

Lab on a Chip

Dynamic Article Links

Cite this: DOI: 10.1039/c2lc21211k

www.rsc.org/loc

PAPER

New "one-step" method for the simultaneous synthesis and anchoring of organic monolith inside COC microchip channels

Yoann Ladner,[a] Anthony Bruchet,[ab] Gérard Crétier,[a] Vincent Dugas,[a] Jérôme Randon[a] and Karine Faure*[a]

Received 6th December 2011, Accepted 9th February 2012
DOI: 10.1039/c2lc21211k

A new method for monolith synthesis and anchoring inside cyclic olefin copolymer (COC) microchannels in a single step is proposed. It is shown that type I photoinitiators, typically used in a polymerization mixture to generate free radicals during monolith synthesis, can simultaneously act as type II photoinitiators and react with the plastic surface through hydrogen abstraction. This mechanism is used to "photograft" poly(ethylene glycol) methacrylate (PEGMA) on COC surfaces. Contact angle measurements were used to observe the changes in surface hydrophilicity when increasing initiator concentration and irradiation duration. The ability of type I photoinitiators to synthesize and anchor a monolith inside COC microchannels in a single step was proved through SEM observations. Different concentrations of photoinitiators were tried. Finally, electrochromatographic separations of polycyclic aromatic hydrocarbons were realized to illustrate the beneficial effect of anchoring on chromatographic performances. The versatility of the method was demonstrated with two widely used photoinitiators: benzoin methyl ether (BME) and azobisisobutyronitrile (AIBN).

Introduction

On the spur of the incredibly large number of applications developed in microfluidic devices, such as extraction, micro-reaction, separation, and sample preparation,[1] the implementation of porous solid supports becomes a requisite in the development of lab-on-chips.[2] Monolithic supports have already been proved a tremendous success in capillary format for many years. They also answer most specifications for a proper use in microfluidic devices when synthesized through a photoinduced process.[3] As stationary phases for chromatographic separation techniques, they were implemented in glass, polyimide or PDMS devices.[4]

Recently, cyclic olefin copolymer (COC) emerged as a substrate offering better chemical resistance than any other thermoplastic polymers while exhibiting optical transparency close to that of glass (for wavelengths over 300 nm). These qualities should allow for *in situ* photo-induced synthesis of organic monoliths, and their subsequent applications using organic solvents and optical detection (UV-Vis absorption, fluorescence). A technological challenge in the realization of monolithic beds in COC microdevices lies in the anchoring of monoliths to the COC walls. Such anchoring is required for robustness under pressure and for performances by reducing preferential mobile phase paths.

We recently demonstrated that wall ruggedness was sufficient to hold a non-anchored monolith in a COC device used in electrochromatography without pressure. Plate heights as low as 15 μm were obtained.[5,6] To enlarge the device application range and enhance separation performances, it is however strongly recommended to bind the stationary phase to the walls in a covalent manner. This is a very difficult task due to the aliphatic carbon atoms that constitute the COC backbone.

Photoinitiated free radical polymerization offers the advantages of being achievable both on planar surfaces and inside microfluidic channels, thanks to the COC optical transparency over a large range of wavelengths. The Mecomber's group[7] proposed to modify COC surfaces with perfluorinated aromatic azides. Under irradiation, the aryl azide moiety turns into a singlet aryl nitrene which can rapidly react with C–H bonds of the COC chemical structure. These azides could easily be chemically modified to carry quaternary amines or aldehyde groups to allow for further chemical modifications.

Another approach consists in the photoactivation of the C–H bond of the COC substrate *via* benzophenone-mediated hydrogen abstraction, thus forming free radicals on the surface, followed by a surface-initiated polymerization of bifunctional molecules. This mechanism was introduced and elucidated by the Ranby group[8,9] who demonstrated the influence of COC surface chemical composition on the photografting reactivity. With COC made by copolymerization of norbornene and ethylene, the number of tertiary hydrogens is elevated on the backbone, which makes such a COC a good candidate for hydrogen abstraction.

[a]*Institut des Sciences Analytiques, UMR UCBL—CNRS 5280, Université de Lyon Université Claude Bernard Lyon 1, 43 boulevard du 11 Novembre 1918, bâtiment Curien, 69622 Villeurbanne, France. E-mail: karine.faure@univ-lyon1.fr*
[b]*Laboratoire d'Analyses Nucléaires Isotopiques et Elémentaires Commissariat à l'Energie Atomique (CEA—Saclay), 91191 Gif-sur-Yvette, France*

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2012

The chemical modification of COC surfaces *via* benzophenone activation has been illustrated by Stachowiak[10] where hydrophilic polyethylene glycol methacrylate (PEGMA) monomers were photografted onto the COC surface in order to increase surface hydrophilicity and reduce protein adsorption. The same research group also optimized H_2 abstraction by propagating the benzophenone action onto the already-grafted molecules, leading to surface-localised branched polymers.[11]

Following this principle, binding an organic monolith onto a thermoplastic surface is achieved based on the assumption that a bifunctional monomer can be grafted onto the COC surface *via* benzophenone and the remaining unreacted polymerizable moieties can simultaneously be incorporated in the monolith structure during its synthesis. This principle was first illustrated by Stachowiak *et al.*,[12] who modified the channels of a COC chip with ethylene diacrylate in the presence of benzophenone prior to the *in situ* synthesis of a butyl methacrylate–ethylene glycol dimethacrylate (BMA–EDMA) monolith. The concept was further developed by Ro,[13] who used a triacrylate monomer as a grafted intermediary layer, which allowed the subsequently synthesized ethyl hexyl methacrylate– ethylene glycol dimethacrylate (EHMA–EDMA) monolith to withstand high pressure and serve as a stationary phase on a chip.

However, introducing simultaneously benzophenone as photoinitiator and a polyfunctional monomer as intermediary molecule strongly enhances the risk of homopolymers formation and channel clogging. Following Svec,[10] Deverell developed a sequential grafting method first activating the COC surface by benzophenone and then reacting it with a monomer. The monolith was finally prepared *in situ* in a third step, incorporating grafted monomers in its architecture.[14] This controlled polymerization process resulted in a monolithic microreactor with good flow-through properties.[14]

Screening the different approaches developed to anchor monoliths on thermoplastic substrates three serious drawbacks can be pointed out:

(1) the process is long with numerous polymerization and rinsing steps, not compatible with industrial production;

(2) the use of benzophenone requires irradiation at 254 nm,[8,14] which limits the process to microfluidic devices with low UV cut-off transparency;

(3) the presence of an intermediate layer of polymers may introduce a radial lack of homogeneity in the resulting stationary phase, which can be detrimental for percolation properties and hence chromatographic performances.

The present work proposes a new method for the synthesis and simultaneous anchoring of organic monolith inside COC microchip channels avoiding all three pre-cited problems. The idea is to generate free radicals under irradiation assuming that common photoinitiators such as azobisisobutyronitrile (AIBN) or benzoin methyl ether (BME) can also act as type II photoinitiators and abstract hydrogen atoms from a plastic surface. AIBN and BME are widely used in monolith synthesis.[15,16] We propose to use them to simultaneously activate the COC substrate *via* hydrogen abstraction and initiate monolith synthesis with free radical generation, in a single step. The main advantages of this single step one-pot synthesis with a single photoinitiator to synthesize and anchor a monolith inside COC microchannels are the avoidance of the formation of heterogeneous structures and speeding up of the overall production process.

Experimental

Materials

Hexyl acrylate (HA), 1,3-butanediol diacrylate (BDDA), glycidyl methacrylate (GMA), ethylene glycol dimethacrylate (EDMA), 2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid (AMPS), polyethylene glycol methacrylate (PEGMA), 1,4-butanediol, 1-propanol, azobisisobutyronitrile (AIBN) and benzoin methyl ether (BME) were obtained from Acros Organics (Noisy-Le-Grand, France). Ammonium phosphate ($NH_4H_2PO_4$) was from Sigma-Aldrich (Isle-d'Abeau, France). Acetonitrile and ethanol were HPLC-grade from SDS (Peypin, France).

Cyclic olefin copolymer devices (Topas® 6013) were fabricated by Microfluidic Chipshop GmbH (Jena, Germany). COC plates are in microscope slide format (75.5 mm × 25.5 mm, thickness 1.0 mm). Microfluidic chips for MEB observation display a single channel with two moulded reservoirs; the length of the separation channel is 58.5 mm and the channels are 100 μm deep by 100 μm wide. Microfluidic chips for electrochromatographic separation exhibit an 81 mm long, 75 μm deep, 75 μm wide channel.

Microfluidic chips for pressure tests were graciously provided by Laboratoire des Macromolécules et Microsystèmes en Biologie et Médecine (Institut Curie, Paris, France). They were fabricated by hot embossing and supplied with threaded connection holes. Their dimensions were 250 μm × 450 μm × 4.5 cm.

Instrumentation

The illumination system used to perform UV irradiation was a Bio-link cross-linker (VWR International, Strasbourg, France) equipped with five 8 W UV tubes, emitting at 365 nm with an intensity of 1.5 mW cm^{-2}. A JEOL JSM 6700F scanning electron microscope (SEM) (Tokyo, Japan) was used for both observations: monolith grafting onto COC materials and estimations of the nodule size. The contact angle of the PEGMA-coated COC surface was determined using a GBX Instruments Digidrop Contact Angle Meter at room temperature. A droplet of 3 μL was placed slowly on the surface and after 30 s, the contact angle was measured. The reported contact angles are averages of at least three measurements at different locations. Pressure tests were realized by connecting the chips to an Eldex Micropro pump (Microm, Germany) *via* Upchurch fittings.

Microchip analyses were monitored by an inverted fluorescence microscopic system (IX-71, Olympus, France) equipped with a 100 W mercury lamp and 330 nm excitation filter (collection above 400 nm) (XF02-2, Omega, USA) for the detection of fluorescent PAH. A CCD camera was combined with NI Vision software (Alliance Vision, France) for detection processing. A high power supply (Micralyne, Canada) was used to apply electric fields to the microchannels through platinum electrodes placed in the reservoirs. All system operations were performed with Labview 7.1 (National Instrument, Austin, TX, USA).

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2012

COC surface modification

The COC planar surfaces were modified using a one-step photografting procedure to show the ability of the type I photoinitiator to abstract hydrogen atoms on COC surfaces. A graft polymerisation solution was made by mixing 30 μL of PEGMA (0.1 M), 70 μL of acetone, and a photoinitiator (BME or AIBN). The quantity of initiator varies from 0.5 to 5 wt%. The solutions of PEGMA were sealed in the space between two COC plates and then exposed to UV irradiation at 365 nm. The duration of irradiation controls the received energy. The COC planar surface was then rinsed extensively with water and ethanol to remove the unreacted PEGMA and sonicated to eliminate homopolymers. The COC surface modification was characterized by contact angle measurement.

Preparation of monolithic columns in COC microchip

Two types of polymerization mixtures were prepared as follows. A monolith based on HA–BDDA was previously used to separate neutral compounds by electrochromatography in a capillary.[17] The porogenic mixture was made up of 54% of ACN, 23% of ethanol, and 23% of water (% w/w). The porogenic mixture was dissolved in a monomer mixture containing 66.4% w/w of HA and 33.6% w/w of BDDA. The ratio of the monomer to the porogenic mixtures was 34.5 : 65.5 w/w. AMPS (0.5% w/w of monomers) was added to the polymerization mixture in order to be able to generate an electroosmotic flow. BME was used as a radical photoinitiator at different percentages (0.5, 1.5, 2.5 and 3% w/w of monomers), 0.5% being the usual amount for capillary. BME is not soluble in the polymerization mixture when its percentage is higher than 3%.

A second monolith based on GMA–EDMA is widely used because of its epoxy groups reactivity.[18] The porogenic mixture was made up of 52.4% 1-propanol, 38.2% 1,4-butanediol and 9.4% water.[19] The monomer mixture, constituted of 75.4% w/w GMA and 24.6% w/w EDMA, was then dissolved in the porogenic one at a ratio of 49.9 to 50.1 v/v. AIBN was used as a radical photoinitiator at different percentages (1, 3, 4 and 5% w/w of monomers), 1% being the usual amount for capillary. AIBN becomes insoluble in the polymerization mixture when its amount passes 5% w/w.

The polymerization mixtures were introduced in the microchannels by pressure using a syringe. The microchip was submitted to a subsequent irradiation at 365 nm for 20 min ($E = 1.9$ J cm^{-2}) for HA–BDDA monolith and 30 min ($E = 2.6$ J cm^{-2}) for GMA–EDMA monolith.

Pressure tests

Once the monoliths were synthesized in pressure test chips, the device was connected to an Eldex Micropro pump and 100% acetonitrile was pumped at various flow rates while reading the resulting backpressure on the pump control panel. The reading precision was 0.35 bars.

Electrochromatography procedure in microchannels

Channels filled with HA–BDDA monoliths were then rinsed with ACN/water 70/30 (v/v) + 2 mM $NH_4H_2PO_4$ + 5 mM LiDS for 30 min by applying an electric field of 617 V cm^{-1} to remove any unreacted reagent. Solute injection in the separation channel was realized by using the simple direct injection mode previously described applying a single electric field across the separation channel.[5] The main advantage of this method is the avoidance of voltage programs. Briefly, this injection is composed of four steps: sampling, injection, rinsing and separation steps. In the sampling step, a droplet of 2 μL of the sample mixture is placed in the hole of the inlet reservoir. To inject, an electric field is applied for several seconds to introduce the sample mixture in the channel. The inlet reservoir is then fully washed with mobile phase, which avoids sample leakage. Finally, an electric field is applied for the separation step. The separation length is 3.5 cm.

Results and discussion

Two main families of photoinitiators are used in organic monolith synthesis: the carbonyl-based initiators and the azo-based initiators. In order to expand our process to the major part of monolith formulae, we studied the two most representative molecules of these families: benzoin methyl ether (BME) and azobisisobutyronitrile (AIBN).

First, the capability of these initiators to create reactive sites on COC surfaces must be evaluated. Next, the one-pot process for the simultaneous anchorage and synthesis of organic monolith in a COC microfluidic device will be described. Two typical monolith formulae: hexyl acrylate monolith with BME as initiator, and glycidyl acrylate monolith with AIBN as initiator were evaluated.

Photografting from COC sites initiated by type I photoinitiators

Benzoin methyl ether initiator. The chemical composition of the COC backbone is restricted to carbon and hydrogen atoms arranged in aliphatic chains. In order to conduct a covalent binding between this substrate and a monomer, hydrogen abstraction needs to be performed. 2-Methoxy-2-phenylacetophenone also known as benzoin methyl ether (BME) produces free radicals by homolytic bond cleavage upon absorption of UV light. This photocatalytic reaction is used in many polymerization processes including organic monolith synthesis.[20–23] However, it appears that BME can also abstract hydrogen from donor material.[24] This minor mechanism is usually typical of type II initiators such as benzophenone. Under irradiation, the excited state of the photoinitiator interacts with a coinitiator to generate free radicals. To evaluate the extent of this mechanism from BME onto COC upon irradiation, we studied the photografting of PEGMA monomer onto COC plates.

When irradiating COC plates at 365 nm in the presence of a mixture of BME and PEGMA, two mechanisms occur. As mainly a type I photoinitiator, BME generates free radicals in solution, which in turn initiate the formation of poly(PEGMA) homopolymers in solution. The minor type II mechanism that occurs at the close vicinity of the COC substrate leads to hydrogen abstraction at the substrate surface and subsequent attachment of a PEGMA monomer to the thermoplastic material. An extensive rinse followed by efficient sonication ensures that every homopolymer in solution gets eliminated while the

remaining PEGMA molecules are assumed to be covalently grafted onto the COC surface.

Due to the hydrophobic character of COC and hydrophilic character of PEGMA, the extent of grafting can be monitored simply by contact angle measurement. Investigation of this grafting mechanism over a wide range of BME concentrations and irradiation times is shown in Fig. 1a. When no initiator is present in the graft polymerisation mixture, no modification of the hydrophobic character of COC is observed, which illustrates the complete removal of unreacted adsorbed PEGMA monomers and poly(PEGMA) homopolymers, thus validating the rinsing and sonicating steps.

At any given BME concentration, increasing the irradiation time increases the received energy and therefore the extent of grafting. This was expected since the number of COC sites that undergo hydrogen abstraction grows along with irradiation time. When looking at various concentrations of BME photoinitiator, it is clear that even if a large proportion of BME is dedicated to the formation of homopolymers in solution, a non-negligible part of the photoinitiator reaches and interacts with the COC substrate even when a low concentration (0.5% BME) is used.

Surface modification is related to the local concentration of photoinitiator on the COC surface. However, when the concentration is too high, here 5% BME, the photoinitiator acts as a masking agent whose molecules in solution absorb the light energy before it reaches the surface where hydrogen abstraction occurs. This quenching phenomenon was also observed when using another photoinitiator, benzophenone, to graft PEGMA onto COC.[10] This observation meets the common position that when using photoinitiation, the concentration of the initiator is a trade-off between maximizing the radical formation rate while keeping sufficient light transmission. Here a concentration of 2.5% BME results in the highest grafting density. At optimal conditions, the surface of COC could be significantly modified using a minor decomposition mechanism of BME upon irradiation, since contact angle reached down to 50°.

Azobisisobutyronitrile initiator. Azobisisobutyronitrile (AIBN) is most often used as a polymerization initiator upon heat activation, but more and more light activation is employed. Organic monoliths are now developed in capillary format based on the photodegradation of AIBN at 365 nm.[25–30] The minor type II mechanism that AIBN can undergo is hardly exploited.[31] The ability of AIBN to abstract hydrogen from the COC substrate to photoinitiate grafting from the plastic surface must be investigated. As previously, PEGMA photografting from the COC surface was carried out in order to evaluate AIBN reactivity. It clearly appears from Fig. 1b that AIBN can also activate the COC grafting site to covalently link PEGMA molecules. Using 2.5% AIBN with an irradiation time of 30 min (at 2.52 J cm^{-2}) led to the same surface modification as when using 2.5% BME photoinitiator. The 30 min requisite time for complete surface modification with AIBN was found to be higher than the 20 min needed with BME. A possible lower photoreactivity or difference in extinction coefficients of AIBN when compared to BME (11.9 M^{-1} cm^{-1} *versus* 215 M^{-1} cm^{-1}, respectively) may explain the reactivity difference.[32] Surprisingly the very same concentration of 2.5% for both photoinitiators was found to be optimal to get the highest grafting density. The resulting contact angle was nearly the same in both cases: 50° and 45° for BME and AIBN respectively. At highest concentrations (5% w/w monomers or more), the surface grafting process seems to produce erratic behavior, which may result from a quenching effect, the initiator being locally too concentrated.

It is considered that BME and AIBN molecules contained in the polymerization mixture could interact with the COC environment when performing *in situ* monolith syntheses.

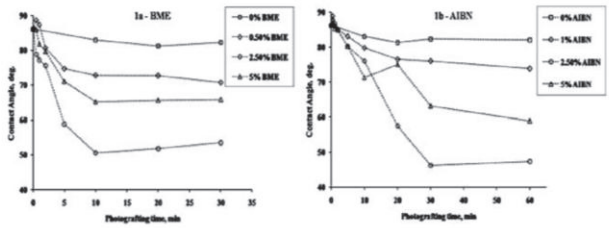


Fig. 1 Effect of irradiation time and initiator concentration on average water droplet contact angles ($n = 3$) for PEGMA grafted COC surfaces. Initiator concentrations from 0–5 wt% in acetone. 0.1 M PEGMA in acetone. 1a—initiator BME; 1b—initiator AIBN.

Simultaneous *in situ* synthesis and anchoring to the COC surface

For each initiator, a typical monolith was synthesized in native COC channels. During the irradiation of the polymerization mixture, the major part of the photoinitiator contained in the formulation gets involved in the generation of monolithic nodules, while a minor proportion located at the channel surface can interact with COC *via* hydrogen abstraction to give rise to grafting sites.

From these grafting sites, acrylate or methacrylate monomers can polymerize the bifunctional ones (diacrylate or dimethacrylate) acting as linking molecules between the channel wall and the simultaneously growing monolith. When the photoinitiator is absent from the polymerization mixture, neither monolith nor surface modification is observed and the channel walls remain perfectly smooth despite irradiation of monomers at its vicinity for over 30 min. Non-specific reactions with acrylates are avoided by using a 365 nm wavelength instead of a stronger UV wavelength of 254 nm (Fig. 2a).

Concentrations of 0.5–1% photoinitiator (w/w of monomers) are typically used in most organic monolith syntheses, both in capillary format[17] and in chip format. This amount is sufficient to generate a homogeneous monolithic structure in the main part of the channel, but it is too low to induce grafting onto the channel

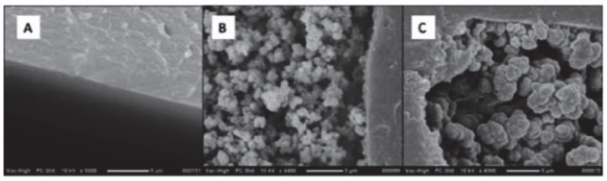


Fig. 2 SEM images of a COC channel filled with (a) HA–BDDA monolith. BME content: 0%; irradiation 30 min (2.7 J cm^{-2}); (b) HA–BDDA monolith. BME content: 2.5%; irradiation 20 min (1.8 J cm^{-2}); (c) GMA–EDMA monolith. AIBN content: 2.5%; irradiation 33 min (3 J cm^{-2}).

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2012

walls. Few anchoring sites may eventually hold the monolith when using electroosmotic flows,[5] but did not prove to be strong enough to resist under pressure. Moreover, voids will be detrimental to separation performances on the obtained stationary phases. The monoliths realized with such low contents of photoinitiator exhibited a poor resistance to pressure, with the monolith clearly bursting out from the microchannel. The pressure limit was around 1 bar for HA–BDDA monoliths with 0.5% BME and around 0.1 bar for GMA–EDMA monoliths with 1% AIBN in 250 μm × 450 μm × 4.5 cm channels.

As soon as the amount of photoinitiator was increased to 1.5%, the density of grafting sites from COC was sufficient to fill up the void between the wall and the monolithic structure. For concentrations reaching 2.5% of the photoinitiator, the anchorage is visible for both monoliths (Fig. 2b and c). Besides, for the optimized amount of photoinitiator for each formula, it seems that the morphological aspect of the monoliths is similar in microfluidic devices to the one obtained in capillaries. In both cases the nodules have closely the same size (around 1 μm). As expected, when using optimal initiator content, namely 2.5% AIBN or BME, the anchorage was sufficient for the monolith to resist over 20 bars. The experiments could not be carried out well above this pressure value due to connector leaks or chip cleavage.

The experimental permeability of both monoliths was typical for acrylate and methacrylate-based monoliths, with back-pressures of 20 bars at 10 μl min^{-1} for the HA–BDDA monolith and 50 μl min^{-1} for the GMA–EDMA one. These flow rates are compatible with chromatographic techniques, and could even be increased if the chip fabrication and connection are improved.

In short, both AIBN and BME can be used as single photoinitiator for the simultaneous *in situ* synthesis of organic monoliths (through type I decomposition) and anchoring of this monolith to the COC surface (*via* type II photoinitiation mechanism). This simple one-step procedure should significantly improve the reproducibility of monolith synthesis in chip format.

Anchoring and electrochromatographic performances

To illustrate the interest of the proposed method for organic monolith COC microchannel preparation, the electrochromatographic performances of several devices were evaluated. The stationary phases obtained from *in situ* synthesis of HA–BDDA monolith in a COC channel using various amounts of BME were characterized by performing the separation of polycyclic aromatic hydrocarbons as previously described.[17] The efficiencies obtained for anthracene at different percentages of BME are shown in Fig. 3. As expected from SEM observations, the monoliths obtained using 0.5% BME gave low electrochromatographic performances (H_{min} = 24 μm), due to solute band broadening in dead volumes between the stationary phase and channel walls. This confirms the assumption that most of the capillary monolith formulations containing only 0.5% photoinitiator would suffer from a direct transfer into COC devices. The formulations need to be readjusted so that the amount of photoinitiator is sufficient to ensure a covalent link between the COC wall and monolithic stationary phase.

As expected, increasing the amount of photoinitiator to 2% or more in the monolith formulation resulted in better separation efficiency (Fig. 3). Besides, a variation of BME amount from 2 to

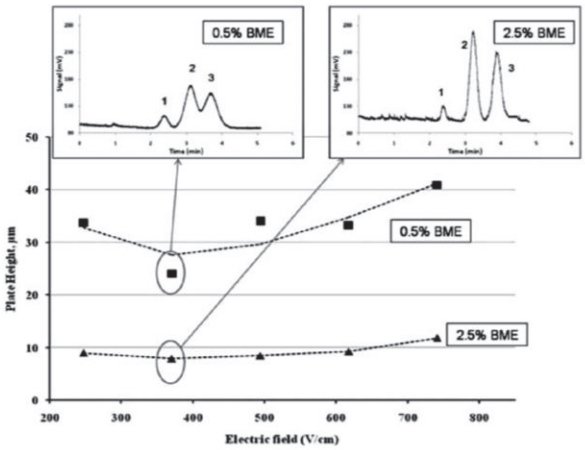


Fig. 3 Plate height of anthracene (peak #1) *versus* electric field on HA–BDDA monolith synthesized with different percentages of BME. Insets: separation of 3 polycyclic aromatic hydrocarbons (1, anthracene; 2, fluoranthene; 3, pyrene). Stationary phase HA–BDDA + 2.5% BME. Mobile phase 70/30 (v/v) ACN/water + 2 mM $NH_4H_2PO_4$ + 5 mM LiDS. Electric field 370 V cm^{-1}.

3% has no influence on plate heights (H_{min} = 8 μm), suggesting that the monolithic structure is not modified by an increasing anchoring process, as confirmed by the observation of SEM pictures.

All these results confirm the major role of BME in the anchoring of monolith on the inner wall of COC microchannels. Unlike stated in previous methods,[10–12,16,33] a single initiator can well be used to simultaneously functionalize COC walls and to synthesize an organic monolith inside COC microchannels.

Another important beneficial point is that since no intermediary molecules are being used to covalently link the monolith to the channel walls, a perfectly homogeneous monolithic structure is formed over the whole cross-section of the channel.

Prospective: testing the method with different materials

Surface modification *via* UV activation with BME and AIBN of different materials was explored. PEGMA was grafted as described (Section 4.1). Fig. 4 shows the change in surface polarity

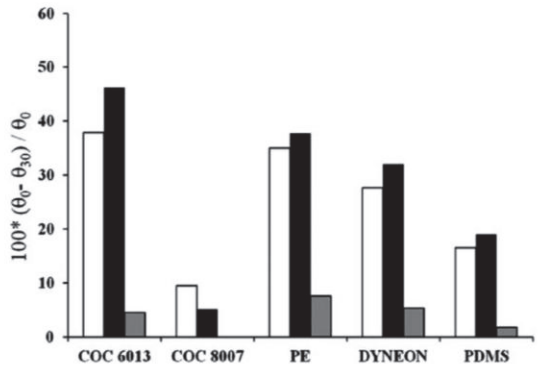


Fig. 4 Photografting of PEGMA on various materials. PEGMA 0.1 M. Irradiation 30 min (2.7 J cm^{-2}). BME (white bars) and AIBN (black bars) 2.5% (w/w of monomers). Grey bars represent the experiment with no initiator. *Y*-axis represents the surface polarity increase (θ_0 and θ_{30} are the contact angles before and after 30 min irradiation, respectively).

obtained by photografting PEGMA on polyethylene (PE), fluoropolymer (DYNEON) and polydimethylsiloxane (PDMS). The procedure did not change the polarity of glass surface showing that the absence of abstractable H inhibited the reaction. The extent of grafting was found to be in accordance with the number of protons available for abstraction on the treated surfaces. These experiments lead us to consider that the proposed process could be extended to generate anchored monoliths in a wide variety of miniaturized devices in one single step.

Conclusions

A facile "one-step" method for the simultaneous synthesis and anchoring of organic monolith inside COC microchip channels is described. Efficient HA–BDDA and GMA–EDMA monoliths were obtained and tested. It was demonstrated that type I photoinitiators such as AIBN and BME can play the very same role as type II photoinitiators and abstract hydrogen atoms from COC surfaces. This mechanism allows the use of a single initiator to functionalize the COC surfaces and to synthesize the organic monolith simultaneously. The only requirement is to have a polymerizing formulation containing a sufficient photoinitiator concentration. This approach opens a new and simple way that will help in the development of organic monolith as a stationary phase inside thermoplastic microchannels.

Acknowledgements

The present process is under French patent pending no. FR1156586. The authors wish to thank the French National Research Agency for funding project ANR-07-PCVI-003601. Laurent Malaquin and Velan Taniga, Laboratoire des Macromolécules et Microsystèmes en Biologie et Médecine (MMBM) Institut Curie, Paris, are gratefully acknowledged for providing pressure test chips.

Notes and references

1 A. Arora, G. Simone, G. B. Salieb-Beugelaar, J. T. Kim and A. Manz, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 4830–4847.
2 D. S. Peterson, *Lab Chip*, 2005, **5**, 132–139.
3 F. Svec, *J. Chromatogr., A*, 2010, **1217**, 902–924.
4 K. Faure, *Electrophoresis*, 2010, **31**, 2499–2511.
5 Y. Ladner, G. Crétier and K. Faure, *J. Chromatogr., A*, 2010, **1217**, 8001–8008.
6 K. Faure, M. Albert, V. Dugas, G. Crétier, R. Ferrigno, P. Morin and J.-L. Rocca, *Electrophoresis*, 2008, **29**, 4948–4955.
7 J. S. Mecomber, R. S. Murthy, S. Rajam, P. N. D. Singh, A. D. Gudmundsdottir and P. A. Limbach, *Langmuir*, 2008, **24**, 3645–3653.
8 B. Rånby, W. T. Yang and O. Tretinnikov, Nuclear Instruments and Methods, in *Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 1999, vol. 151, pp. 301–305.
9 W. Yang and B. Ranby, *Macromolecules*, 1996, **29**, 3308–3310.
10 T. Stachowiak, D. Mair, T. Holden, L. J. Lee, F. Svec and J. M. J. Fréchet, *J. Sep. Sci.*, 2007, **30**, 1088–1093.
11 T. Rohr, D. F. Ogletree, F. Svec and J. M. J. Frechet, *Adv. Funct. Mater.*, 2003, **13**, 264–270.
12 T. Stachowiak, T. Rohr, E. F. Hilder, D. Peterson, M. Yi, F. Svec and J. M. J. Fréchet, *Electrophoresis*, 2003, **24**, 3689–3693.
13 K. W. Ro, J. Liu and D. R. Knapp, *J. Chromatogr., A*, 2006, **1111**, 40–47.
14 J. A. Deverell, T. Rodemann, J. A. Smith, A. J. Canty and R. M. Guijt, *Sens. Actuators, B*, 2011, **155**, 388–396.
15 H. Zou, X. Huang, M. Ye and Q. Luo, *J. Chromatogr., A*, 2002, **954**, 5–32.
16 I. Nischang, I. Teasdale and O. Brüggemann, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, **400**, 2289–2304.
17 M. P. Barrioulet, N. Delaunay-Bertoncini, C. Demesmay and J. L. Rocca, *Electrophoresis*, 2005, **26**, 4104–4115.
18 A. Bruchet, V. Dugas, C. Mariet, F. Goutelard and J. Randon, *J. Sep. Sci.*, 2011, **34**, 2079–2087.
19 E. C. Peters, M. Petro, F. Svec and J. M. J. Fréchet, *Anal. Chem.*, 1997, **69**, 3646–3649.
20 C. Viklund, E. Pontén, B. Glad, K. Irgum, P. Hörstedt and F. Svec, *Chem. Mater.*, 1997, **9**, 463–471.
21 C. Viklund and K. Irgum, *Macromolecules*, 2000, **33**, 2539–2544.
22 D. Bandilla and C. D. Skinner, *J. Chromatogr., A*, 2003, **1004**, 167–179.
23 M. Bedair and R. D. Oleschuk, *Analyst*, 2006, **131**, 1316–1321.
24 F. D. Lewis, R. T. Lauterbach, H. G. Heine, W. Hartmann and H. Rudolph, *J. Am. Chem. Soc.*, 1975, **97**, 1519–1525.
25 C. Yu, M. Xu, F. Svec and J. M. J. Fréchet, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 2002, **40**, 755–769.
26 C. Yu, F. Svec and J. M. J. Fréchet, *Electrophoresis*, 2000, **21**, 120–127.
27 Y. Fintschenko, W.-Y. Choi, S. Ngola and T. Shepodd, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 2001, **371**, 174–181.
28 D. J. Throckmorton, T. J. Shepodd and A. K. Singh, *Anal. Chem.*, 2002, **74**, 784–789.
29 V. Augustin, A. Jardy, P. Gareil and M.-C. Hennion, *J. Chromatogr., A*, 2006, **1119**, 80–87.
30 G. Proczek, V. Augustin, S. Descroix and M.-C. Hennion, *Electrophoresis*, 2009, **30**, 515–524.
31 T. Ljubica, J. Ante and J. Zvonimir, *Croat. Chem. Acta*, 2009, **82**, 825–832.
32 A. Ledwith, *Pure Appl. Chem.*, 1977, **49**, 431–441.
33 C. Li, Y. Yang, H. G. Craighead and K. H. Lee, *Electrophoresis*, 2005, **26**, 1800–1806.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2012

III.3.2. Comparaison des performances du monolithe HA/BDDA en microsystème et capillaire

La mise au point d'un protocole d'ancrage du monolithe HA/BDDA sur les parois du COC via la BME a permis d'améliorer sensiblement les performances électrochromatographiques de la phase stationnaire. Cependant, ces efficacités restent bien inférieures à celle obtenues en capillaire comme l'illustre la **figure III.9A** qui compare les courbes de van Deemter de l'anthracène en capillaire et en microsystème.

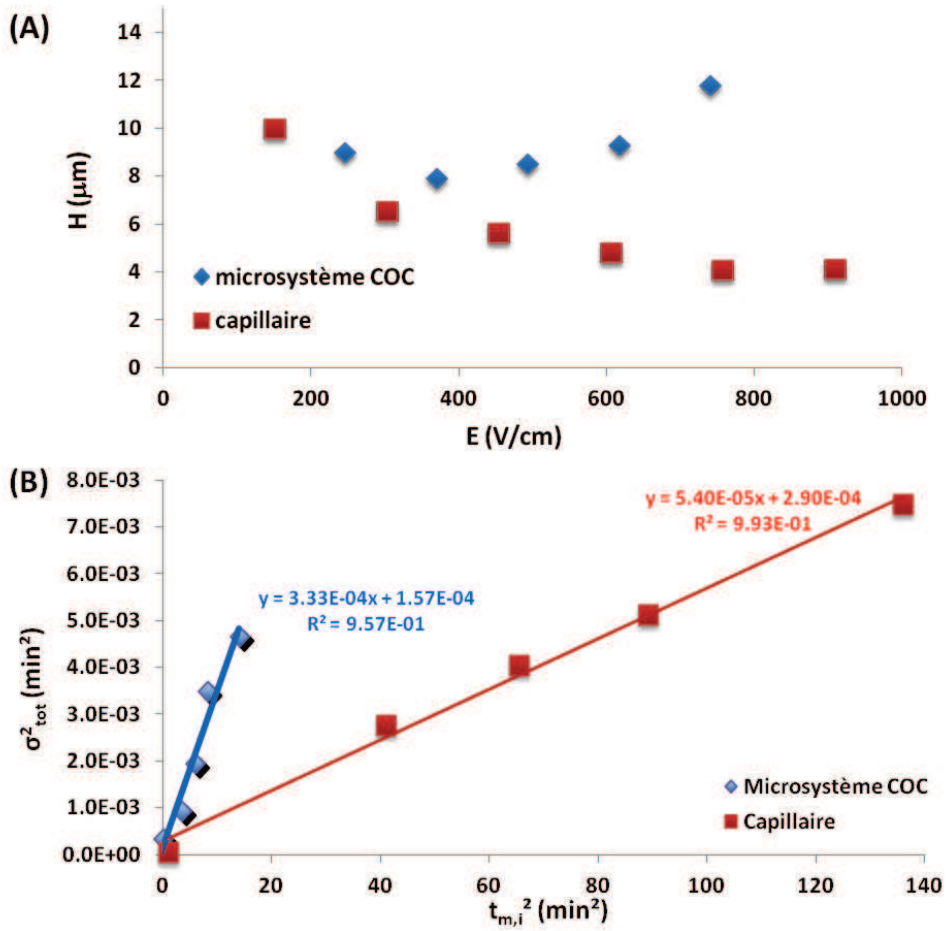


Figure III.9 : Comparaison des performances électrochromatographiques du monolithe HA/BDDA en capillaire et en microsystème. (A) Courbes de van Deemter de l'anthracène. (B) Evolution de la variance totale en temps en fonction du carré du temps de rétention pour différents solutés en capillaire et en microsystème. Phase mobile : ACN/eau 70/30 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$. Injection : 5 s à 125 V/cm. Longueur de séparation : 8.5 cm en capillaire et 3.5 cm en microsystème.

L'efficacité observée en microsystème (H = 8 µm) est deux fois moins importante que celle mesurée en capillaire (H = 4 µm). En microsystème, la hauteur équivalente à un plateau théorique semble aussi augmenter rapidement avec le champ électrique de séparation, donc avec la vitesse de la phase mobile. Pour savoir si cette différence de comportement est due à une différence de morphologie du monolithe qui induit une contribution de la résistance au transfert de masse plus importante ou bien

à une dispersion externe plus grande en microsystème, nous avons étudié l'évolution de la variance totale du pic $\sigma^2{}_{tot}$ (mesurée en unité de temps dans chacun des formats) en fonction du carré du temps de migration ${t_{m,i}}^2$ de différents solutés (**Figure III.9B**). Ces variations linéaires sont décrites par l'équation **III.1** issue de la combinaison des équations **I.14** et **I.18** :

$$\sigma^2{}_{tot} = \frac{{t_{m,i}}^2}{N_{sep}} + \sigma^2{}_{ext} \qquad \textbf{(III.1)}$$

où $\sigma^2{}_{ext}$ représente la variance de la dispersion externe en unité de temps et N_{sep} représente le nombre de plateaux théoriques générés par la colonne de séparation.

Les pentes et les ordonnées à l'origine des droites obtenues permettent de calculer la hauteur équivalente à un plateau théorique générée par le monolithe H et la variance de la dispersion externe exprimée en unité de volume $\sigma^2{}_{ext,v}$ pour chacun des formats (capillaire et microsystème) :

$$H = \frac{L}{N_{sep}} \qquad \textbf{(III.2)}$$

$$\sigma^2{}_{ext,v} = \sigma^2{}_{ext} \times D^2 \qquad \textbf{(III.3)}$$

où L est la longueur de séparation et D le débit de phase mobile. D est calculé à partir de l'espace de séparation S ($S = \frac{\pi}{4} d^2$ où d est le diamètre du capillaire ou $S = \pi a^2$ où a est le côté du canal en microsystème), de la porosité totale du monolithe ε_t (qui est estimée à 0.7 en capillaire et en microsystème), de la mobilité électroosmotique μ_{eo} (il a été vérifié dans le chapitre IV qu'elle est identique dans les deux formats) et du champ électrique E :

$$D = \mu_{eo}.E.S.\varepsilon_t \qquad \textbf{(III.4)}$$

L'application de ce traitement aux données de la figure III.9B montre que la dispersion externe $\sigma^2{}_{ext,v}$ est de 20 nL^2 pour les deux formats utilisés. En revanche, la hauteur équivalente à un plateau théorique générée par le monolithe est fonction du format : H = 4.5 µm en capillaire, H = 10 µm en microsystème. L'étude MEB n'a révélé aucune différence dans la taille des nodules et dans l'homogénéité de la phase stationnaire entre les deux formats. L'ensemble de ces résultats suggère donc qu'il existe une différence dans la distribution poreuse du monolithe HA/BDDA synthétisé en capillaire et celui synthétisé en microsystème. La synthèse de la phase stationnaire monolithique doit donc être optimisée en microsystème afin d'atteindre les performances séparatives obtenues en capillaire.

III.4. Conclusion

Le mécanisme minoritaire d'abstraction d'hydrogène des photoinitiateurs de type I (BME ou AIBN) a été mis à profit pour développer un protocole simple, rapide et robuste permettant de greffer des polymères de type PEGMA ou EDMA sur une surface en COC. Le protocole a ainsi été mis en œuvre sur différents matériaux polymériques capables de céder des atomes d'hydrogène (PE, Dynéon, PDMS). Une étude complémentaire (présenté en annexe 3) montre qu'il est utilisable pour greffer d'autres monomères hydrophiles tels que l'acide acrylique, le glycérol 1,3-diglycérolate diacrylate ou le 2-hydroxyéthyle acrylate. Dans l'annexe 4, ce processus de greffage par des photoiniiateurs de type I a aussi été comparé avec celui impliquant les photoinitiateurs de type II (tels que la benzophénone) qui sont classiquement utilisés dans la littérature pour la fonctionnalisation de surface.

Ces photoinitiateurs de type I permettent également la synthèse et l'ancrage d'un monolithe HA/BDDA dans un canal en COC en seulement une étape. L'ancrage du monolithe aux parois du microsystème conduit à des efficacités trois fois plus importantes par rapport à celles obtenues avec un monolithe non ancré. Cependant, ces efficacités qui sont de l'ordre de 130 000 plateaux/m restent inférieures à celle obtenues en capillaire (250 000 plateaux/m). Une optimisation de la synthèse du monolithe en microsystème doit donc être réalisée afin d'améliorer les performances séparatives du monolithe. Ceci est l'objet du chapitre 4.

III.4. Références bibliographiques

[1] Deverell, J. A., Rodemann, T., Smith, J. A., Canty, A. J., Guijt, R. M., *Sensor. Actuat. B-Chem.* 2010, *155*, 388-396.

[2] Ro, K. W., Liu, J., Knapp, D. R., *J. Chromatogr. A.* 2006, *1111*, 40-47.

[3] Rohr, T., Hilder, E. F., Donovan, J. J., Svec, F., Frechet, J. M. J., *Macromolecules* 2003, *36*, 1677-1684.

[4] Rohr, T., Ogletree, D. F., Svec, F., Frechet, J. M. J., *Adv. Funct. Mater.* 2003, *13*, 264-270.

[5] Stachowiak, T., Rohr, T., Hilder, E. F., Peterson, D.*, et al.*, *Electrophoresis* 2003, *24*, 3689-3693.

[6] Kaczmarek, H., Gałka, P., Kowalonek, J., *J. Poly. Sci.* 2010, *115*, 1598-1607.

[7] Hutchison, J., Ledwith, A., Photoinitiation of vinyl polymerization by aromatic carbonyl compounds, Springer Berlin, Heidelberg 1974, pp. 49-86.

[8] Dasmohapatra, G., Wolff, T., *J. Photoch. Photobio. A.* 1992, *69*, 209-211.

[9] Stachowiak, T., Mair, D., Holden, T., Lee, L. J.*, et al.*, *J. Sep. Sci.* 2007, *30*, 1088-1093.

[10] Hu, S., Ren, X., Bachman, M., Sims, C. E.*, et al.*, *Anal. Chem.* 2002, *74*, 4117-4123.

[11] Rånby, B., Yang, W. T., Tretinnikov, O., *Nucl. Instrum. Meth. B.* 1999, *151*, 301-305.

[12] Ulbricht, M., Matuschewski, H., Oechel, A., Hicke, H. G., *J. Menbrane. Sci.* 1996, *115*, 31-47.

[13] Tennico, Y. H., Koesdjojo, M. T., Kondo, S., Mandrell, D. T., Remcho, V. T., *Sensor. Actuat. B-Chem.* 2010, *143*, 799-804.

[14] Zhang, J., Das, C., Fan, Z. H., *Microfluid. Nanofluid.* 2008, *5*, 327-335.

[15] Kwok, D., Neumann, A., *Advances in Colloid and Interface Science* 1999, *81*, 167-249.

[16] Owens, D. K., Wendt, R., *J. Poly. Sci.* 1969, *13*, 1741-1747.

[17] Van Oss, C., Good, R., Chaudhury, M., *Langmuir* 1988, *4*, 884-891.

[18] Schneider, M. H., Tran, Y., Tabeling, P., *Langmuir* 2011, *27*, 1232-1240.

[19] Flook, K., Agroskin, Y., Pohl, C., *J. Sep. Sci.* 2011, 2047-2053.

[20] Pu, Q., Oyesanya, O., Thompson, B., Liu, S., Alvarez, J. C., *Langmuir* 2006, *23*, 1577-1583.

[21] Aydin, M., Arsu, N., *Prog. Org. Coat.* 2006, *56*, 338-342.

[22] Tasdelen, M. A., Kumbaraci, V., Talinli, N., Yagci, Y., *Polymer* 2006, *47*, 7611-7614.

[23] Norman S, A., *J. Photoch. Photobio. A.* 1996, *100*, 101-107.

Chapitre IV

Optimisation de la synthèse du monolithe acrylate en microsystème COC

Ce chapitre a fait l'objet :

- **d'une publication** : "Fabrication of acrylate monolith using photopolymérisation : effect of light intensity on electrochromatographic performance". Y. Ladner, G. Crétier K. Faure, Journal of Separation Science, 2012 *(DOI: 10.1002/jssc.201200165)*.

Contexte

Dans le chapitre III, nous avons mis en évidence le mécanisme d'abstraction d'hydrogène de la BME et son utilité pour la synthèse et l'ancrage en une seule étape d'un monolithe HA/BDDA dans les canaux en COC d'un microsystème. Ce protocole a permis un gain d'efficacité de 40 % par rapport à un monolithe non ancré. La synthèse de la phase stationnaire est robuste et permet d'atteindre pour les HAP des efficacités de 130 000 plateaux/m. Cependant, ces efficacités restent nettement inférieures à celles obtenues en capillaire qui sont de l'ordre de 250 000 plateaux/m. Une optimisation de la synthèse du monolithe directement en microsystème est donc nécessaire. Malgré le fait que l'augmentation d'un facteur 5 de la quantité de BME favorise l'ancrage du monolithe aux parois du microsystème et améliore les performances séparatives par rapport à un monolithe non ancré, l'augmentation de la concentration en BME peut aussi induire une variation de la vitesse de polymérisation R_p et du degré de conversion DC (équations **I.45** et **I.46)**, ce qui peut entraîner une variation de la structure et des performances séparatives du monolithe HA/BDDA. Un ajustement de la composition du mélange de polymérisation et des conditions opératoires doit donc être réalisé.

Dans ce chapitre, nous présentons d'abord dans la section IV.1 les détails techniques concernant les modes opératoires expérimentaux utilisés. Ensuite, dans la section IV.2, nous décrivons les tentatives d'ajustement des proportions du mélange réactionnel dans le but d'améliorer les performances électrochromatographiques du monolithe. Mais, face à l'absence de résultats significatifs, nous nous sommes orientés, dans la section IV.3 et au travers d'un manuscrit publié (article 3), vers l'optimisation des conditions d'irradiation afin de modifier sensiblement la structure du monolithe HA/BDDA et augmenter ses performances séparatives.

IV.1. Matériels et méthodes

Le protocole de synthèse du monolithe organique en microsystème COC, la caractérisation morphologique de la phase stationnaire par observation MEB et la mise en œuvre des différentes étapes en microsystème (injection, préconcentration, séparation et détection) ont été décrites dans la partie II.1. Cette partie « Matériels et Méthodes » est dédiée à la caractérisation du four UV utilisé pour la synthèse des monolithes organiques en microsystème et à la description de la méthode des courants permettant l'évaluation de la mobilité électroosmotique et par suite le calcul des facteurs de rétention en microsystème.

IV.1.1. Caractérisation du four UV

La photopolymérisation du monolithe HA/BDDA en microsystème est réalisée dans un four UV Biolink (VWR International, Strasbourg, France). Cet appareil est équipé de 5 lampes UV de 8 watts calibrées à 365 nm. Les parois internes du four sont recouvertes de miroirs permettant de réfléchir le rayonnement UV et d'irradier de façon homogène le microsystème.

L'intensité P et l'énergie W d'irradiation reçues par le microsystème sont mesurées à l'aide d'un radiomètre VLX-3W (Vilbert Lourmat, Eberhardzell, Allemagne). Ces paramètres peuvent être facilement modulés pour influer sur la polymérisation et donc sur la structure du monolithe (taille des nodules et des pores, homogénéité,...). L'énergie W et le temps t d'irradiation sont liés par l'équation **I.47**. A P constant, le temps d'irradiation t programmé dans le four UV avant chaque synthèse permet donc de définir l'énergie W reçue par le microsystème. W augmente proportionnellement à t (**Figure IV.1A**).

L'intensité P peut être modulée en faisant varier la distance d entre l'échantillon et la source UV d'après la loi des carrés inverses [1, 2]. En effet, P augmente lorsque la distance d diminue (Figure **IV.1B**). Enfin, il faut noter qu'à t constant, W augmente quand P augmente (**Figure IV.1A**).

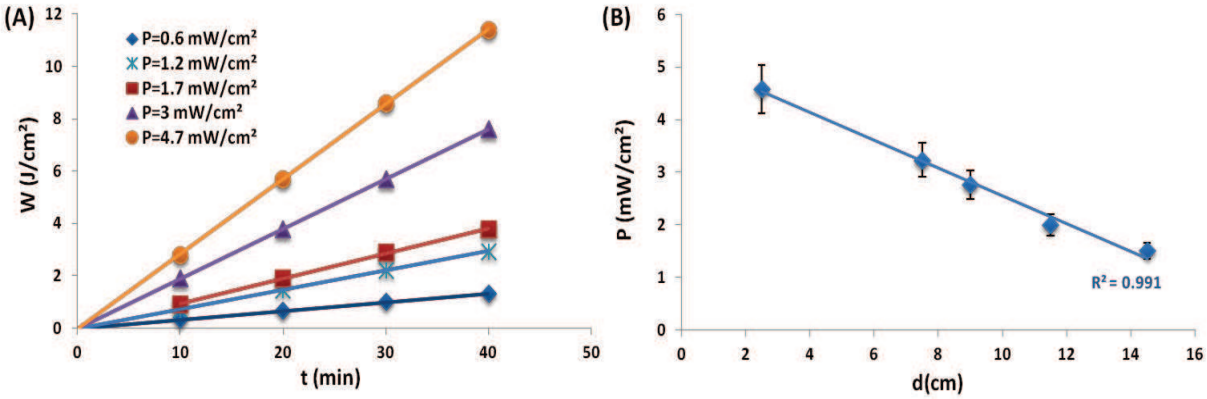


Figure IV.1 : Caractéristiques du four UV : (A) Variations de l'énergie W en fonction du temps d'irradiation t pour différentes intensités P et (B) Variation de l'intensité P en fonction de la distance entre l'échantillon et la source lumineuse.

Vingt monolithes HA/BDDA ont été synthétisés en microsystème pour différents temps, énergies et intensités d'irradiation. Une étude MEB est réalisée après chaque synthèse afin de caractériser la morphologie du monolithe obtenu en microsystème COC. Une caractérisation électrochromatographique du monolithe est également réalisée afin de déterminer H, k_i et μ_{eo} pour chaque monolithe synthétisé.

IV.1.2. Evaluation de la mobilité électroosmotique et de la rétention en microsystème

La mobilité électroosmotique est déterminée en microsystème par la méthode des courants [3, 4]. Cette méthode mesure la variation de courant obtenue quand les microcanaux sont balayés sous champ électrique avec une solution de force ionique différente de la phase mobile remplissant initialement les microcanaux. Cette variation de courant peut être ascendante (courbe B de la **figure IV.2**) si le courant devient plus important ou descendante (courbe A de la **figure IV.2**) si le courant devient moins important.

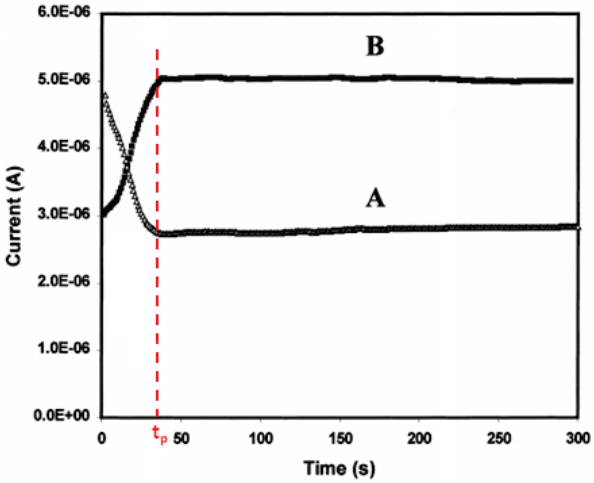


Figure IV.2 : Détermination de la mobilité électroosmotique par la méthode des courants [4].

En mode ascendant (courbe B), le canal de séparation contenant le monolithe est tout d'abord rempli par électroosmose avec une phase mobile ACN/eau 70/30 (%v) + 2 mM $NH_4H_2PO_4$ + 5 mM LiDS. Une solution de force ionique plus élevée (ACN/eau 70/30 (%v) + 5 mM $NH_4H_2PO_4$ + 5 mM LiDS) est ensuite introduite dans le réservoir d'injection. En appliquant un champ électrique de 617 V/cm, la solution du réservoir d'injection remplit progressivement le canal, ce qui entraîne une variation positive du courant qui est mesurée directement à l'aide du générateur. A contrario, en mode descendant, on intervertit le rôle des phases mobiles : le canal est préalablement rempli avec 5 mM $NH_4H_2PO_4$, puis rincé avec 2 mM $NH_4H_2PO_4$.

La mesure du temps t_p nécessaire à l'obtention d'un courant stable permet de calculer la mobilité électroosmotique μ_{eo} à partir du champ électrique appliqué E et de la longueur du canal L_{eff}. A partir de l'équation **I.4**, on a :

$$\mu_{eo} = \frac{L_{eff}}{t_p . E} \qquad \textbf{(IV.1)}$$

La mobilité électroosmotique et son coefficient de variation (CV) sont déterminés à partir de six mesures de t_p dont trois sont réalisées en mode ascendant et trois en mode descendant. Les coefficients de variation (CV) sont déterminés pour chaque mobilité électroosmotique.

Bien que la méthode des courants soit fiable et robuste, la mesure de la mobilité électroosmotique reste approximative. En effet, les forces ioniques utilisées peuvent avoir un effet sur la mobilité électroosmotique déterminée. Une augmentation de la force ionique de la phase mobile entraînant une diminution de la mobilité électroosmotique à cause du recouvrement de la double couche électrique [5, 6] (équations **I.2**, **I.3** et **I.5**), il est important de travailler avec des différences de force ionique très faibles. Cependant, la configuration actuelle du système utilisé ne nous permettait pas de détecter des faibles variations de courant et donc de travailler avec des différences de force ionique plus faibles.

La connaissance de la mobilité électroosmotique μ_{eo} permet de calculer la vitesse linéaire v_{eo} de la phase mobile et par suite le temps mort t_o (équation **I.4**). Le facteur de rétention k_i est ensuite déterminé à partir de t_o et $t_{m,i}$ (équation **I.11**).

IV.2. Optimisation de la composition du mélange de polymérisation

Le chapitre II a montré que l'ajustement de la proportion de chaque constituant du mélange à polymériser permet d'améliorer significativement les performances séparatives du monolithe obtenu. Dans le but d'améliorer les performances électrochromatographiques du monolithe HA/BDDA en microsystème et d'obtenir des efficacités comparables à celles obtenues en capillaire, une optimisation de la composition du mélange de polymérisation est donc réalisée dans une première partie. Le point de départ de cette étude est le mélange réactionnel décrit dans l'article 2. Les rapports massiques initiaux de monomères/porogènes, HA/BDDA et ACN/EtOH/tampon phosphate sont donc respectivement 34.5/65.5, 66.4/33.6 et à 54/23/23. La quantité d'AMPS est fixée à 0.5 % de la masse totale en monomères. La quantité de BME est fixée à 2.5 % de la masse totale en monomères, de manière à synthétiser et à ancrer le monolithe HA/BDDA dans le microcanal en COC en une seule étape (cf article 2). Seule l'influence des rapports massiques entre monomères et porogènes d'une part, monomères monofonctionnels (HA) et monomères bifonctionnels (BDDA) d'autre part, a été étudiée dans cette partie car ce sont les paramètres les plus influents sur les caractéristiques poreuses et sur les performances séparatives du monolithe obtenu [7-10], comme cela a été montré dans le chapitre II pour le monolithe LMA/EDMA.

Dans cette partie, les HAP ont été injectés pour évaluer les performances électrochromatographiques du monolithe synthétisé en microsystème. Les concentrations des HAP injectés pour toutes les expériences sont les suivantes : 120 µM pour l'anthracène, 0.33 µM pour le fluoranthène, 430 µM pour le pyrène, 0.33 µM pour le benzo-a-anthracène, 8.8 µM pour le benzo-a-pyrène et 4.4 µM pour le benzo-k-fluoranthène. Tous ces HAP sont solubilisés dans un mélange ACN/eau de composition identique à celle de la phase mobile utilisée.

IV.2.1 Influence du rapport massique monomères/porogènes

L'effet de la proportion en monomères dans le mélange de polymérisation a été étudié en priorité car c'est l'un des paramètres les plus influents sur la taille des pores, la taille des nodules et l'homogénéité de la structure monolithique [8]. L'objectif est l'obtention d'une structure monolithique homogène avec des nodules de petite taille (< 1 µm) permettant d'obtenir des efficacités de l'ordre de 250 000 plateaux/m (H = 5 µm). Pour cela, 4 mélanges de polymérisation ont été préparés en faisant varier la proportion massique en monomères de 30 % à 45 %. Les rapports massiques HA/BDDA et ACN/EtOH/tampon phosphate sont fixés respectivement à 66.4/33.6 et à 54/23/23. Les quantités d'AMPS et de BME sont fixées respectivement à 0.5 % et à 2.5 % de la masse totale en monomères. Chaque monolithe a été photopolymérisé pendant 10 minutes à 365 nm (W = 0.95 J/cm^2 à P = 1.7 mW/cm^2).

IV.2.1.1. Influence sur la structure monolithique

Le mélange contenant 30 % de monomères (% en poids par rapport à la masse totale) conduit à la formation d'une structure monolithique hétérogène présentant des tailles de nodules de 0.7 µm en moyenne (CV = 21 %) (**Figure IV.3**). Des zones vides sont observées entre le monolithe et la paroi du COC, ce qui suggère un faible ancrage. La présence d'une faible concentration en monomères dans la composition du mélange de polymérisation induit une faible incorporation des monomères à la surface des parois en COC activée par la BME, ce qui limite les réactions entre le polymère en croissance et les parois du microsystème.

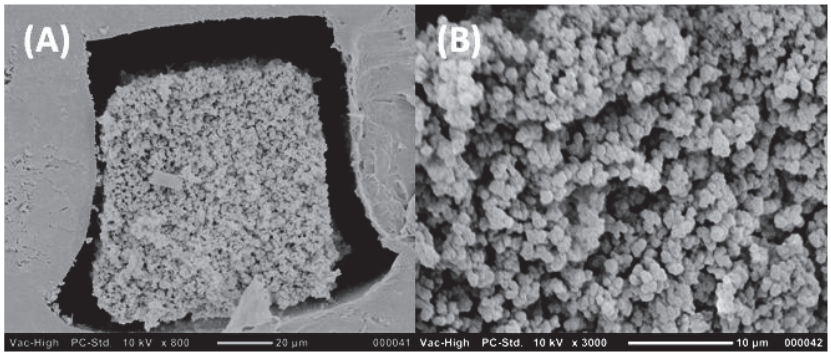


Figure IV.3 : Images MEB d'un monolithe HA/BDDA photopolymérisé pendant 10 minutes à partir d'un rapport massique monomères/porogènes de 30/70 (W = 0.95 J/cm^2 à P = 1.7 mW/cm^2). (A) vue d'ensemble et (B) zoom sur le monolithe. Grossissement ×800 et ×3000. Tension 10 kV.

L'augmentation de la proportion massique de monomères à 34.5 % en poids par rapport à la masse totale permet l'obtention d'une structure monolithique homogène présentant des nodules de tailles serrées autour de 0.85 µm (CV = 2.3 %) (**Figure IV.4**). Ce monolithe, décrit dans l'article 2, est parfaitement ancré aux parois du canal en COC via le mécanisme d'abstraction d'hydrogène de la BME.

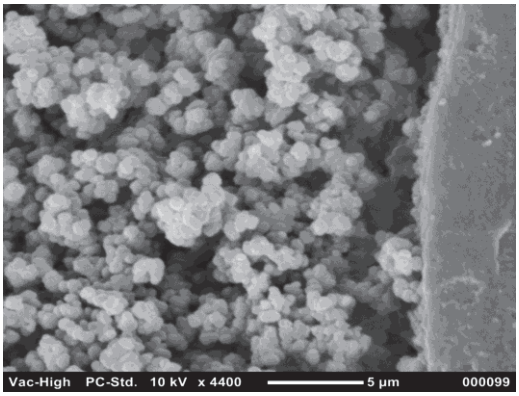


Figure IV.4 : Images MEB d'un monolithe HA/BDDA photopolymérisé pendant 10 minutes à partir d'un rapport massique monomères/porogènes de 34.5/65.5 (W = 0.95 J/cm^2 à P = 1.7 mW/cm^2). Grossissement ×800 et ×3000. Tension 10 kV.

Avec 40 % de monomères, le monolithe obtenu a une structure homogène bien ancrée aux parois du microsystème (**figure IV.5**). Cependant, les nodules sont plus gros (1 µm, CV = 1.9 %), ce qui est dû à une augmentation de la concentration locale en monomères autour des nucléi durant la photopolymérisation.

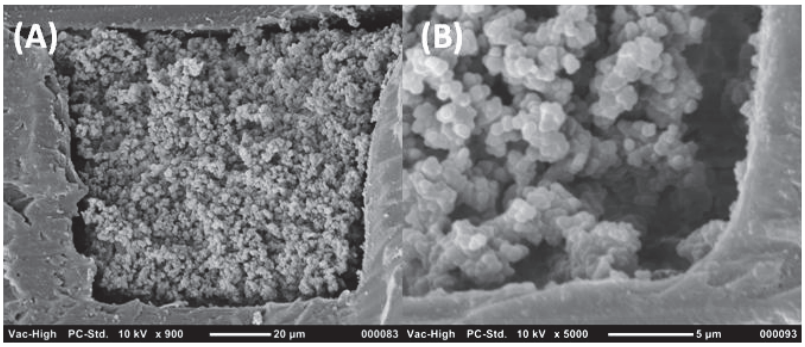


Figure IV.5 : Images MEB d'un monolithe HA/BDDA photopolymérisé pendant 10 minutes à partir d'un rapport massique monomères/porogènes de 40/60 (W = 0.95 J/cm^2 à P = 1.7 mW/cm^2). (A) vue d'ensemble et (B) vue sur les parois du COC. Grossissement ×1000 et ×5000. Tension 10 kV.

Pour une teneur plus importante en monomères (45 % en poids par rapport à la masse totale), les microsystèmes préparés sont totalement remplis par une structure hétérogène compacte ancrée sur les parois en COC (**Figure IV.6**). L'apparition d'un effet écran du fait de la forte absorption des monomères HA et BDDA à 365 nm peut expliquer l'hétérogénéité de la structure. Le rinçage par électroosmose du monolithe après photopolymérisation et la réalisation de séparations électrochromatographiques sont très difficiles car vraisemblablement le monolithe contient des pores de petite taille qui génèrent un faible flux électroosmotique en raison d'un recouvrement de la double couche électrique [11].

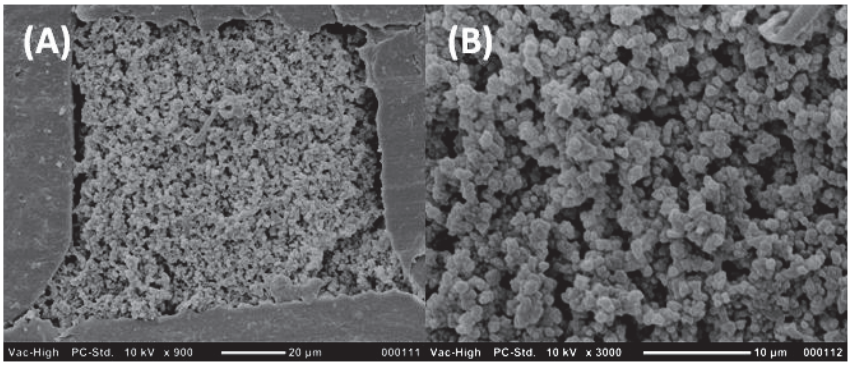


Figure IV.6 : Images MEB d'un monolithe HA/BDDA photopolymérisé pendant 10 minutes à partir d'un rapport massique monomères/porogènes de 45/55 (W = 0.95 J/cm^2 à P = 1.7 mW/cm^2). (A) vue d'ensemble et (B) zoom sur le monolithe. Grossissement ×900 et ×3000. Tension 10 kV.

L'étude MEB résumée dans le **tableau IV.1** montre que la variation du pourcentage massique de monomères de 30 à 45 % conduit à une augmentation de la taille des nodules de 0.6 µm à 1.2 µm. Cette augmentation de la taille des nodules est engendrée par une augmentation de la concentration locale en monomères autour des nucléi durant la photopolymérisation. L'homogénéité de la structure de la phase stationnaire et son ancrage sur les parois dépendent également de la proportion en monomères.

Tableau IV.1 : Influence du rapport massique HA/BDDA sur la structure du monolithe HA/BDDA en microsystème

rapport massique monomères/ porogènes	Distribution en taille	Taille nodules	Ancrage monolithe sur les parois du COC
30/70	hétérogène	0.7 µm (CV = 21 %)	faible
34.5/65.5	très homogène	0.85 µm (CV = 2.3 %)	bon
40/60	homogène	1 µm (CV = 1.9 %)	bon
45/55	hétérogène + dense	1.1 µm (CV = 13 %)	bon

A la vue de ces résultats, le mélange de polymérisation contenant 34.5 % de monomères semble donner la meilleure structure monolithique pour une photopolymérisation de 10 minutes (W = 0.95 J/cm^2 à P = 1.7 mW/cm^2).

IV.2.1.2. influence sur les performances séparatives du monolithe

L'évolution des performances électrochromatographiques en fonction du rapport massique monomères/porogènes a été observée en déterminant H, k_i et μ_{eo} pour chaque monolithe utilisé dans les mêmes conditions de phase mobile : ACN/eau 70/30 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$. La **figure IV.7** représente les courbes de van Deemter de l'anthracène obtenues pour les différents monolithes préparés avec différents pourcentages massiques de monomères. Les résultats obtenus montrent une diminution de H quand le pourcentage de monomères passe de 30 à 34.5 %, puis une augmentation de H entre 34.5 et 40 %.

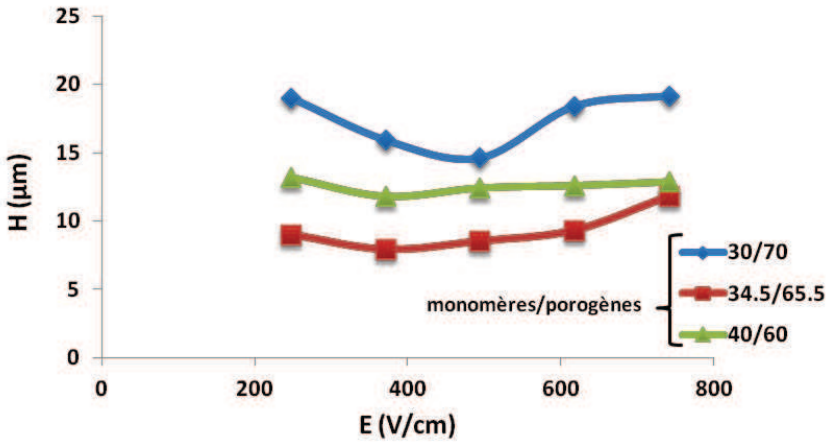


Figure IV.7 : Courbes de van Deemter de l'anthracène pour différents pourcentages massiques monomères/porogènes. Phase mobile : ACN/eau 70/30 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$. Injection : 5 s à 125 V/cm. Longueur de séparation : 3.5 cm. Soluté : anthracène à 120 µM.

La combinaison des analyses MEB et des résultats électrochromatographiques permet d'établir une corrélation entre pourcentage massique de monomères, structure monolithique et performances électrochromatographiques (**Tableau IV.2**).

Tableau IV.2 : Corrélation entre pourcentage massique de monomères, structure monolithique et performances électrochromatographiques.

Pourcentage en monomères (%)	Taille des nodules (µm)	μ_{eo} ($\times 10^{-4}$ $cm^2.V^{-1}.s^{-1}$)	$k_{anthracène}$	$H_{anthracène}$ (µm) à la vitesse optimale
30	0.7 µm (CV = 20 %)	2.8	4.5	14
34.5	0.85 µm (CV = 2.3 %)	1.9	5.3	8
40	1 µm (CV = 1.5 %)	1.8	5.3	12
45	1.1 µm (CV = 13 %)	/	/	/

Une diminution de 30 % de la mobilité électroosmotique est observée lorsque le pourcentage massique de monomères augmente de 30 à 34.5 %. Ceci peut s'expliquer par l'amélioration de l'ancrage du monolithe aux parois du microsystème et la suppression des zones vides entre la paroi et le monolithe qui sont des chemins préférentiels pour la phase mobile. La mobilité électroosmotique reste constante et égale à 1.8×10^{-4} $cm^2.V^{-1}.s^{-1}$ quand le pourcentage de monomères varie de 34.5 à 40 %. Ceci suggère que l'incorporation de l'AMPS dans la structure du monolithe HA/BDDA est indépendante de la concentration en HA et en BDDA. Pour une teneur plus importante en monomères (45 % en poids par rapport à la masse totale), la mobilité électroosmotique est très faible en raison d'un recouvrement de la double couche électrique apparaissant pour des structures très denses (pores de petites tailles).

Le facteur de rétention de l'anthracène augmente quand le pourcentage massique de monomères passe de 30 à 34.5 %. La disparition des chemins préférentiels due à un meilleur ancrage du monolithe sur les parois, contribue à augmenter le volume de phase stationnaire rencontré par le soluté et par suite le facteur de rétention du soluté. Cependant, $k_{anthracène}$ ne varie plus lorsque le pourcentage massique de monomères passe de 34.5 à 40 %. La rétention étant un indicateur de l'incorporation des chaines alkyles dans le monolithe, ces résultats indiquent qu'une même quantité de monomères réagit avec les radicaux quelle que soit la concentration initiale en monomères. La concentration en monomères n'est donc pas le facteur limitant dans la polymérisation du monolithe HA/BDDA.

Enfin, l'augmentation de la proportion massique de monomères de 30 à 34.5 % se traduit par une augmentation de la taille des nodules, de 0.7 à 0.85 µm, et par une augmentation de 40 % de l'efficacité mesurée sur l'anthracène (H passe de 14 à 8 µm). L'absence d'ancrage du monolithe à 30 % de monomères (% en poids par rapport à la masse totale) et la présence de chemins préférentiels le long des parois entraînent l'apparition d'un profil de vitesse non uniforme, ce qui induit une dispersion importante des solutés. Pour des teneurs plus importantes en monomères (40 % en poids par rapport à la masse totale), la taille des nodules augmente de 0.85 à 1.1 µm, ce qui entraîne une perte d'efficacité de 50 %. Comme à 34.5 et 40 % en monomères, le monolithe est ancré aux parois, les différences d'efficacité observées sont directement reliées aux différences de taille des nodules, comme cela a déjà été observé dans l'article 1.

A la vue de ces résultats, le mélange de polymérisation contenant 34.5 % de monomères semble donner la meilleure structure monolithique et les meilleures performances séparatives pour une photopolymérisation de 10 minutes (W = 0.95 J/cm^2 à P = 1.7 mW/cm^2).

IV.2.2. Influence du rapport massique HA/BDDA

Comme l'a montré l'étude sur le monolithe LMA/EDMA (cf chapitre II), le processus de formation des pores et la taille des nodules dans un monolithe sont contrôlés par la composition du mélange de monomères. Une concentration élevée en agent réticulant dans le mélange précurseur conduit à la formation de nuclei réticulés insolubles qui précipitent à un stade précoce de la polymérisation et entraînent la formation d'un grand nombre de nodules de petite taille. Pour étudier l'influence du rapport massique HA/BDDA sur la structure du monolithe et ses performances séparatives, trois mélanges de polymérisation ont été préparés en faisant varier la proportion en monomère monofonctionnel (HA) entre 61 % et 70 %. Les rapports massiques monomères/porogènes et ACN/EtOH/tampon phosphate sont fixés respectivement à 34.5/65.5 et à 54/23/23. Les quantités d'AMPS et de BME sont fixées respectivement à 0.5 % et à 2.5 % de la masse totale en monomères. Chaque monolithe a été photopolymérisé pendant 10 minutes à 365 nm (W = 0.95 J/cm^2 à P = 1.7 mW/cm^2).

IV.2.2.1. Influence sur la structure monolithique

Un monolithe photopolymérisé avec 61 % de HA (% en poids par rapport à la masse totale de monomères) conduit à la formation d'une structure homogène ancrée aux parois du canal et présentant des tailles de nodules de 1 µm (CV = 2.1 %) (**Figure IV.8**).

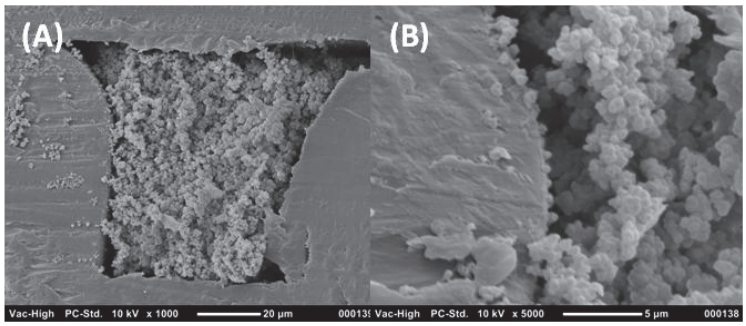


Figure IV.8 : Images MEB d'un monolithe HA/BDDA photopolymérisé pendant 10 minutes à partir d'un rapport massique HA/BDDA de 61/39 (W = 0.95 J/cm^2 à P = 1.7 mW/cm^2). (A) vue d'ensemble et (B) vue sur les parois du COC. Grossissement ×1000 et ×5000. Tension 10 kV.

Quand le pourcentage massique de HA passe à 66.4 %, la structure du monolithe reste homogène et la taille des nodules diminue (0.85 µm, CV = 2.3 %) (**Figure IV.4**). Ce monolithe, montré dans l'article 2, est parfaitement ancré aux parois du canal en COC.

Enfin, comme pour les précédentes compositions, l'utilisation de 70 % de HA entraîne la formation d'une structure monolithique très homogène (**Figure IV.9**). Cependant, la taille des nodules augmente à 1 µm (CV = 1.8 %), suite vraisemblablement à une augmentation de la concentration locale en monomères autour des nucléi. L'ancrage du monolithe aux parois du canal en COC est aussi satisfaisant.

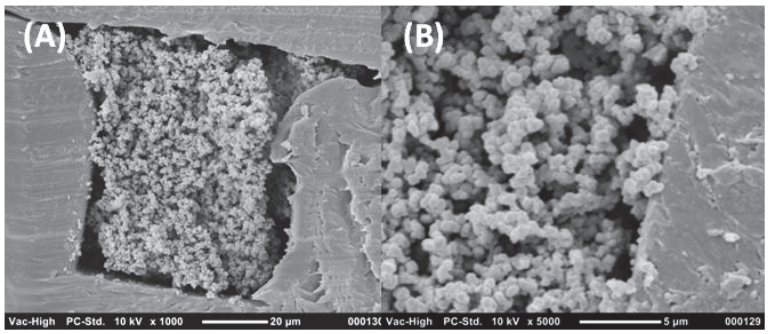


Figure IV.9 : Images MEB d'un monolithe HA/BDDA photopolymérisé pendant 10 minutes à partir d'un rapport massique HA/BDDA de 70/30 (W = 0.95 J/cm^2 à P = 1.7 mW/cm^2). (A) vue d'ensemble et (B) vue sur les parois du COC. Grossissement ×1000 et ×5000. Tension 10 kV.

Pour résumer, la taille des nodules dépend de la proportion en HA (**Tableau IV.3**). Néanmoins, la variation du rapport massique HA/BDDA influence peu la structure du monolithe. A la vue de ces résultats, le mélange de polymérisation contenant 66.4 % de HA semble donner la meilleure

structure monolithique pour une photopolymérisation de 10 minutes (W = 0.95 J/cm^2 à P = 1.7 mW/cm^2).

Tableau IV.3 : Influence du rapport massique monomères/porogènes sur la structure du monolithe HA/BDDA

rapport massique HA/BDDA	Structure monolithique	Taille nodules	Ancrage monolithe sur les parois du COC
61/39	homogène	1 µm (CV = 2.1 %)	Très bon
66.4/33.6	homogène	0.85 µm (CV = 2.3 %)	Très bon
70/30	homogène	1 µm (CV = 1.8 %)	Très bon

IV.2.2.2. Influence sur les performances séparatives du monolithe

L'évolution des performances électrochromatographiques en fonction du rapport massique HA/BDDA a été étudiée en déterminant H, k_i et μ_{eo} pour chaque monolithe utilisé avec la même phase mobile : ACN/eau 70/30 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$. La **figure IV.10** montre les courbes de van Deemter de l'anthracène obtenues pour les différents monolithes préparés avec les différents pourcentages massiques en HA. Les résultats obtenus montrent que la proportion en HA de 66.4 % est optimale. H passe de 8 à 11 µm quand le pourcentage de HA passe de 66.4 à 61 %. H passe de 8 à 12 µm quand le pourcentage de HA passe de 66.4 à 70 %.

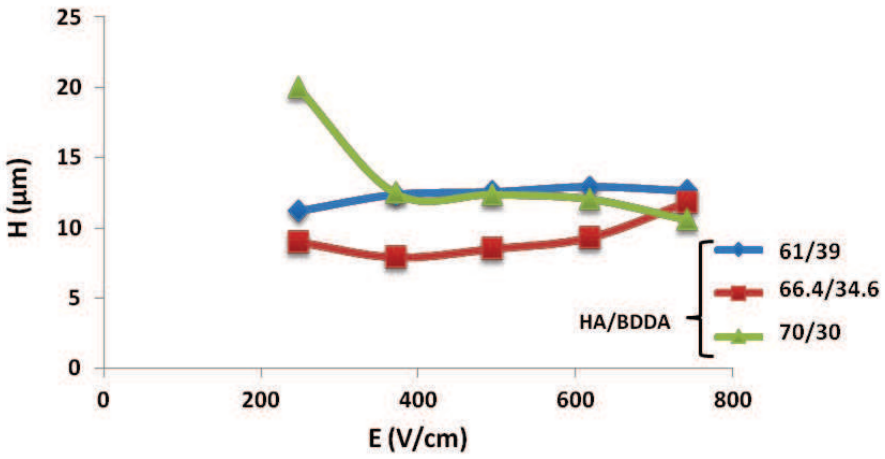


Figure IV.10 : Courbes de van Deemter de l'anthracène pour différents pourcentages massiques HA/BDDA. Phase mobile : ACN/eau 70/30 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$. Injection : 5 s à 125 V/cm. Longueur de séparation : 3.5 cm. Soluté : anthracène à 120 µM.

Le **tableau IV.4** rassemble les conclusions déduites des images MEB et les résultats de l'étude électrochromatographique.

Tableau IV.4 : Corrélation entre pourcentage massique de monomères, structure monolithique et performances électrochromatographiques.

Pourcentage en HA (%)	Taille des nodules (µm)	μ_{eo} ($\times 10^{-4}$ $cm^2.V^{-1}.s^{-1}$)	$k_{anthracène}$	$H_{anthracène}$ (µm) à la vitesse optimale
61	1 µm (CV = 2.1 %)	2.2	4.5	11
66.4	0.85 µm (CV = 2.3 %)	1.9	5.3	8
70	1 µm (CV = 1.8 %)	1.8	5.8	12

La variation de l'efficacité est directement reliée à la différence de taille des nodules comme cela a déjà été observé dans l'article 1. L'augmentation de la proportion massique de HA de 61 à 66.4 % se traduit par une diminution de la taille des nodules de 1 à 0.85 µm et par une augmentation de 30 % de l'efficacité pour l'anthracène (H passe de 11 à 8 µm). De plus, l'augmentation de la proportion massique de HA de 66.4 à 70 % se traduit par une augmentation de la taille des nodules de 0.85 à 1 µm et par une diminution de 35 % de l'efficacité pour l'anthracène (H passe de 8 à 12 µm).

Une diminution de 14 % de la mobilité électroosmotique est observée lorsque le pourcentage massique de HA augmente de 61 à 66.4 %. Pour des proportions plus élevées en HA (70 %), la mobilité électroosmotique évolue peu. L'incorporation de l'AMPS dans la structure du monolithe HA/BDDA semble être une fonction complexe de la concentration en HA et en BDDA.

Le facteur de rétention de l'anthracène augmente de 4.5 à 5.8 quand le pourcentage massique de HA passe de 61 à 70 %. Le changement de proportion en HA et en BDDA entraîne une modification de la solubilité du polymère en croissance dans le milieu et l'incorporation des chaînes alkyles issues du monomère monofonctionnel HA devient plus importante, d'où une augmentation de la rétention.

Pour résumer, l'optimisation en microsystème de la composition du mélange de polymérisation pour la synthèse du monolithe HA/BDDA n'a pas permis l'amélioration des performances électrochromatographiques. Le monolithe décrit dans l'article 2 semble le plus performant. Avec cette composition (monomères/porogènes = 34.5/65.5; HA/BDDA = 66.4/34.6; ACN/EtOH/tampon phosphate = 54/23/23; BME = 2.5 %; AMPS = 0.5 %), nous allons étudier l'influence des conditions d'irradiation. En effet, l'intensité d'irradiation P peut avoir une influence sur la vitesse de polymérisation R_p et sur le degré de conversion DC (équations **I.45** et **I.46**). Comme R_p et DC déterminent la structure du monolithe, les paramètres d'irradiation peuvent avoir un impact sur la taille des nodules et des pores, sur l'homogénéité de la phase stationnaire et par conséquent sur les performances séparatives du monolithe HA/BDDA.

IV.3. Optimisation des conditions d'irradiation

Cette section est présentée sous forme d'une publication qui décrit l'optimisation des conditions d'irradiation UV afin d'améliorer les performances séparatives du monolithe HA/BDDA synthétisé dans le microsystème en COC. L'influence du temps d'irradiation t (de l'énergie W à intensité P

constante) sur la morphologie d'un monolithe et sur ses performances séparatives a été largement étudiée [6, 12-14]. Par contre, le rôle joué par l'intensité P n'a jamais fait l'objet d'une étude approfondie et c'est l'objectif de cette partie. `

La composition du mélange de polymérisation est celle décrite dans l'article 2. Le travail expérimental s'est tout d'abord orienté sur l'étude de l'influence de l'intensité P, de l'énergie W et du temps t d'irradiation sur la morphologie du monolithe et sur les efficacités obtenues pour le fluoranthène avec une phase mobile ACN/eau 70/30 (%v) + 2 mM $NH_4H_2PO_4$ + 5 mM LiDS. Pour réaliser cette étude, 20 synthèses de monolithe ont été réalisées sous différentes conditions d'irradiation (t, P et W). Les résultats semblent montrer que l'intensité P est le paramètre prépondérant dans la synthèse du monolithe HA/BDDA.

Ensuite, l'étude s'est centrée exclusivement sur l'influence de P sur les performances séparatives de la phase stationnaire monolithique. L'observation des courbes de van Deemter obtenues pour le fluoranthène à différentes intensités mais pour une énergie W constante de 1.9 J/cm^2 a permis, en parallèle d'une étude MEB, de corréler la morphologie du monolithe aux performances séparatives obtenues. Une intensité optimale de 4.7 mW/cm² a été mise en évidence : elle permet d'obtenir des efficacités de l'ordre de 250 000 plateaux/m. De plus, l'étude de l'influence de W sur les performances séparatives à cette intensité optimale a permis d'évaluer l'incorporation des monomères dans la structure du monolithe durant la photopolymérisation.

Enfin, une séparation de 6 HAP sur ce monolithe HA/BDDA optimisé a été réalisée afin d'évaluer les efficacités sur une large gamme de rétention et de taille de solutés. Cette séparation électrochromatographique a permis de mettre en évidence la rapidité, la robustesse de la synthèse et les performances séparatives de cette phase stationnaire obtenue dans ces conditions d'irradiation optimales.

IV.3.1. Article 3 : Fabrication of acrylate monolith using photopolymerization : Effect of light intensity on electrochromatographic performance

Yoann Ladner
Gérard Crétier
Karine Faure

Université de Lyon, Institut des Sciences Analytiques (UMR 5280 Université Lyon 1 / CNRS), Domaine scientifique de La Doua, Villeurbanne Cedex, France

Received February 15, 2012
Revised April 16, 2012
Accepted April 16, 2012

Research Article

Fabrication of acrylate monolith using photopolymerization: Effect of light intensity on electrochromatographic performance

A hexyl acrylate monolith was prepared via photopolymerization into a cyclic olefin copolymer micro-device for reversed-phase electrochromatography purposes. This work deals with the influence of the irradiation conditions (irradiation time and light intensity) used during synthesis on the electrochromatographic performances of the monolithic column obtained. Up to day, the monolith structure was often controlled by means of irradiation time at constant light intensity, but the effect of light intensity (irradiance) on the monolith structure was scarcely considered. This study shows a strong effect of light intensity on electrochromatographic efficiency. Using an optimal light intensity of 4.7 mW/cm^2 and an irradiation time of a few minutes allows obtaining heights equivalent to a theoretical plate reaching down to 5 μm for the reversed-phase separation of six polycyclic aromatic hydrocarbons.

Keywords: Acrylate monolith / Cyclic olefin copolymer / Electrochromatography / Light intensity / Photopolymerization
DOI 10.1002/jssc.201200165

1 Introduction

Monolithic columns have been intensively developed since the 1990s for different applications [1]. Acrylate- or methacrylate-based monoliths are among the most popular materials used as stationary phase for liquid chromatography and electrochromatography in capillary format and microchip. These porous solids are usually prepared via free-radical polymerization of a mixture consisting of one or more functional monomers in the presence of a binary porogenic solvent. This polymerization process can be initiated thermally or by UV irradiation via the addition of an initiator in the mixture [2]. The main advantages of photopolymerization are the fast and easy preparation of the porous materials and the possibility to localize the monolith inside the separation area [3, 4].

The photopolymerization process is described by the degree of conversion DC versus time t according to equation [5]:

$$DC = 1 - \exp[-k_p t (P\Phi_i \varepsilon_i C_i / k_t)^{1/2}] \quad (1)$$

This expression shows that the reaction kinetics depends on: (i) the nature of monomers and porogens (through the rate-constants of chain propagation k_p and termination k_t), (ii) the nature of the photoinitiator (through the quantum yield for initiation Φ_i and the molar extinction coefficient ε_i at the wavelength of absorbed radiation) and its concentration C_i, (iii) the irradiation conditions (through the wavelength of light source, the power received per unit area P (also named light intensity or irradiance), and the irradiation time t). Light intensity is function of the power of light source and varies with the distance between light source and polymerization surface according to the inverse square law [6, 7]. The energy W reaching the surface per unit area is given by the following relationship:

$$W = Pt \quad (2)$$

Numerous studies were performed, often in capillary format and more scarcely in microchip, to understand the influence of monomer mixture [8–10], porogen composition [11–13] and photoinitiator concentration [14] on the monolith structure and its chromatographic performances. On the other hand, the influence of irradiation conditions has never completely studied. Irradiation time or energy received per unit area at constant light intensity was extensively used as parameters to control the morphology of monolith in capillary and microchip [15–18]. Optimal energy is generally defined as the energy corresponding to the minimal irradiation time necessary to obtain the monolithic structure without reaching the degradation of monolith under UV irradiation. A too low energy involves a monolith with small nodule size because the polymerization process is stopped during the growth phase [17]. At the contrary, a too high energy can destroy the monolith, as demonstrated by the fact that a detection window in capillary is usually obtained when the monolith is exposed to the UV detection lamp during several hours [15]. The effect of light intensity at constant irradiation time was just

Correspondence: Dr. Karine Faure, Université de Lyon, Institut des Sciences Analytiques (UMR 5280 Université Lyon 1 / CNRS), Domaine scientifique de La Doua, 43 boulevard du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France
E-mail: karine.faure@univ-lyon1.fr
Fax: +33472448319

© 2012 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

mentioned in capillary [19], but never used in microchip to optimize monolith morphology.

The topic of this paper is the complete study of the impact of irradiation conditions on the electrochromatographic performances of a hexyl acrylate monolith anchored to the inner walls of a cyclic olefin copolymer (COC) microfluidic device in one step [20]. Light intensity and irradiation time were simultaneously varied in order to obtain the largest efficiency.

2 Materials and methods

Hexyl acrylate (HA), 1,3-butanediol diacrylate (BDDA), 2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid (AMPS), and benzoin methyl ether (BME) were obtained from Acros Organics (Noisy-Le-Grand, France). Ammonium phosphate ($NH_4H_2PO_4$), various polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) (anthracene, fluoranthene, pyrene, benzo-*a*-anthracene, benzo-*a*-pyrene, and benzo-*k*-fluoranthene), and lithium dodecyl sulfate (LiDS) were from Sigma-Aldrich (Isle-d'Abeau, France). Acetonitrile and ethanol were HPLC-grade from SDS (Peypin, France).

Cyclic olefin copolymer microchips (Topas® 6013) were fabricated by Microfluidic Chipshop GmbH (Jena, Germany). Microfluidic chips for electrochromatographic separation exhibit only one 81 mm long, 75 μm deep, and 75 μm wide channel.

The monolith based on HA-BDDA monomers was previously used to separate neutral compounds by electrochromatography in COC microchip [20]. The porogenic mixture was made up of 54% of ACN, 23% of ethanol, and 23% of water (w/w). Porogenic mixture was dissolved in monomer mixture containing 66.4% (w/w) of HA and 33.6% (w/w) of BDDA. The ratio of monomer to porogenic mixtures was 34.5:65.5 (w/w). AMPS (0.5%, w/w of monomers) is added in the polymerization mixture in order to support the electroosmotic flow. The photoinitiator concentration of BME is fixed at 2.5% (w/w of monomers) to allow the simultaneous synthesis and anchoring of organic monolith inside COC microchip channel in one step. The polymerization mixture was introduced in the microchannel by pressure using a syringe. The microchip was submitted to a subsequent irradiation at 365 nm. The illumination system used to perform UV irradiation for light intensity varying from 0.3 to 4.7 mW/cm^2 was a Bio-link cross-linker (VWR International, Strasbourg, France) equipped with five 8 W UV tubes. Light intensity was adjusted between 0.3 and 1.7 mW/cm^2 by placing the micro-device at 15 cm from the light source and varying the number of UV tubes from 2 to 5. For light intensity of 3.0 and 4.7 mW/cm^2, the micro-device was placed at 11 and 2.5 cm from the five UV tubes, respectively. A Hamamatsu system (Massy, France) was used to initiate the polymerization at 365 nm with a light intensity of 8.4 mW/cm^2. Energy and light intensity were controlled with an UV radiometer (Vilbert Lourmat, Germany). Channels filled with HA-BDDA monolith were then rinsed with ACN/water 70:30 (v/v) + 2 mM $NH_4H_2PO_4$ + 5 mM LiDS for 30 min by applying an electric field of 617 V/cm to remove any remaining reactant. A JEOL JSM 6700F scanning electron microscope (SEM) (Tokyo, Japan) was used for observations of the homogeneity of monolith structure and estimations of nodule size.

Microchip analyses were monitored by inverted fluorescence microscopic system (IX-71, Olympus, France) equipped with a 100 W mercury lamp and 330 nm excitation filter (collection above 400 nm) (XF02-2, Omega, USA) for the detection of fluorescent PAH. A CCD camera was combined with NI Vision software (Alliance Vision, France) for detection processing. High-power supply (Micralyne, Canada) was used to apply electric field to the microchannel through platinum electrodes placed in the reservoirs. Sample injection in the separation channel was realized by using the simple direct injection mode introduced in a previous publication [18]. Briefly, a droplet of 2 μL of sample is placed in the inlet reservoir. An electric field of 124 V/cm is applied for 1 s to introduce the solutes in the channel. The inlet reservoir is then fully washed with the mobile phase and finally the separation electric field is applied. All system operations were performed with Labview 7.1 (National Instrument, Austin, TX, USA).

Injections of fluoranthene were realized to characterize the electrochromatographic performances of the monolith obtained for each condition of synthesis. Separation field strength was varied from 250 V/cm to 740 V/cm in order to obtain the van Deemter curves and to determine the plate height H_{min} at optimal velocity. The mobile phase used is 85:15 (v/v) ACN/water + 2 mM $NH_4H_2PO_4$ + 5 mM LiDS. The effective separation length is 3 cm. Solute concentration is 33.3 μM for fluoranthene.

The electroosmotic mobility (μ_{eo}) in the microchannel was determined using the current monitoring method [21]. Briefly, the channel is first filled with a mobile phase ACN/water 70:30 (v/v) + 2 mM $NH_4H_2PO_4$ + 5 mM LiDS by electroosmosis. The injection reservoir is then filled with a solution of different ionic strength, ACN/water 70:30 (v/v) + 5 mM $NH_4H_2PO_4$ + 5 mM LiDS and an electric field of 617 V/cm is applied. The solution of the injection reservoir flows into the microchannel and after a while the electric current in the circuit has changed. The measure of this time (average of six determinations) allows the calculation of μ_{eo} from the applied electric field and the channel length. It is then possible to calculate the retention factor of each solute.

3 Results and discussion

Figure 1 visualizes all the irradiation conditions used for the synthesis of acrylate monolith in the COC micro-channel. For a fixed light intensity P, irradiation energy W was increased by increasing irradiation time t (according to Eq. (2)). On the graph W versus t, these experiments are represented by points situated on a straight line including origin. Seven values of P were tested (see Section 2). The value placed close to each experiment point states the minimal plate height H_{min} obtained for fluoranthene.

© 2012 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Figure de meilleure qualité en IV.3.2

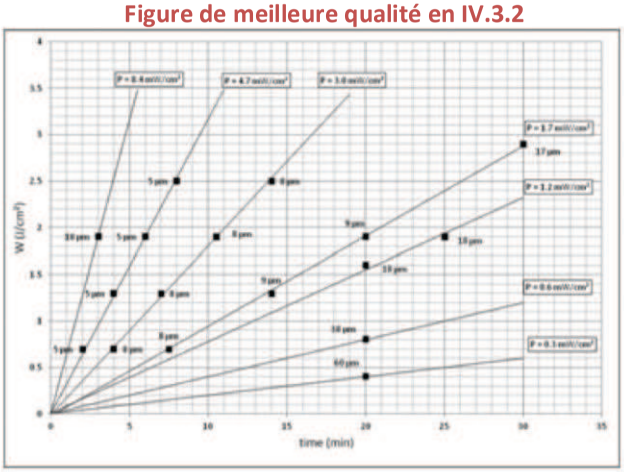


Figure 1. Influence of light intensity P and irradiation time t (or irradiation energy W) on minimal plate height H_{min} (μm) for fluoranthene.

Irradiation time (consequently, irradiation energy) does not seem to be the major parameter influencing electrochromatography efficiency. Indeed, for a given value of P, H_{min} stays constant until the monolith begins to degrade because irradiation time becomes too long: for example, at $P = 1.7$ mW/cm^2, $H_{min} = 8$–9 μm for $t = 7.5$, 14, and 20 min and $H_{min} = 17$ μm for $t = 30$ min. UV degradation is prejudicial to electrochromatographic performances before it becomes visible on monolithic structure (Fig. S2 of Supporting Information).

On the other hand, electrochromatography performance is strongly dependent on light intensity. At $t = 20$ min, H_{min} decreases from 60 to 9 μm when P increases from 0.3 to 1.7 mW/cm^2. At $W = 1.9$ J/cm^2, H_{min} first decreases from 9 to 5 μm when P increases from 1.7 to 4.7 mW/cm^2 and then increases to 18 μm when P reaches 8.4 mW/cm^2. So, there is an optimal light intensity (4.7 mW/cm^2) for which H_{min} is minimal (equal to 5 μm), i.e., electrochromatography efficiency is maximal ($N = 200\,000$ plates/m). The irradiation time needed to achieve this performance is very short: 2 min are sufficient.

The increase of light intensity also involves a modification of monolith morphology (SEM images are provided as Supporting Information). Nodule size decreases from 0.9 to 0.7 μm when light intensity increases from 1.2 to 4.7 mW/cm^2, and then increases to 1.4 μm for P = 8.4 mW/cm^2 (Fig. S1). These observations are corroborated by the modification of van Deemter curves of fluoranthene with P-value (Fig. 2): the contributions of stationary phase inhomogeneity and mass transfer between mobile and stationary phase seem to be minimal when the nodule size is minimized. Irradiation conditions that resulted in highly homogeneous structures ($P = 1.7$ mW/cm^2 and $P = 4.7$ mW/cm^2, Fig. S1) provide an efficient stationary phase with a flat van Deemter profile (Fig. 2). An optimal light intensity of 4.7 mW/cm^2 results in minimal height of a theoretical plate. Although the differences between the polymeric structures obtained at

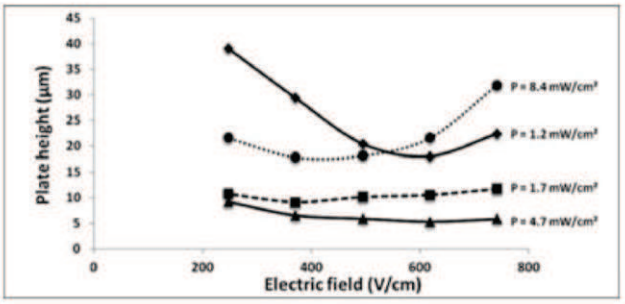


Figure 2. van Deemter curves obtained for fluoranthene with 1.9 J/cm^2 irradiation energy and different light intensities.

1.7 mW/cm^2 and 4.7 mW/cm^2 are not very important, it can be observed that the optimal intensity corresponds to (1) the smallest nodule size (0.7 μm); (2) discrete nodules and absence of agglomerates (Fig. S1). As light intensity increases, the decrease of nodule size can be attributed to an increase in polymerization rate. The amount of free-radical nuclei is increased and their molecular mobility is also increased because of the increase of temperature with light intensity [22]. Consequently, polymerization process starts in more places and a great number of small nodules are formed. At very high light intensity (8.4 mW/cm^2), the concentration of nuclei is so high that polymerization reaction proceeds in both growing nodules and surrounding solution. This involves the formation of larger agglomerates (visible on Fig. S1) which are composed of embedded smaller nodules [19]. This led to inhomogeneous sizes in the range of 0.8–1.4 μm.

For low intensity, the van Deemter curve reflects a large B-term. We suppose that this is due to voids in the polymeric structure that reduce the obstruction term. If the SEM analysis at 1.2 mW/cm^2 did not visibly point these voids, the experiments conducted at even lower intensity (0.6 mW/cm^2 and 0.3 mW/cm^2) increased this phenomenon and defects become visible on SEM images (Fig. S3). B-term is enhanced so that the optimal plate heights obtained at low intensities were in the range 40–60 μm (van Deemter curves exhibited in Supporting Information, Fig. S4).

The effect of irradiation energy and light intensity on electroosmotic mobility is illustrated in Fig. 3A. Electroosmotic mobility is increased by 30% when irradiation energy increases from 0.7 to 1.9 J/cm^2 and keeps constant when irradiation energy is above of 1.9 J/cm^2. This is due to the fact that charged monomers AMPS, responsible for EOF generation, are not fully converted with energy lower than 1.9 J/cm^2. As already observed in the literature [10, 13], a minimal irradiation energy is necessary to incorporate all AMPS monomers in the monolith structure. Figure 3B shows the influence of irradiation energy and light intensity on retention factor of fluoranthene. In the range of irradiation conditions considered ($W = 0.7$–2.5 J/cm^2 and $P = 1.7$–4.7 mW/cm^2), the retention factor of fluoranthene seems to be constant. This result indicates that the total conversion of uncharged monomers HA and BDDA can be very fast: the irradiation time corresponding to $W = 0.7$ J/cm^2 at

© 2012 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

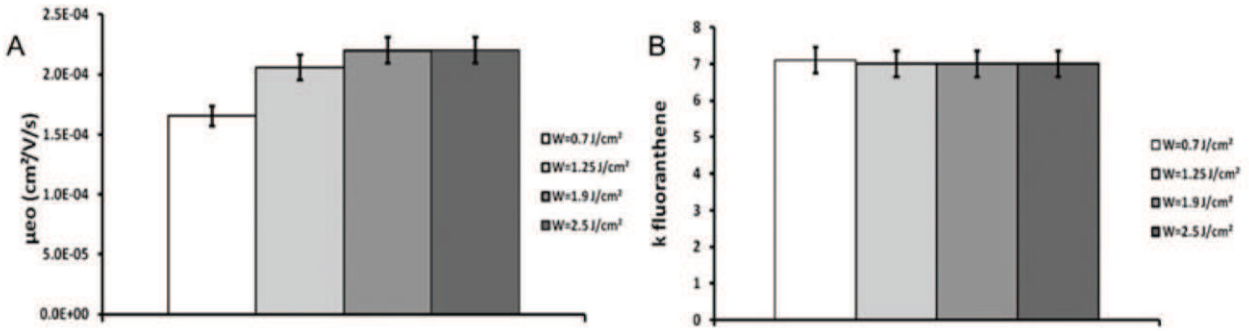


Figure 3. Influence of irradiation energy *W* on (A) electroosmotic mobility and (B) retention factor of fluoranthene. Mobile phase: ACN/water 85:15 (v/v) + 2 mM $NH_4H_2PO_4$ + 5 mM LiDS. Monolith synthesized at optimal light intensity $P = 4.7$ mW/cm^2.

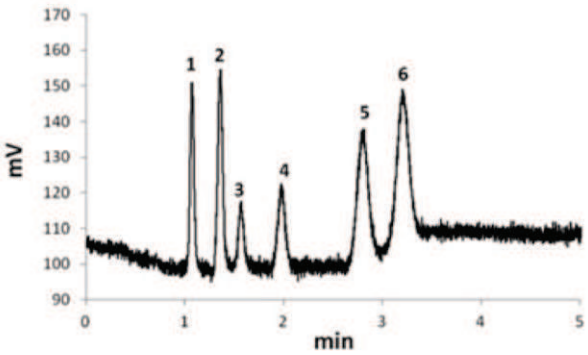


Figure 4. Reversed-phase electrochromatographic separation of six PAHs on acrylate monolith in COC microchip. Mobile phase: ACN/water 70:30 (v/v) + 2 mM $NH_4H_2PO_4$ + 5 mM LiDS; separation field strength: 740 V/cm; separation length: 2 cm. Sample composition: (1) anthracene (120 μM), (2) fluoranthene (33.3 μM), (3) pyrene (430 μM), (4) benzo-*a*-anthracene (0.33 μM), (5) benzo-*a*-pyrene (8.8 μM), and (6) benzo-*k*-fluoranthene (4.4 μM).

$P = 4.7$ mW/cm^2 is 2 min. This is due to the high reactivity of acrylate monomers in polymerization process under UV irradiation [22].

The separation of six PAH included in the United States Environmental Protection Agency list of priority organic pollutants [23] illustrates the high separation efficiency ($N = 200\,000$ to $250\,000$ plates/m for every solute) obtained with the hexyl acrylate monolith photopolymerized in COC microchip with an energy of 1.9 J/cm^2 and an intensity of 4.7 mW/cm^2 (Fig. 4). All solutes are separated in less than 3.5 min on a separation length of 2 cm. This separation was achieved on five microchips obtained with five polymerization mixtures having identical composition but prepared separately. The batch-to-batch repeatability of monolith synthesis is quite satisfactory since the relative standard deviation for the column efficiency, retention factor, and electroosmotic mobility is 6, 8, and 10%, respectively. In order to evaluate the injection-to-injection repeatability, the six-PAH sample was injected 4 times in each monolithic column. The relative standard deviation calculated is 8% for column efficiency and 7% for retention factor.

4 Concluding remarks

The influence of irradiation time (or irradiation energy at constant light intensity) on the structure and chromatographic performances of acrylate monoliths obtained by photopolymerization was widely studied. We demonstrate in this work that the choice of light intensity is very important to get an efficient acrylate monolithic stationary phase in COC microchip. For our system, the adjustment of light intensity to 4.7 mW/cm^2 results in column efficiency of 200 000–250 000 plates/m. Controlling every polymerization parameters will lead to more reliable monoliths and hence an extended use of electrochromatography on chip.

The one-step process for the simultaneous synthesis and anchoring of organic monolith inside COC microchip channel is under French patent pending no. 1156586.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

[1] Svec, F., *J. Chromatogr. B* 2006, *841*, 52–64.

[2] Svec, F., *Electrophoresis* 2009, *30*, S68–S82.

[3] Faure, K., Albert, M., Dugas, V., Crétier, G., Ferrigno, R., Morin, P., Rocca J. L., *Electrophoresis* 2008, *29*, 4948–4955.

[4] Flook, K., Agroskin, Y., Pohl, C., *J. Sep. Sci.* 2011, *34*, 2047–2053.

[5] Watts, D. C., *Dent. Mater.* 2005, *21*, 27–35.

[6] Calvert, J. G., Pitts, Jr, J. N., Thompson, D. D., *J. Am. Chem. Soc.* 1956, *78*, 4239–4242.

[7] Van Gerven, T., Mul, G., Moulijn, J., Stankiewicz, A., *Chem. Eng. Process.* 2007, *46*, 781–789.

[8] Viklund, C., Svec, F., Frechet, J. M. J., Irgum, K., *Chem. Mater.* 1996, *8*, 744–750.

[9] Zhang, L., Ping, G., Zhang, L., Zhang, W., Zhang, Y., *J. Sep. Sci.* 2003, *26*, 331–336.

[10] Yu, C., Xu, M., Svec, F., Fréchet, J. M. J., *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 2002, *40*, 755–769.

© 2012 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

[11] Svec, F., Frechet, J. M. J., *Chem. Mater.* 1995, *7*, 707–715.

[12] Grafnetter, J., Coufal, P., Tesařová, E., Suchánková, J., Bosáková, Z., Ševčik, J., *J. Chromatogr. A* 2004, *1049*, 43–49.

[13] Yu, C., Svec, F., Frechet, J. M. J., *Electrophoresis* 2000, *21*, 120–127.

[14] Bernabé-Zafón, V., Beneito-Cambra, M., Simó-Alfonso, E. F., Herrero-Martínez, J. M., *J. Chromatogr. A* 2010, *1217*, 3231–3237.

[15] Augustin, V., Jardy, A., Gareil, P., Hennion, M. C., *J. Chromatogr. A* 2006, *1119*, 80–87.

[16] Bernabé-Zafón, V., Beneito-Cambra, M., Simó-Alfonso, E. F., Ramis-Ramos, G., Herrero-Martínez, J. M., *Electrophoresis* 2009, *30*, 1929–1936.

[17] Barrioulet, M. P., Delaunay-Bertoncini, N., Demesmay, C., Rocca, J. L., *Electrophoresis* 2005, *26*, 4104–4115.

[18] Ladner, Y., Crétier, G., Faure, K., *J. Chromatogr. A* 2010, *1217*, 8001–8008.

[19] Eeltink, S., Hilder, E. F., Geiser, L., Svec, F., Fréchet, J. M. J., Rozing, G. P., Schoenmakers, P. J., Kok, W. T., *J. Sep. Sci.* 2007, *30*, 407–413.

[20] Ladner, Y., Bruchet, A., Crétier, G, Dugas, V, Randon, J, Faure, K., *Lab Chip* 2012, *12*, 1680–1685.

[21] Huang, X., Gordon, M. J., Zare, R. N., *Anal. Chem.* 1988, *60*, 1837–1838.

[22] Decker, C., *Polym. Int.* 1998, *45*, 133–141.

[23] Plaza-Bolaños, P., Frenich, A. G., Vidal, J. L. M., *J. Chromatogr. A* 2010, *1217*, 6303–6326.

© 2012 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Supplementary material JSS 201200165

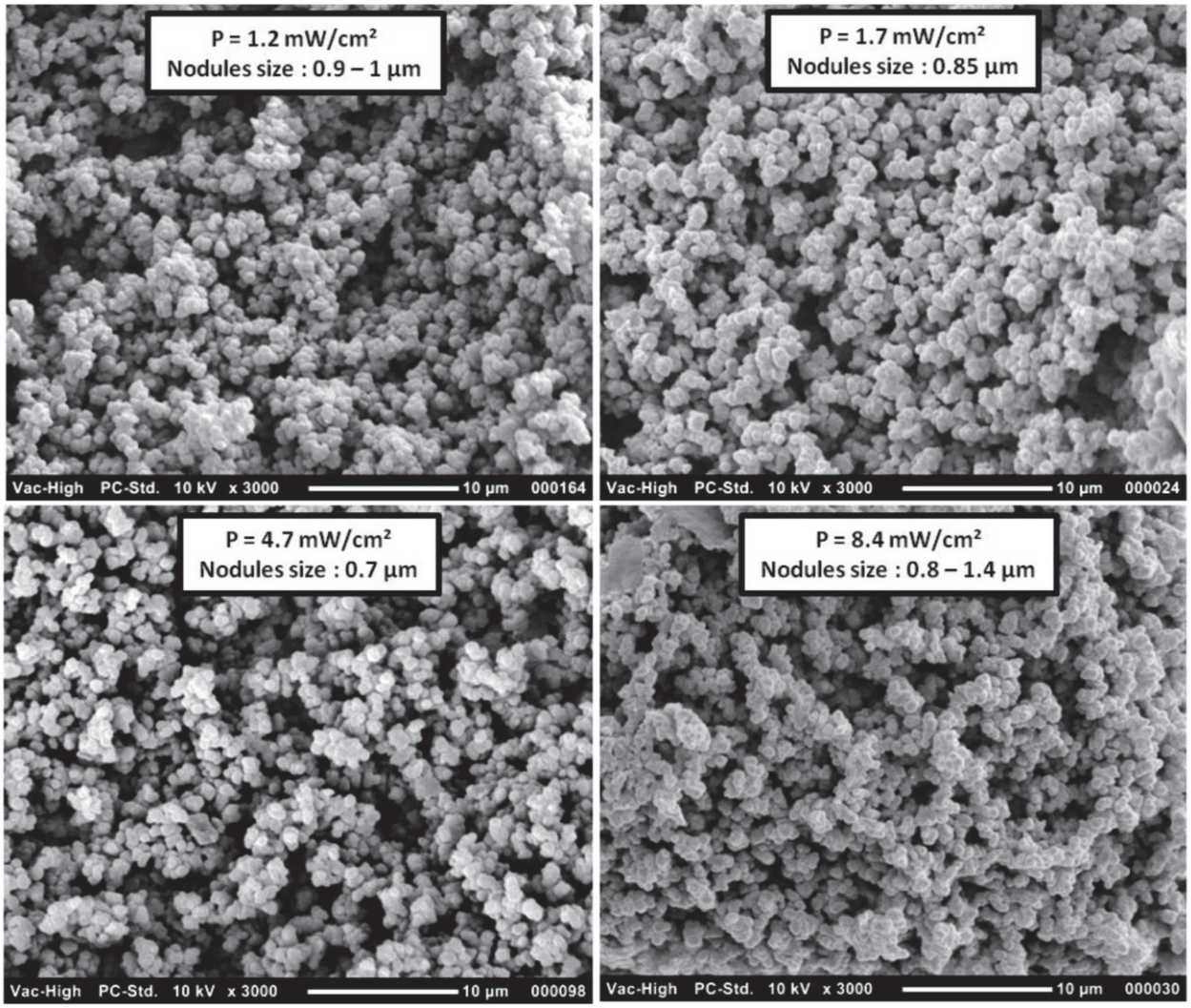


Figure S1 : SEM images of an acrylate monolith obtained at W = 1.9 J/cm² for different light intensity P

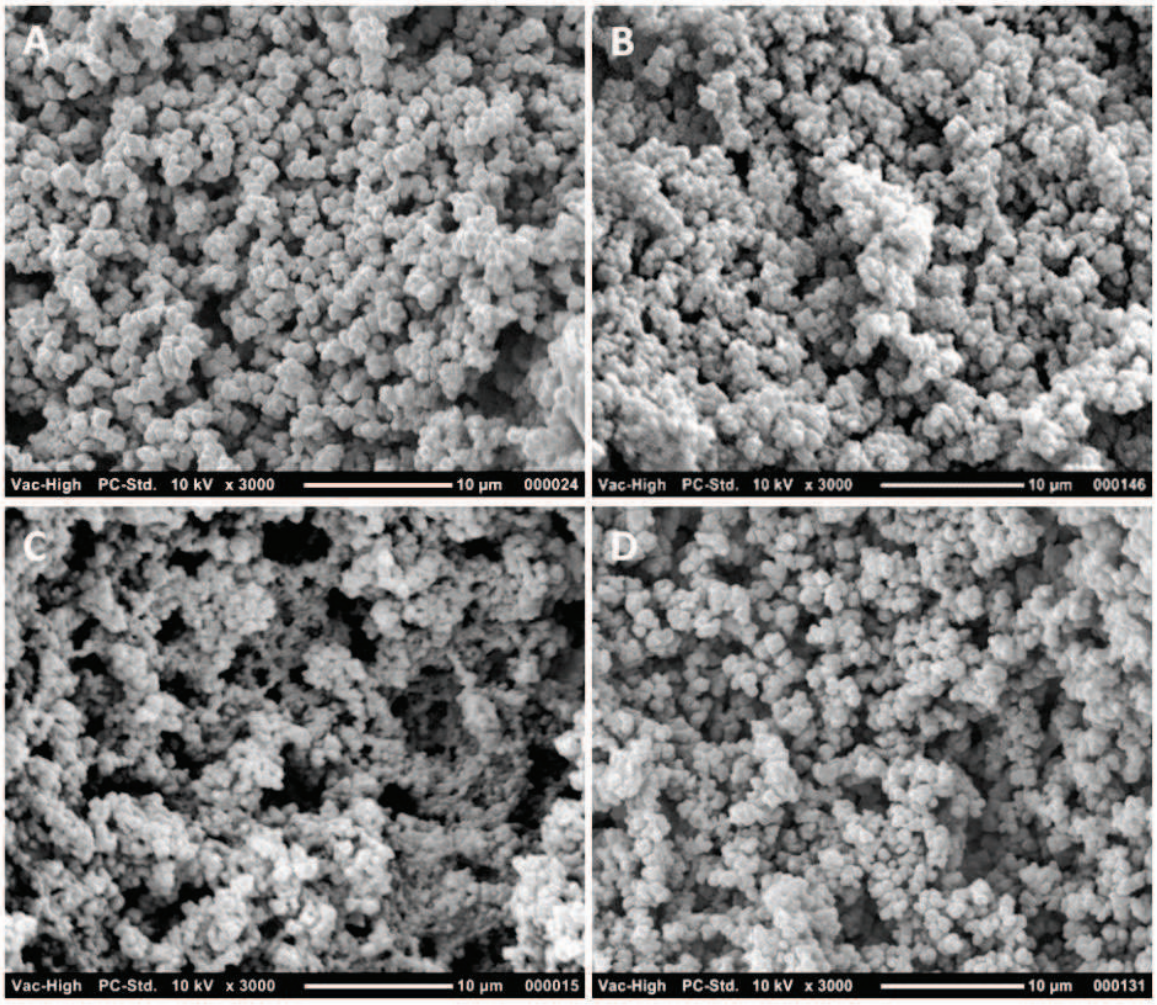


Figure S2 : SEM images of an acrylate monolith obtained for:

(A) P = 1.7 mW/cm² and W = 1.9 J/cm² (t=20min),
(B) P = 1.7 mW/cm² and W = 2.9 J/cm² (t = 30min)
(C) P = 1.7 mW/cm² and W = 6 J/cm² (t=60min)
(D) P = 3 mW/cm² and W = 2.5 J/cm² (t = 14min)

Commentaries on UV degradation

Degradation of monoliths under long-term UV exposure is well known as stated in the introduction.

Once again, the observations using SEM reflect this degradation when it reaches the macroscopic level. However, the collapse is observable through electrochromatographic performances long before it appears on SEM pictures. To illustrate this degradation, we provide to the readers the evolution of the macroscopic structure of a monolith synthesized with P = 1.7mW/cm² over 20min (Figure S2A), 30min (Figure S2B) and 60min (Figure S2C). It appears from the electrochromatographic performances that the monolith is degraded under 30min at 1.7mW/cm² (Figure S2B), whereas it is still efficient when synthesized with a 14-min irradiation at 3.0mW/cm² (Figure S2D), meaning that the energy received (over 2.5J/cm²) is not the main cause of degradation. This degradation is not so clear on SEM observations.

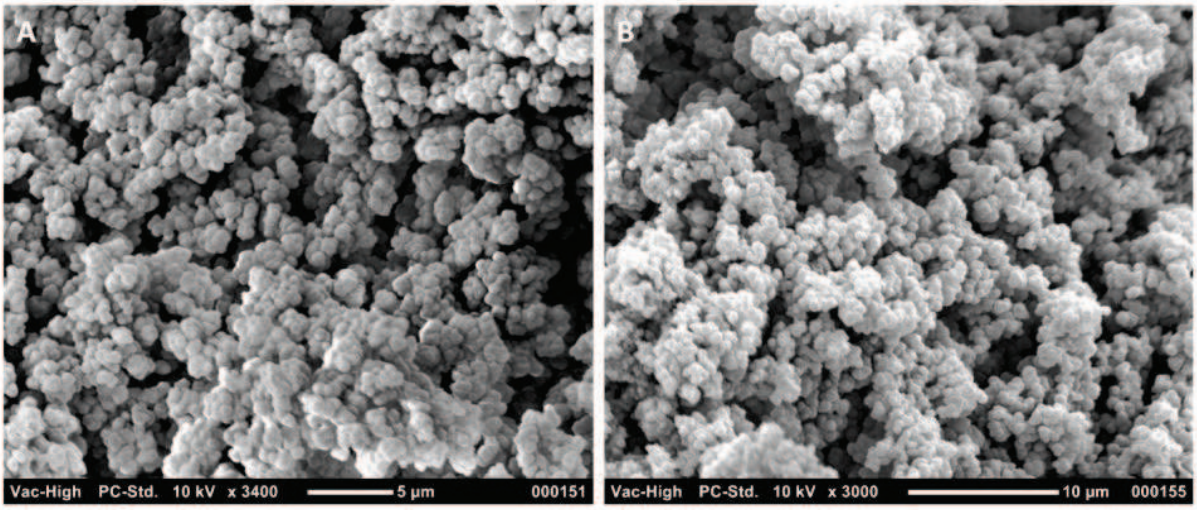


Figure S3 : SEM images of an acrylate monolith obtained after 20 min of low intensity photopolymerization
(A) for W = 0.4 J/cm² and P = 0.3 mW/cm²
(B) for W = 0.8 J/cm² and P = 0.6 mW/cm².

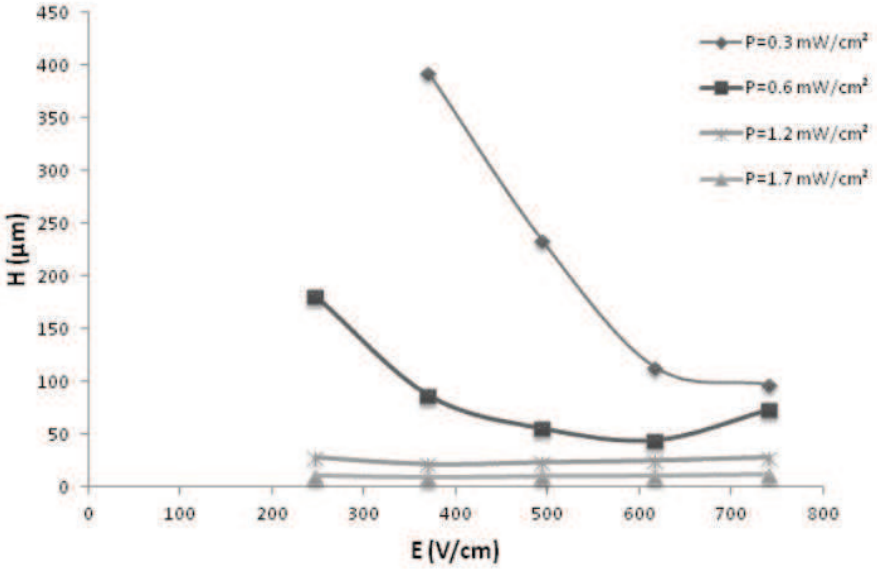


Figure S4: van Deemter curve obtained for fluoranthene with a monolith synthesized with a 20min irradiation time at different light intensities.

IV.3.2. Correction de l'article 3

Des problèmes d'édition ont altéré la lisibilité de la figure 1 dans l'article 3. Voici ci-dessous cette figure reproduite dans un format image de meilleure qualité.

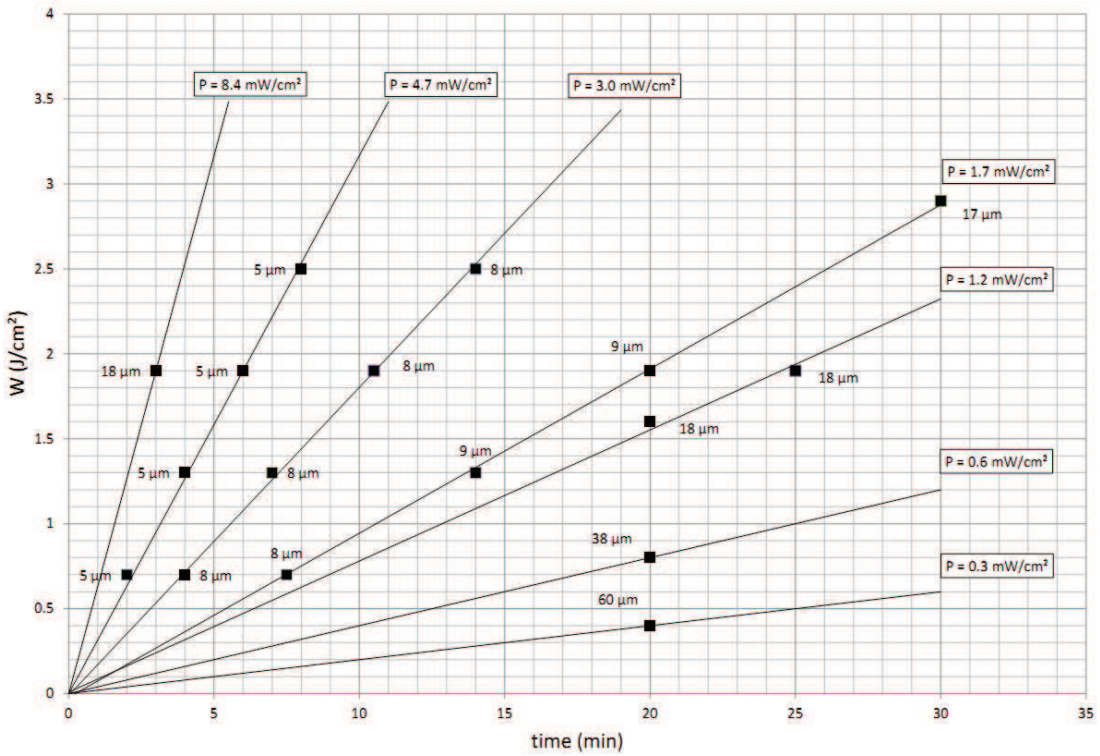


Figure 1 : Influence of light intensity P and irradiation time t (or irradiation energy W) on minimal plate height H_{min} (µm) for fluoranthene.

IV.3.3. Compléments d'information

L'article 3 montre que l'utilisation d'une intensité d'irradiation de 4.7 mW/cm² pour la synthèse du monolithe HA/BDDA en microsystème COC est nécessaire pour obtenir des efficacités similaires à celles obtenues en capillaire dans lequel le monolithe est photopolymérisé sous une intensité de 1.7 mW/cm². Cette différence d'intensité nécessaire peut être due à l'augmentation de la quantité de BME pour la synthèse en microsystème, mais également à la différence de transmittance entre la silice et le COC.

Pour étudier cet aspect, nous avons déterminé la transmittance des deux matériaux, COC et silice, pour différentes épaisseurs (**Figure IV.11**). La transmittance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre Lambda Bio (Perkin Elmer, Massachusetts, Etats-Unis). Les différentes épaisseurs sont simulées en empilant des plaques de 380 µm d'épaisseur. En capillaire et en microsystème, les épaisseurs de silice et de COC autour du mélange réactionnel sont respectivement de 0.29 mm et 0.5 mm. Dans le cas d'un rayonnement UV unidimensionnel (une seule direction d'irradiation) et en considérant les épaisseurs de ces matériaux, la transmittance des rayons UV à 365 nm est de 99 % dans un capillaire de silice et 83 % dans un canal COC. Comme l'intensité P_a reçue par le mélange de polymérisation est directement reliée à la transmittance du matériau, P_a est donc plus importante

dans un capillaire de silice que dans un canal COC pour une même intensité P d'irradiation délivrée par la source lumineuse. Cette intensité reçue P_a plus faible dans un canal COC entraîne un degré de conversion des monomères DC moins important (d'après l'équation **(1)** de l'article 3).

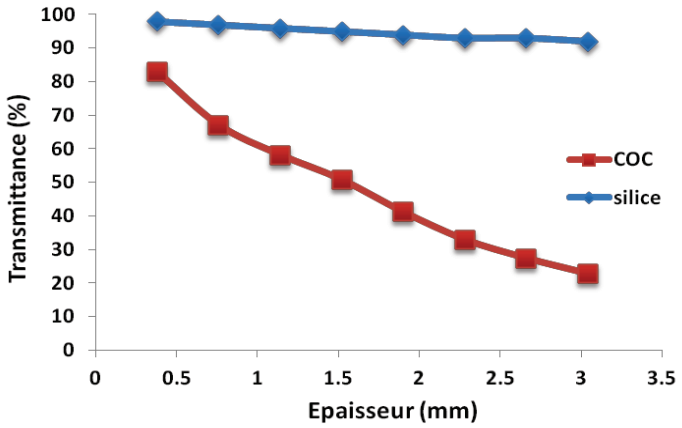


Figure IV.11 : Variation de la transmittance UV à 365 nm en fonction de l'épaisseur du matériau.

Si DC est différent, la structure du monolithe HA/BDDA en microsystème devrait être différente de celle observée en capillaire dans les mêmes conditions d'irradiation. Cependant, l'étude MEB d'un monolithe photopolymérisé pendant 10 min à P = 1.7 mW/cm^2 (W = 0.95 J/cm^2) en capillaire et en microsystème n'a pas montré des différences de structures significatives (taille des nodules). Une différence dans la taille et la distribution des pores peut être à l'origine de ces différences de performances électrochromatographiques [9, 15, 16].

Afin de vérifier notre hypothèse, les parois en COC d'un microsystème ont été préalablement fonctionnalisées avec du PEGMA, ceci à deux concentrations différentes 0.1 M et 0.25 M afin de moduler l'intensité reçue par le mélange de polymérisation durant la synthèse. En effet, compte tenu de la forte absorption à 365 nm du monomère PEGMA en solution (**Figure IV.12**), on peut penser que (1) le greffage du PEGMA sur les parois du COC induit une diminution de l'intensité du rayonnement UV au sein du mélange réactionnel; (2) ce phénomène augmente avec l'épaisseur de la couche de PEGMA greffée à la surface; (3) cette épaisseur augmente avec la concentration de PEGMA dans le mélange de fonctionnalisation [17].

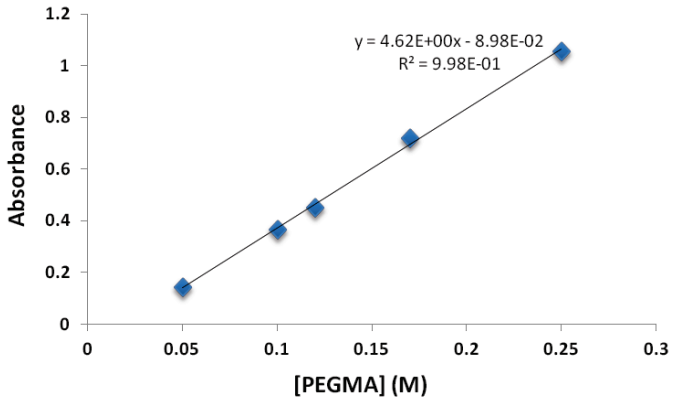


Figure IV.12 : Variation de l'absorbance à 365 nm, d'une solution de PEGMA dans l'eau, en fonction de la concentration en PEGMA.

Comme décrit dans l'article 3, les parois en COC sont modifiées chimiquement sous irradiation UV par un mélange de PEGMA et de BME en une seule étape. Le mélange est ensuite irradié à 365 nm pendant 20 min avec une intensité P constante de 1.7 mW/cm^2 (W = 1.9 J/cm^2). Après un rinçage des canaux à l'éthanol dans une seconde étape, le monolithe HA/BDDA est synthétisé dans les canaux en COC pendant 10 min avec une intensité P constante de 1.7 mW/cm^2. La **figure IV.13** montre, pour les deux concentrations en PEGMA, la formation d'une structure homogène présentant des tailles de nodules de 0.9 µm. Le monolithe acrylate est également parfaitement ancré aux parois du canal en COC. Ces structures sont similaires à celles obtenues dans l'article 3 ce qui semble indiquer que la fonctionnalisation PEGMA du COC n'altère pas la structure du monolithe HA/BDDA.

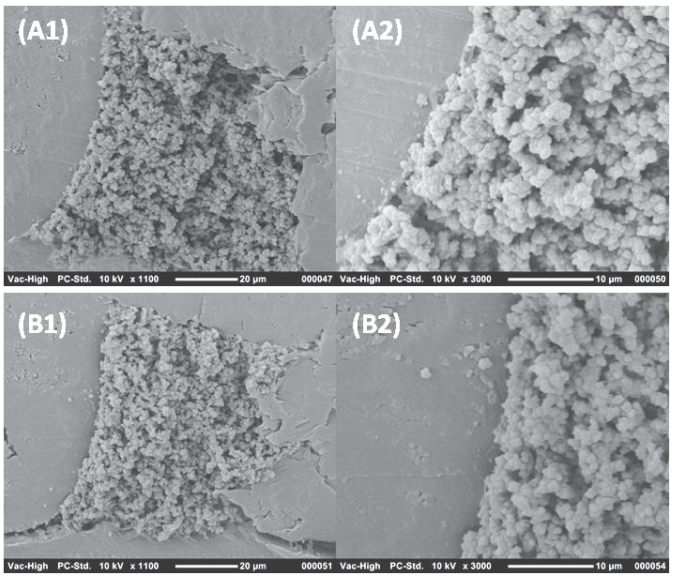


Figure IV.13 : Images MEB d'un monolithe HA/BDDA photopolymérisé pendant 10 minutes dans un canal fonctionnalisé avec du PEGMA à (A) 0.1 M et (B) 0.25 M (A1) et (B1) vue d'ensemble et (A2) et (B2) zoom sur les parois. Grossissement ×1100 et ×3000. Tension 10 kV.

Pour les deux monolithes synthétisés, H, k_i et μ_{eo} ont été déterminés avec la même phase mobile : ACN/eau 70/30 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$. La **figure IV.14** représente les courbes de van Deemter de l'anthracène obtenues. A la vitesse optimale, la hauteur équivalente à un plateau théorique est approximativement identique et égale à 5 µm quelle que soit la concentration de PEGMA utilisée. Cependant, l'allure des courbes de van Deemter est différente et le terme C de résistance au transfert de masse semble plus important pour une fonctionnalisation avec 0.25 M de PEGMA. Ceci suggère un volume plus important de phase stagnante et donc des pores différents de ceux obtenus pour une fonctionnalisation avec 0.1 M PEGMA [9, 18]. La modification de l'intensité P_a reçue par le mélange réactionnel semble entraîner une modification de la porosité du monolithe.

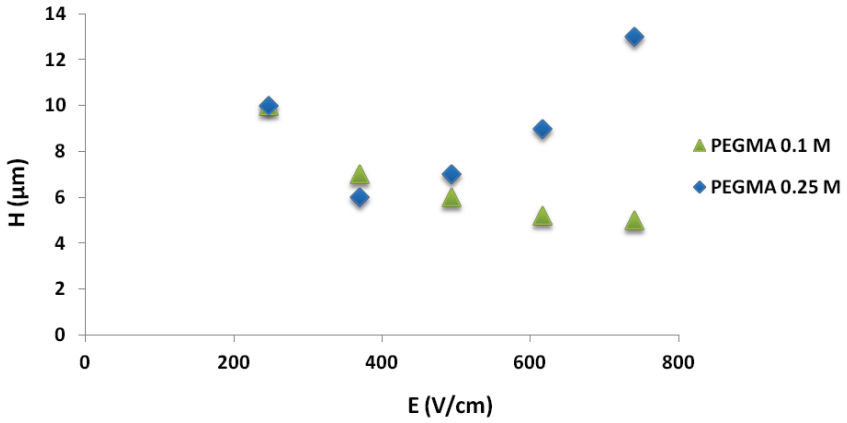


Figure IV.14 : Influence de la fonctionnalisation du COC par du PEGMA sur les courbes de van Deemter obtenus pour l'anthracène. Phase mobile : ACN/eau 70/30 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$. Injection : 5 s à 125 V/cm. Longueur de séparation : 3.5 cm. Soluté : anthracène à 120 µM.

Par contre, la rétention de l'anthracène (k_i = 5.3) et la mobilité électroosmotique (μ_{eo} = 1.8 × 10^{-4} $cm^2.V^{-1}.s^{-1}$) sont identiques dans les deux cas et sont similaires à celles mesurées dans l'article 3 où les parois en COC ne sont pas modifiées chimiquement. Ceci suggère que les incorporations des chaines alkyles et des charges négatives de l'AMPS ne sont pas influencées par la fonctionnalisation des parois. En résumé, cette étude montre que la variation de l'intensité P_a reçue par le mélange réactionnel n'entraîne pas de variation dans l'homogénéité de la structure et la taille des nodules, mais peut induire une variation importante de la taille des pores. L'intensité P délivrée par le four UV est donc un paramètre essentiel dans l'obtention d'un monolithe organique robuste et performant.

Nous avons fait le choix de ne pas évaluer la distribution poreuse du monolithe par des techniques de porosimétrie au mercure ou de BET car ces mesures sont effectuées dans des conditions d'analyse différentes (à sec) de celles utilisées lors des séparations électrochromatographiques et ne sont donc pas représentatives de la structure réelle du monolithe HA/BDDA imbibé de phase mobile ACN/eau.

IV.4. Conclusion

L'optimisation des conditions d'irradiation a permis d'améliorer sensiblement les performances séparatives du monolithe HA/BDDA. Ainsi, l'utilisation d'une intensité optimale de 4.7 mW/cm² permet l'obtention d'efficacité de l'ordre de 250 000 plateaux/m sur les HAP, comparable à celle obtenue en capillaire. La transposition de la synthèse du monolithe acrylate du format capillaire vers le format microsystème sans perte de performances électrochromatographiques semble être validée. La mise en œuvre de la préconcentration en tête de canal, la séparation de différentes familles de solutés et l'analyse d'échantillons réels peuvent maintenant être réalisées afin d'évaluer la robustesse, la versatilité et les performances séparatives de ce microsystème séparatif dont les canaux sont remplis de monolithe HA/BDDA.

IV.5. Références bibliographiques

[1] Guthrie, J., Jeganathan, M., Otterburn, M., Woods, J., *Polymer Bulletin* 1986, *15*, 51-58.

[2] Van Gerven, T., Mul, G., Moulijn, J., Stankiewicz, A., *Chem. Eng. Process.* 2007, *46*, 781-789.

[3] Huang, X., Gordon, M. J., Zare, R. N., *Anal. Chem* 1988, *60*, 1837-1838.

[4] Locascio, L. E., Perso, C. E., Lee, C. S., *J. Chromatogr. A* 1999, *857*, 275-284.

[5] Wan, Q.-H., *J. Chromatogr. A* 1997, *782*, 181-189.

[6] Barrioulet, M. P., Delaunay-Bertoncini, N., Demesmay, C., Rocca, J. L., *Electrophoresis* 2005, *26*, 4104-4115.

[7] Cantó-Mirapeix, A., Herrero-Martínez, J., M. , Mongay-Fernández, C., Simó-Alfonso, E., F. , *Electrophoresis* 2008, *29*, 4399-4406.

[8] Jiang, T., Jiskra, J., Claessens, H., Cramers, C., *J. Chromatogr. A* 2001, *923*, 215-227.

[9] Nischang, I., Teasdale, I., Brüggemann, O., *J. Chromatogr. A* 2010, *1217*, 7514-7522.

[10] Svec, F., Frechet, J. M. J., *Macromolecules* 1995, *28*, 7580-7582.

[11] Eeltink, S., Rozing, G. P., Schoenmakers, P. J., Kok, W. T., *J. Chromatogr. A* 2006, *1109*, 74-79.

[12] Ladner, Y., Crétier, G., Faure, K., *J. Chromatogr. A* 2010, *1217*, 8001-8008.

[13] Augustin, V., Jardy, A., Gareil, P., Hennion, M. C., *J. Chromatogr. A* 2006, *1119*, 80-87.

[14] Bernabé-Zafón, V., Beneito-Cambra, M., Simó-Alfonso, E. F., Ramis-Ramos, G., Herrero-Martínez, J. M., *Electrophoresis* 2009, *30*, 1929-1936.

[15] Nischang, I., Brueggemann, O., Svec, F., *Anal. Bioanal. Chem* 2010, *397*, 953-960.

[16] Svec, F., Frechet, J. M. J., *Anal. Chem.* 1992, *64*, 820-822.

[17] Stachowiak, T., Mair, D., Holden, T., Lee, L. J., *et al.*, *J. Sep. Sci.* 2007, *30*, 1088-1093.

[18] Nischang, I., Brueggemann, O., Svec, F., *Anal. Bioanal. Chem..* 2010, *397*, 953-960.

Chapitre V

Applications du dispositif analytique miniaturisé

Ce chapitre a fait l'objet :

- **d'une publication** : "Electrochromatography on acrylate-based monolith in cyclic olefin copolymer microchip : a cost-effective and easy-to-use technology". Y. Ladner, G. Crétier, K. Faure, Electrophoresis, 2012, article soumis à Electrophoresis.
- **d'une communication orale** : "Electrochromatography on acrylate-based monolith in cyclic olefin copolymer microchip : a cost-effective and easy-to-use technology". Y. Ladner, G. Crétier, K. Faure , 19th International Symposium Electro- and Liquid Phase-separation Techniques, 30 Septembre – 3 Octobre 2012, Baltimore, Etats-Unis.
- **d'une communication par affiche** : "Electrochromatography on acrylate-based monolith in cyclic olefin copolymer microchip : a cost-effective and easy-to-use technology". Y. Ladner, A. Berthod, G. Crétier, K. Faure, 38th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, 16 – 21 Juin 2012, Anaheim, Etats-

Contexte

La mise en œuvre d'un protocole de synthèse et d'ancrage simultanés du monolithe HA/BDDA dans le microcanal en COC (chapitre III) et l'optimisation des conditions d'irradiation durant la polymérisation (chapitre IV) ont permis d'améliorer significativement les performances électrochromatographiques du microsystème. Ainsi, des efficacités atteignant 250 000 plateaux/m ont été obtenues sur la séparation de 6 HAP. La robustesse de la synthèse du monolithe HA/BDDA est également satisfaisante puisque des CV sur H, k_i et μ_{eo} inférieurs à 10 % ont été obtenus pour 6 synthèses différentes.

L'objectif du chapitre V est de montrer que ce dispositif analytique miniaturisé est utilisable en pratique, c'est-à-dire qu'il permet la séparation d'une large gamme de solutés (sous forme neutre ou ionisée), la mise en œuvre d'une étape de préconcentration en tête de colonne et la résolution d'un problème analytique concret tel que l'analyse quantitative de quelques amines biogènes dans le vin.

Compte tenu du fait que seule la détection par fluorescence est possible avec notre dispositif de test des microsystèmes, nous nous sommes intéressés uniquement à des solutés qui fluorescent naturellement (aflatoxines, ochratoxine) et à des solutés comportant une fonction amine primaire (amines biogènes, catécholamines, acides aminés) qu'il est possible de dériver avant injection pour les rendre fluorescents. La structure chimique de tous les solutés est donnée dans l'annexe 2.

V.1. Matériels et méthodes

La mise en œuvre des microsystèmes (injection, séparation et détection) a été décrite dans la partie II.1. Cette partie « Matériels et Méthodes » est dédiée à la description du protocole de dérivation des amines primaires et à l'optimisation de la détection par fluorescence.

V.1.1. Dérivation des amines primaires avant injection

L'agent dérivant choisi est le naphtalène-2,3-dicarboxaldéhyde (NDA). Il réagit sur le groupement amine primaire en présence d'ion cyanure qui est un agent nucléophile (**Figure V.1**). L'utilisation du NDA présente plusieurs avantages : il ne fluoresce qu'après avoir réagi, le temps de réaction est rapide (quelques minutes à une dizaine de minutes suivant le composé) et le composé dérivé a un temps de demi-vie compatible avec la durée d'analyse [1, 2]. Le produit de réaction ainsi obtenu fluoresce à une longueur d'onde supérieure à 500 nm quand il est excité à 405 nm. Il est important de remarquer qu'une fois dérivée par l'agent de dérivation, la fonction amine primaire des amines biogènes, acides aminés et catécholamines n'est plus présente.

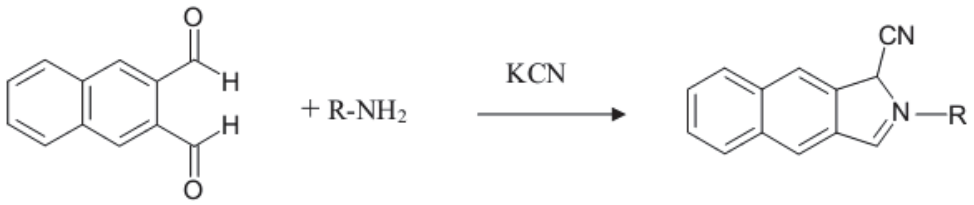


Figure V.1 : Réaction de dérivation de la NDA avec une amine primaire.

La procédure de dérivation qui a été utilisée est similaire à celle décrite par Denoroy et al [3]. Elle consiste à mélanger :

- 50 µL de tampon borate de sodium 100 mM préparé à partir d'un mélange d'acide borique 500 mM et d'une solution de tétraborate de sodium 125 mM.
- 50 µL d'une solution de cyanure de sodium 43 mM (préparé dans l'eau).
- 250 µL de NDA 2,9 mM préparé dans un mélange d'acétonitrile et d'eau (1/1, v/v).
- 100 µL d'échantillon (vin ou solution aqueuse de neurotransmetteurs ou d'amines biogènes).

Une étude cinétique a été réalisée afin de déterminer le temps de réaction nécessaire. La tyramine a été choisie comme soluté test dans cette étude et sa concentration de départ a été fixée à 1 mM. Après dérivation, cette amine biogène dérivée est injectée dans un canal en COC non fonctionnalisé rempli de monolithe HA/BDDA photopolymérisé dans les conditions décrites dans l'article 3. Le temps de dérivation qui correspond à la durée entre le mélange des réactifs et l'injection dans le microsystème, a été varié de 1 à 60 minutes. La **figure V.2** montre l'évolution de l'aire du pic de tyramine dérivée et de la hauteur équivalente à un plateau théorique H mesurée sur ce pic en fonction du temps de dérivation. L'aire du pic augmente très rapidement jusqu'à 150 mV.s lorsque le temps de dérivation passe de 0 à 3 min, puis se stabilise pour des temps de dérivation compris entre 3 et 60 min. Ce résultat suggère que le temps de dérivation minimal nécessaire est de 3 min. Parallèlement, H varie légèrement, de 6 à 8 µm, lorsque le temps de dérivation augmente jusqu'à 60 min, il est aussi important de noter que le temps de rétention de la tyramine dérivée ne varie pas avec le temps de dérivation (CV < 5 %). Enfin, aucun pic "parasite" n'apparait lorsque le temps de dérivation augmente. Ces trois dernières remarques suggèrent qu'après dérivation, le produit dérivé reste stable.

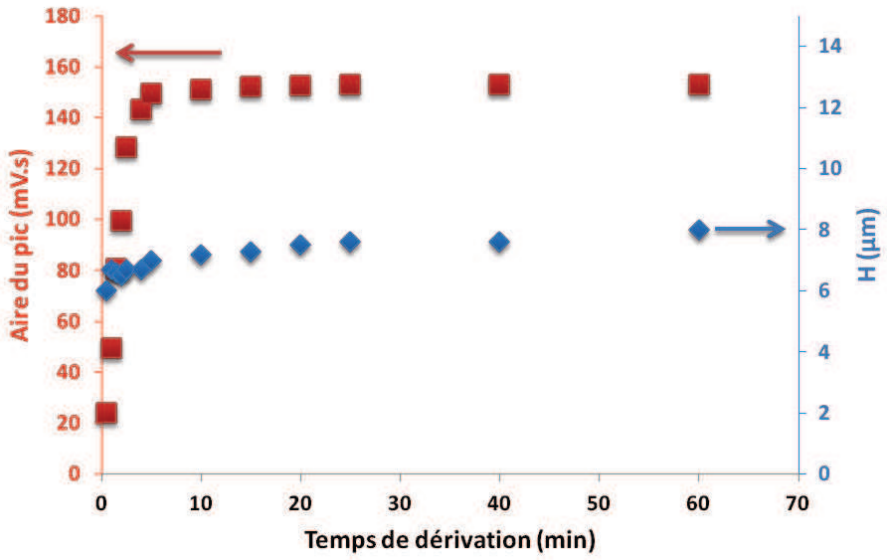


Figure V.2 : Evolution de l'aire du pic de la tyramine dérivée NDA et de la hauteur équivalente à un plateau théorique H en fonction du temps de dérivation. Phase mobile : ACN/eau 70/30 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$. $E_{separation}$ = 620 V/cm. Injection : 5 s à 125 V/cm. Longueur de séparation : 7 cm. Soluté : tyramine à 1 mM.

Des résultats similaires à ceux de la tyramine ont été observés pour l'histamine et la tryptamine. Le protocole de dérivation permet donc d'injecter les amines primaires dérivées NDA pendant plus d'une heure après le début de la réaction de dérivation sans risque de dégradation des performances séparatives. Le temps de dérivation a été fixé à 4 minutes pour conjuguer la dérivation totale des amines primaires et la rapidité des analyses. Néanmoins, l'échantillon dérivé doit être conservé à l'abri de la lumière afin d'éviter toute dégradation.

V.1.2. Optimisation de la détection par fluorescence

Pour notre système de détection par fluorescence utilisé en microsystème, le rapport signal/bruit S/N est donné par la relation suivante [4] :

$$\frac{S}{N} = \frac{\phi Q_E t_i}{\sqrt{(\phi Q_E t_i + N_d t_i + N_r{}^2)}} \qquad \textbf{(V.1)}$$

où φ est le flux de photons (photons/pixel/seconde), Q_E est l'efficacité quantique, t_i est le temps d'intégration, N_d est le bruit au noir et N_r est le bruit de lecture.

Un des moyens simples d'augmenter S/N est d'augmenter le flux de photons φ en ajustant le grossissement optique (4×, 10× ou 20×) afin d'adapter la zone de détection à la dimension du canal. En effet, plus le grossissement est grand, plus le nombre de photons arrivant sur l'échantillon est important (du fait d'une meilleure focalisation de la lumière excitatrice), plus φ est élevée et meilleur est le rapport signal/bruit. Cependant, l'augmentation de φ peut entraîner des bruits N_d et N_r plus

importants, ce qui peut altérer S/N. Il est donc nécessaire de trouver le grossissement optimal permettant d'avoir un signal important conjugué à un bruit faible.

La **figure V.3** montre l'évolution de S/N mesuré sur la tyramine dérivée NDA en fonction du grossissement utilisé. Le rapport signal/bruit augmente d'un facteur 7 (passe de 5 à 35) lorsque le grossissement passe de 4× à 10×. En fait, c'est le signal qui augmente d'un facteur 7 alors que le bruit n'augmente pas. Lorsque le grossissement passe de 10× à 20×, le signal et le bruit augmentent d'un facteur 1.5 et le rapport S/N n'évolue pas. Le grossissement 10× a donc été choisi pour la suite des opérations.

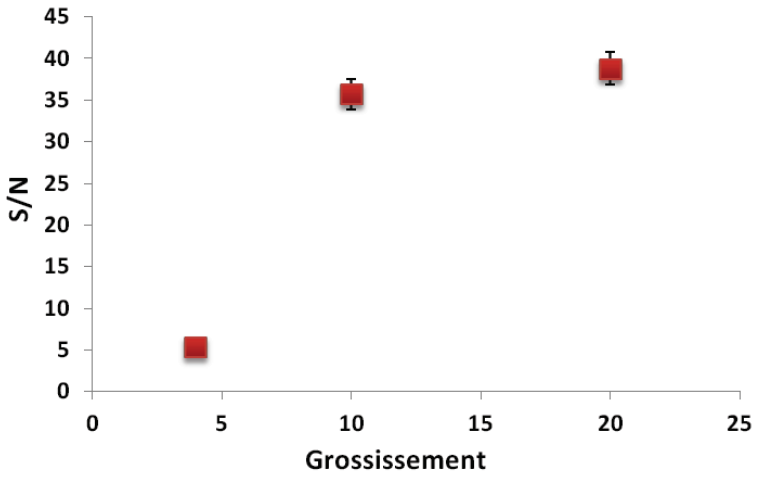


Figure V.3 : Effet du grossissement sur le rapport signal/bruit S/N mesuré sur la tyramine dérivée NDA. Phase mobile : ACN/eau 70/30 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$. $E_{separation}$ = 620 V/cm. Injection : 5 s à 125 V/cm. Longueur de séparation : 7 cm. Soluté : tyramine (120 µM).

Le système de détection peut également contribuer à la dispersion de la zone de soluté. La variance liée au système de détection $\sigma^2_{détection,v}$ exprimée en unité de volume est donnée par la relation suivante [5] :

$$\sigma^2{}_{détection,v} = \frac{(L_{fen}a^2)^2}{12} + (\tau Q)^2 \qquad \textbf{(V.2)}$$

où L_{fen} est la largeur de la fenêtre de détection qui est fixée à l'aide du logiciel d'acquisition, a est l'arête du canal, D est le débit de phase mobile et τ est la constante de temps du détecteur. Les contributions de τ (100 µs) et de D sur $\sigma^2_{détection,v}$ sont négligeables en microsystème. $\sigma^2_{détection,v}$ dépend donc seulement de L_{fen}.

La **figure V.4** montre l'évolution de S/N et de H mesurés sur la tyramine dérivée NDA en fonction de la largeur de la fenêtre de détection. Lorsque L_{fen} varie de 6 à 500 µm, le rapport signal/bruit passe de 5 à 45, ce qui correspond à une augmentation du signal de 16 à 37 mV et à une diminution du bruit de 4 à 0.8 mV. Pour des largeurs de fenêtre de détection plus grandes (de 500 à 1000 µm), le signal diminue de 37 à 23 mV tandis que le bruit reste constant à 0.8 mV, ce qui se traduit par une diminution de S/N de 45 à 33.

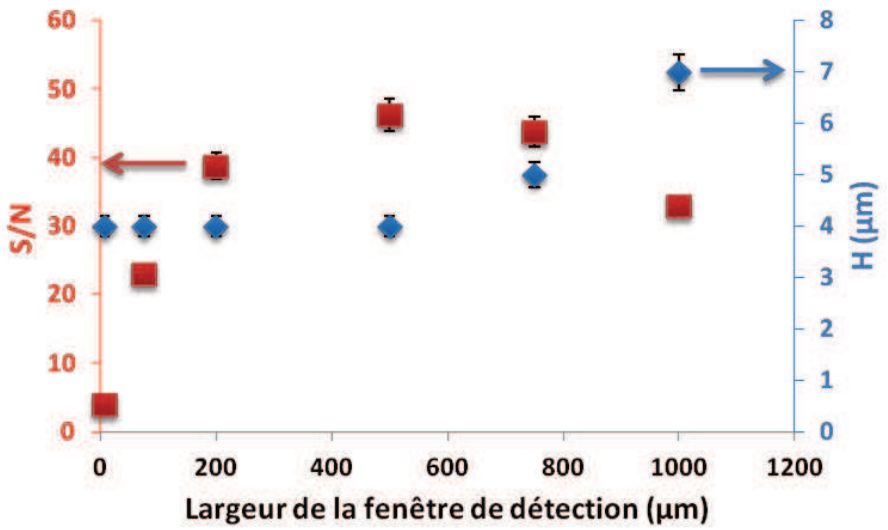


Figure V.4 : Evolution de S/N et de H mesurés sur la tyramine dérivée NDA en fonction de la largeur de la fenêtre de détection. Phase mobile : ACN/eau 70/30 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$. $E_{separation}$ = 620 V/cm. Injection : 5 s à 125 V/cm. Longueur de séparation : 7 cm. Soluté : tyramine à 120 µM.

La hauteur équivalente à un plateau théorique mesurée sur le pic de la tyramine dérivée NDA est de 4 µm pour L_{fen} comprise entre 6 et 500 µm, puis H passe de 4 à 7 µm lorsque L_{fen} varie de 500 à 1000 µm. Un élargissement du pic apparait donc pour des largeurs de fenêtre de détection supérieures à 500 µm.

En résumé, une fenêtre de détection de 500 µm de largeur permet d'obtenir à la fois une bonne sensibilité et une bonne efficacité. Cette valeur est utilisée dans la suite de l'étude.

V.2. Séparation de solutés sous forme neutre

L'utilité du microsystème en COC, dont les canaux sont remplis de monolithe HA/BDDA, est d'abord évaluée en séparant un mélange de quatre aflatoxines qui sont des solutés neutres. Le développement d'une méthode analytique simple, rapide et peu chère de ces composés toxiques est nécessaire car l'Union Européenne (UE) a réglementé leurs concentrations à quelques nanogrammes par gramme dans les produits agricoles comme par exemple les mais et les arachides [6]. En utilisant une phase hydro-organique contenant 70 % d'eau (%v), les quatre aflatoxines sont séparées en 1.7 minutes sur une longueur de séparation de 7 cm avec un nombre de plateaux théoriques moyen de 34 000 par mètre (**Figure V.5**). Leur ordre d'élution qui est G2, G1, B2 et B1, est identique à celui observé en chromatographie à polarités des phases inversées [7]. L'utilisation de 70 % d'eau (%v) dans la phase mobile est requise pour séparer la paire critique G1 et G2 (solutés 2 et 3). Un transfert de masse ralenti entre les phases stagnante et mobile lorsque l'éluant est très riche en eau, pourrait être une explication possible des faibles efficacités obtenues [8].

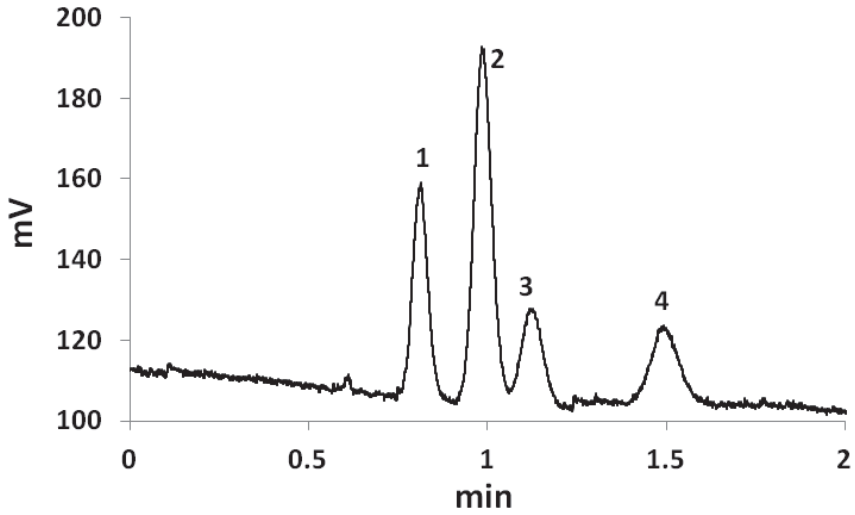


Figure V.5 : Séparation de quatre aflatoxines dans un canal rempli de monolithe HA/BDDA. Solutés (concentration injectée) : 1 = aflatoxine G2 (1.2 µM), 2 = aflatoxine G1 (2.3 µM), aflatoxine B2 (4.8 µM), 4 = aflatoxine B1 (23 µM). Phase mobile : ACN/eau 30:70 (v/v) + 2 mM $NH_4H_2PO_4$ + 5 mM LiDS. Longueur de séparation : 7 cm. 125 V/cm pendant 5 s. Grossissement ×10. Largeur de la fenêtre de détection : 500 µm.

Ce comportement est exacerbé dans le cas de l'ochratoxine A qui est aussi une mycotoxine nocive pour l'homme (comme les aflatoxines), présente dans les céréales et dans le café [9, 10]. La **figure V.6A** montre l'élution de l'ochratoxine A avec une phase mobile ACN/eau 30/70 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$. La hauteur équivalente à un plateau théorique sur cette mycotoxine neutre est de 67 µm (soit une efficacité de 15 000 plateaux/m). Avec une phase mobile ACN/eau 50/50 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$ (**Figure V.6B**), une augmentation très importante de l'efficacité est observée : H = 4 µm soit 250 000 plateaux/m. La différence d'efficacité d'un facteur 2 observée entre l'ochratoxine A (**Figure V.6A**) et les aflatoxines (**Figure V.5**) montre que l'élargissement du pic sur la colonne monolithique à base d'acrylate est aussi fortement dépendante du type et de la fonctionnalité des solutés [8, 10].

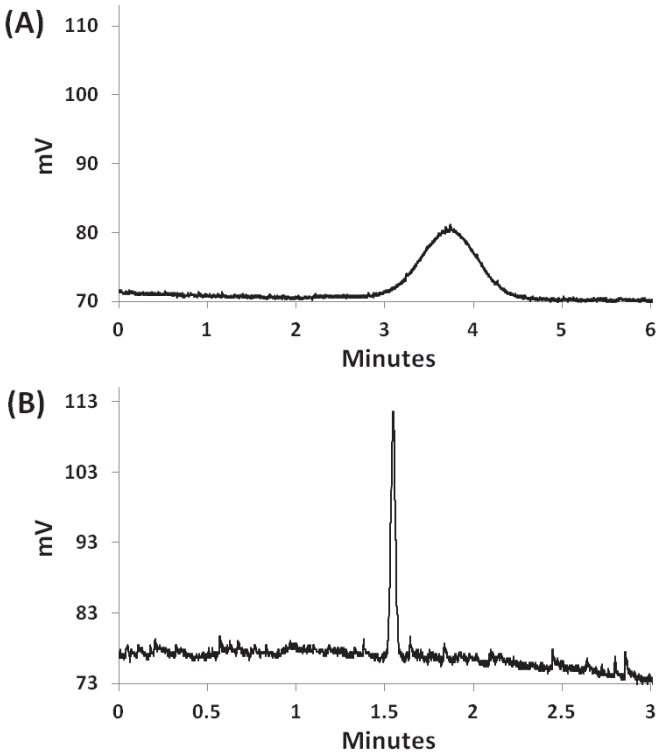


Figure V.6 : (A) Elution de l'ochratoxine A dans un canal rempli de monolithe HA/BDDA. $E_{separation}$ = 620 V/cm. Concentration injectée : 24 µM. Phase mobile : (A) ACN/eau 30/70 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$ et (B) ACN/eau 50/50 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$. Injection : 125 V/cm pendant 5 s. Longueur de séparation : 7 cm. Grossissement ×10. Largeur de la fenêtre de détection : 500 µm.

Les performances séparatives du microsystème en COC ont aussi été évaluées pour l'analyse des amines biogènes. Les amines biogènes sont des molécules qui proviennent du métabolisme de cellules vivantes, animales, végétales ou microbiennes et ce sont des substances physiologiquement actives qui exercent une fonction importante dans le corps. La plupart sont issues de la dégradation enzymatique du groupe acide (groupe carboxyle) des acides aminés (**Figure V.7**) dont le processus est appelé décarboxylation.

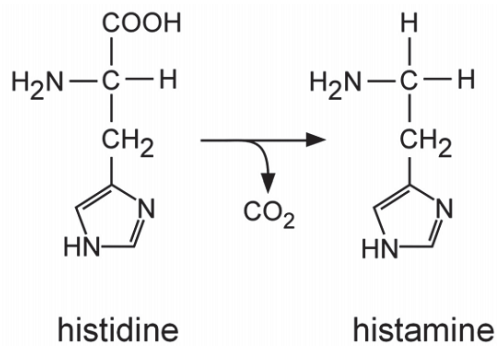


Figure V.7 : Formation d'histamine à partir de l'acide aminé histidine au travers de la dégradation enzymatique du groupe acide (décarboxylation).

La teneur potentielle en amines biogènes est alors dépendante de la teneur initiale en acides aminés. D'autres amines biogènes telles que la cadavérine et la putrescine sont, quant à elles, issues de la décomposition microbienne de tissus morts. Du point de vue de la toxicité alimentaire, ce sont surtout les intoxications à l'histamine (maux de tête, saignement de nez, rougeur de la peau, fatigue) et les crises d'hypertension provoquées par la tyramine qui sont significatives. Les aliments fermentés (fromages, saucisses, vins, bières, choucroute,…) et les denrées alimentaires contenant des protéines animales (poissons, viandes fraîches,…) ou végétales (bananes, noix, ananas,…) présentent souvent des concentrations élevées en amines biogènes.

La **figure V.8** montre la séparation de 5 amines biogènes dérivées NDA (histamine, tyramine, tryptamine, cadavérine et putrescine) obtenue avec une phase hydro-organique contenant 70 % d'ACN dont le pH est ajusté à 13 avec NaOH. Comme la réaction de dérivation des diamines (cadavérine and putrescine) n'est pas totale, le choix de pH 13 empêche la dissociation des fonctions amines primaires non dérivées (pKa = 10.2 – 10.8) et réduit les trainées de pics dues aux interactions électrostatiques pouvant s'établir entre les solutés et la phase stationnaire chargée négativement. Les efficacités obtenues sont satisfaisantes (moyenne de 125 000 plateaux/m).

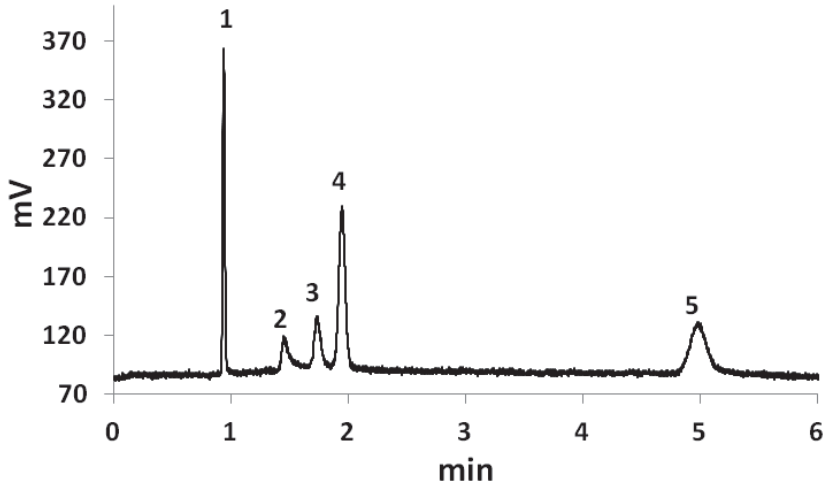


Figure V.8 : Séparation électrochromatographique de 5 amines biogènes dérivées NDA dans un canal rempli de monolithe HA/BDDA. $E_{separation}$ = 620 V/cm. Phase mobile : ACN/eau 70/30 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$ ajusté à pH 13 avec NaOH. Solutés : 1 = histamine, 2 = putrescine, 3 = cadaverine, 4 = tyramine, 5 = tryptamine. Concentration des solutés : 0.2 mM. Injection : 125 V/cm pendant 10 s. Longueur de séparation : 7 cm. Grossissement ×10. Largeur de la fenêtre de détection : 500 µm.

Enfin, l'évaluation des performances électrochromatographique du monolithe HA/BDDA en microsystème COC a été réalisée pour la séparation sous forme neutre des catécholamines. Ces molécules jouent un rôle fondamental dans le contrôle de l'humeur. Comme pour les amines biogènes, les fonctions amines primaires sont dérivées avec la NDA avant injection (protocole décrit dans V.1.1). La **figure V.9A** montre la séparation de 5 catécholamines dérivées NDA obtenue avec une phase mobile ACN/eau 70/30 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$ ajusté à pH 2 avec H_3PO_4. Les

efficacités obtenues sont de 150 000 plateaux/m. A cette valeur de pH, les catécholamines dérivées NDA sont sous forme neutre car la fonction catéchol, dont le pKa est de 6 – 7, n'est pas dissociée. Leur migration dans le monolithe HA/BDDA résulte uniquement d'un processus chromatographique. Afin d'améliorer la séparation de la paire 3 et 4 (pics de la dopamine et de la DHBA), une phase mobile ACN/eau 50/50 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$ pH 2 a été utilisée (**Figure V.9B**). Avec cette phase mobile moins éluante, la rétention des solutés augmente mais également les hauteurs équivalentes à un plateau théorique qui passent de 8 à 15 µm. Cette augmentation de H, déjà observée pour les mycotoxines, est certainement due à un gonflement de la phase stationnaire monolithique et à l'apparition de phase stagnante avec des pourcentages d'eau importants [8, 10]. Cette perte d'efficacité est néfaste à la séparation de la paire de solutés 3 et 4 malgré l'augmentation des rétentions.

L'acétonitrile a été remplacé par le méthanol dans le but d'améliorer la sélectivité entre les solutés. Cependant, l'utilisation de ce solvant organique n'est pas viable car une génération importante de bulles d'air se produit en sa présence. A l'heure actuelle, il est impossible d'expliquer ce phénomène.

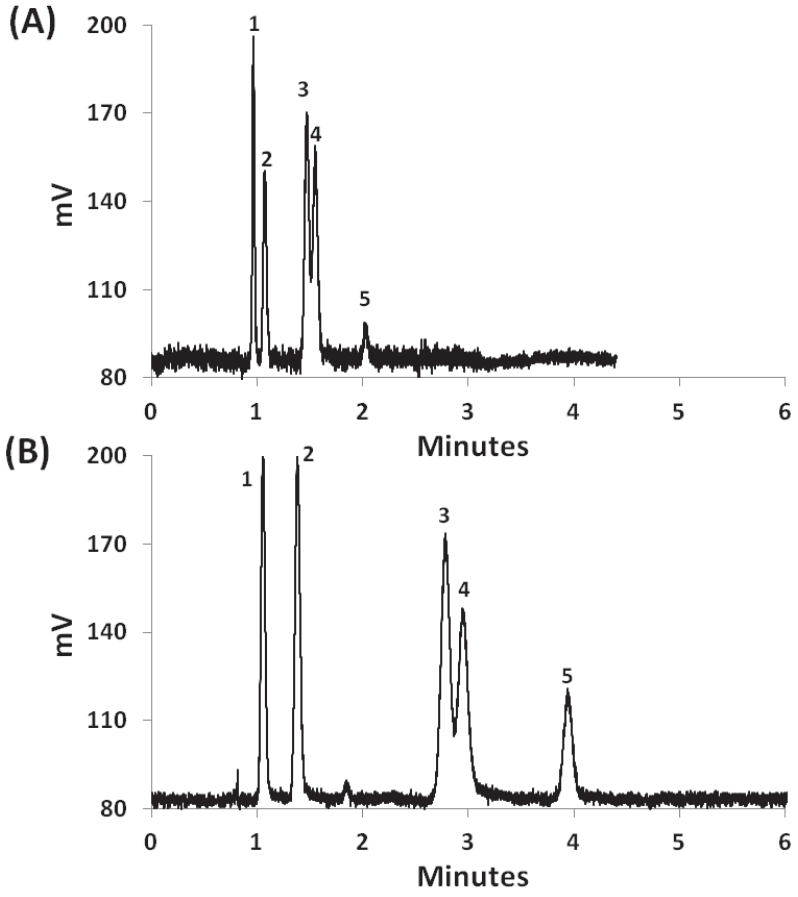


Figure V.9 : Séparations électrochromatographiques de 5 catécholamines dans un canal rempli de monolithe HA/BDDA à différentes compositions de phase mobile. $E_{separation}$ = 620 V/cm. Phase mobile : (A) ACN/eau 70/30 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$ ajusté à pH 2 avec H_3PO_4, (B) ACN/eau 50/50 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$ ajusté à pH 2 avec H_3PO_4. Solutés : 1 = L-dopa, 2 = noradrénaline, 3 = dopamine, 4 = DHBA et 5 = méthyldopa. Concentration des solutés : 0.2 mM. Injection : 125 V/cm pendant 5 s. Longueur de séparation : 7 cm. Grossissement ×10. Largeur de la fenêtre de détection : 500 µm.

En résumé, la séparation électrochromatographique de différentes familles de solutés sous forme neutre est donc possible sur le monolithe HA/BDDA en microsystème COC. Les efficacités obtenues sont de l'ordre de 150 000 plateaux/m pour des phases mobiles hydro-organiques riches en acétonitrile. Une dégradation importante de l'efficacité est observée lorsque des teneurs importantes (> 50 %) en eau sont présentes dans la phase mobile. Ce comportement caractéristique des monolithes acrylates hydrophobes complique la séparation des solutés polaires. Le développement d'un monolithe hydrophile en microsystème et la mise en œuvre de l'électrochromatographie en mode chromatographie d'interaction hydrophile (HILIC) [11, 12] faciliteraient peut-être la séparation de ces composés.

V.3. Séparation de solutés sous forme ionisée

Contrairement aux solutés neutres qui sont seulement séparés suivant leur partage chromatographique entre la phase stationnaire monolithique et la phase mobile, les solutés ionisés peuvent être séparés suivant à la fois leurs différences de mobilités électrophorétiques et leurs interactions avec la phase stationnaire. Le monolithe HA/BDDA en microsystème a été utilisé pour séparer un mélange de neurotransmetteurs composé de cinq acides aminés (arginine, sérine, glycine, acide glutamique et acide aspartique), du GABA (acide γ-aminobutyric) et de deux catécholamines (noradrénaline et dopamine). Les neurotransmetteurs sont des substances chimiques qui transmettent l'information d'une cellule nerveuse (neurone) à une autre en traversant la synapse qui est l'espace situé entre ces cellules. Ces neurotransmetteurs sont impliqués dans le contrôle du mouvement, de la posture et de l'humeur par l'intermédiaire de la dopamine et sont importantes pour l'attention, les émotions, le sommeil, le rêve et l'apprentissage par l'intermédiaire de la noradrénaline. La détermination de ces solutés présents dans le milieu extracellulaire cérébral, dans des échantillons obtenus in vivo chez l'animal de laboratoire (rat) par microdialyse, permet de comprendre les phénomènes neurobiologiques [13]. Les fonctions amines primaires des différents solutés sont dérivées avec la NDA avant injection (protocole décrit dans V.1.1).

La **figure V.10A** montre la séparation des 8 neurotransmetteurs obtenue sur le monolithe HA/BDDA à pH 4 en moins de 3.5 minutes sur une longueur de séparation de 7 cm. Les efficacités obtenues varient entre 100 000 et 330 000 plateaux/m, ceci indépendamment de la taille, la rétention et la charge du soluté. Différentes gammes de pH allant de pH 2 à pH 13 ont été testées et il a été observé que pH 4 donnait la plus grande sélectivité. A cette valeur de pH, les catécholamines dérivées NDA sont neutres car le pKa de la fonction catéchol est de 6 – 7. Leur migration dans le monolithe HA/BDDA résulte totalement du processus chromatographique. La fonction acide carboxylique des acides α-aminés est presque totalement dissociée (pKa = 2.1 - 2.4). Les acides aminés tels que la serine, la glycine, l'acide glutamique et l'acide aspartique sont donc anioniques et leurs migrations résultent de la combinaison des processus électrophorétique et chromatographique. Comme le pKa de la fonction acide carboxylique du GABA est de 4.2 et que l'électrolyte n'est pas tamponné, une

attention spéciale doit être portée à la préparation de la phase mobile pour assurer la reproductibilité de la migration du GABA. Le pKa du groupe guanidinium de l'arginine étant de 12.5, l'arginine dérivée NDA est chargée à la fois positivement et négativement, mais est globalement neutre. Cependant, à cause de son caractère fortement polaire, elle est peu retenue par le monolithe HA/BDDA. Avec une mobilité électrophorétique nulle et une rétention chromatographique faible, l'arginine dérivée NDA migre quasiment avec le flux électroosmotique. Bien que beaucoup de solutés soient porteurs de charges, le processus chromatographique, par l'intermédiaire des interactions des solutés avec le monolithe, joue un rôle majeur dans la séparation des huit neurotransmetteurs. En effet, la **figure V.10B** montre qu'avec la même phase mobile, il n'y a pas de séparation dans un canal vide. Le mécanisme électrophorétique n'est donc pas suffisant pour séparer les analytes chargés. L'électrochromatographie offre ici la possibilité de combiner simultanément la séparation de solutés neutres et chargés avec de grandes sélectivités.

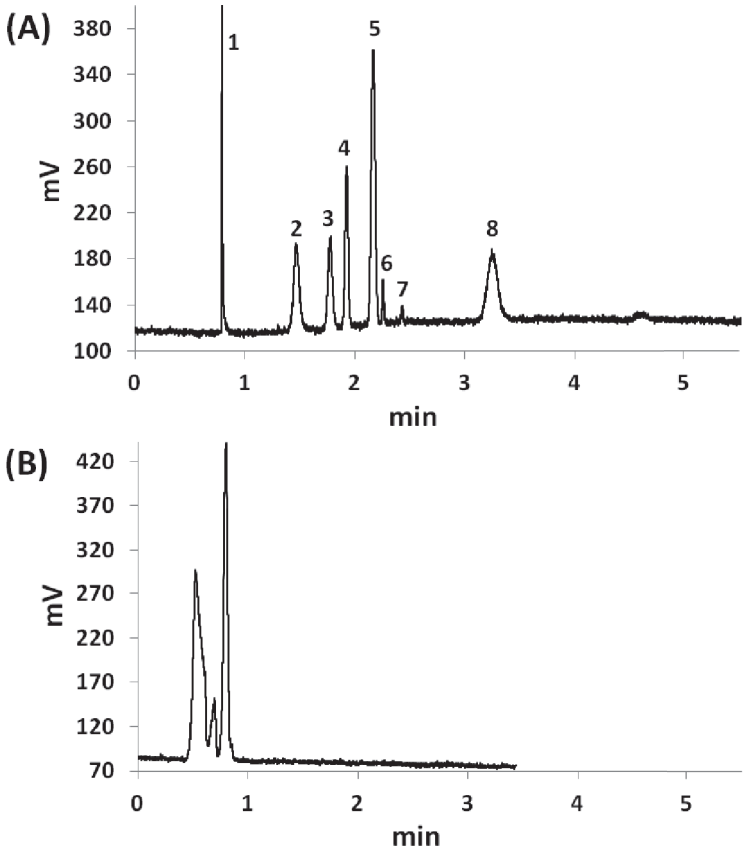


Figure V.10 : Séparations de 8 neurotransmetteurs dans (A) un canal rempli de monolithe HA/BDDA et (B) un canal vide. $E_{separation}$ = 620 V/cm. Phase mobile : ACN/eau 50/50 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$, pH ajusté à 4 avec H_3PO_4. Solutés 1 = arginine, 2 = noradrénaline, 3 = GABA, 4 = sérine, 5 = glycine, 6 = acide glutamique, 7 = acide aspartique, 8 = dopamine. Concentration des solutés injectés : 120 µM. Injection : 125 V/cm pendant 10 s. Longueur de séparation : 7 cm. Grossissement ×10. Largeur de la fenêtre de détection : 500 µm.

Enfin, en vue de l'utilisation du microsystème en COC contenant le monolithe HA/BDDA pour la détermination des teneurs en amines biogènes présents dans les vins, une évaluation de la capacité de la phase stationnaire à séparer les amines biogènes et les acides aminés a été réalisée. La séparation de deux amines biogènes (histamine et tyramine) et de trois acides aminés (histidine, sérine et glycine) a été obtenue avec une phase mobile ACN/eau 70/30 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM tampon borate pH 9 (**Figure V.11**). A ce pH, les acides aminés dérivés NDA sont chargés négativement (pKa α-COOH ≈ 2.3) et leurs rétentions résultent de la combinaison des interactions hydrophobes avec le monolithe et des interactions électrostatiques (forces répulsives) avec les charges négatives de la phase stationnaire monolithique. Ces solutés anioniques sont également repoussés par la cathode et leurs migrations résultent aussi du processus électrophorétique. Les amines biogènes sont quant à elles sous forme neutre et leurs rétentions résultent donc uniquement de leurs interactions hydrophobes avec le monolithe (chromatographie). Ces différences de comportement expliquent le fait que les amines biogènes sortent les premières et les acides aminés, fortement retardés, sortent les derniers. Les efficacités obtenues sont de l'ordre de 150 000 plateaux/m.

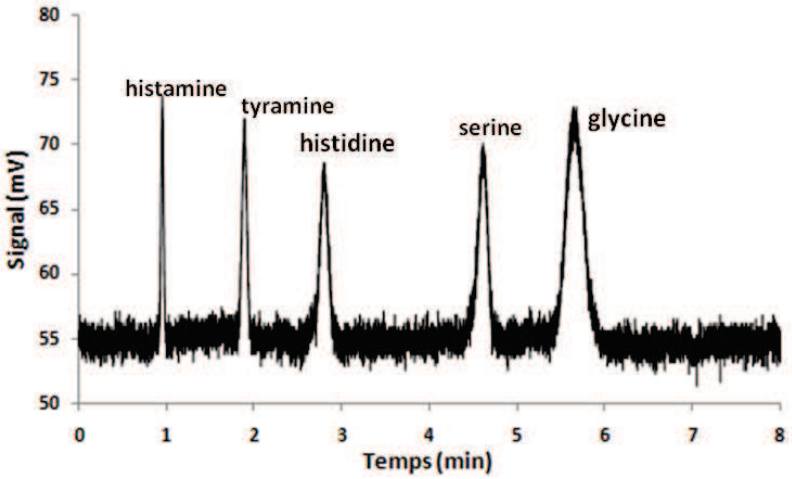


Figure V.11 : Séparation électrochromatographique de 2 amines biogènes et 3 acides aminés dans un canal rempli de monolithe HA/BDDA. $E_{separation}$ = 620 V/cm. Phase mobile ACN/eau 70/30 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM tampon borate pH = 9. Concentration des solutés injectés : 0.2 mM. Injection : 125 V/cm pendant 5 s. Longueur de séparation : 7 cm. Grossissement ×10. Largeur de la fenêtre de détection : 500 µm.

V.4. Préconcentration

Dans le but d'obtenir des limites de détection satisfaisantes pour permettre l'analyse d'échantillons réels, la mise en place d'une étape de préconcentration en tête de canal de séparation doit être mise en œuvre. C'est avec cet objectif que l'effet de la teneur en eau de la matrice contenant l'échantillon sur l'étendue du phénomène de préconcentration a d'abord été étudié pour un soluté modèle qui est la tyramine dérivée NDA (**Figure V.12**). Les variations de la hauteur du pic en fonction de l'aire du pic corrigée (aire du pic divisée par le temps de migration) obtenues pour différents temps d'injection

ont été tracées dans différents cas : (1) la matrice contenant l'échantillon est de même composition que la phase mobile (**Figure V.12A**) et (2) la matrice contenant l'échantillon est moins éluante que la phase mobile (**Figure V.12B**). Quand le solvant contenant l'échantillon est de même composition que la phase mobile (70 % ACN (%v)), la variation de la hauteur du pic est linéaire jusqu'à un temps d'injection de 10 secondes. Pour des temps d'injection plus grands, la hauteur du pic tend vers un plateau, ce qui traduit un élargissement du pic provoqué par un volume injecté trop important. Un temps d'injection de 10 secondes permet d'atteindre la sensibilité maximale quand l'échantillon est solubilisé dans la phase mobile. Dans ces conditions d'injection, la hauteur du pic est égale à 170 mV. Quand la matrice contenant l'échantillon est moins éluante que la phase mobile (30 % ACN (%v)), la variation de la hauteur du pic est linéaire jusqu'à un temps d'injection de 400 secondes. Ceci montre qu'il n'y a pas de phénomène de surcharge en volume dans cette gamme de temps d'injection. En injectant l'échantillon solubilisé dans une matrice peu éluante (30 % ACN (%v) pendant 400 secondes, la hauteur du pic atteint 5820 mV, ce qui correspond à une sensibilité 34 fois plus importante que celle obtenue avec un échantillon solubilisé dans la phase mobile. Pour des temps d'injection supérieurs à 400 secondes, la courbe dévie notablement de la linéarité jusqu'à un temps d'injection de 900 s (qui est le plus grand temps d'injection testé dans cette étude).

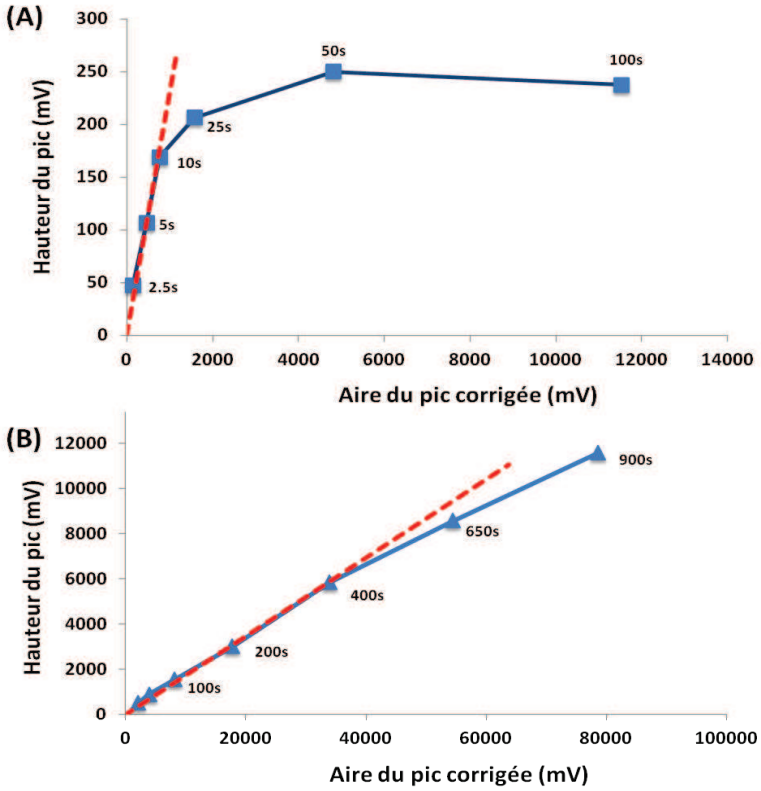


Figure V.12 : Préconcentration de la tyramine dérivée NDA dans un canal rempli de monolithe HA/BDDA : variation de la hauteur du pic en fonction de l'aire du pic corrigée (la valeur placée près de chaque point expérimental correspond au temps d'injection). Matrice contenant l'échantillon : (A) ACN/eau 70/30 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$ - pH 13, (B) ACN/eau 30/70 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$ - pH 13. Phase mobile : ACN/eau 70/30 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$ - pH 13. Concentration du soluté injecté : 2 µM. Injection à 125 V/cm. Longueur de séparation : 3.5 cm. Grossissement ×10. Largeur de la fenêtre de détection : 500 µm.

La même étude a été réalisée avec le fluoranthène comme soluté test (**Figure V.13**). La **figure V.13A** montre que la hauteur du pic du fluoranthène n'augmente pas avec le temps d'injection quand la matrice contenant l'échantillon est de même composition que la phase mobile. Comme ce comportement n'était pas observé pour un soluté plus polaire tel que la tyramine (**Figure V.12A**), nous avons supposé que ce phénomène pouvait provenir de l'hydrophobicité du fluoranthène et de la possible adsorption du fluoranthène sur les parois internes des canaux en COC. Afin de vérifier cette hypothèse, une étude similaire a été réalisée avec un microsystème en COC dont les canaux ont été modifiés chimiquement par le monomère PEGMA à 0.1 M avant la synthèse *in-situ* du monolithe HA/BDDA (protocole décrit en V.1.1). Il a été vérifié expérimentalement que la modification chimique des parois n'avait pas d'impact sur les performances électrochromatographiques (H, k_i et μ_{eo}) (section IV.3.3). Les résultats obtenus sur le monolitthe HA/BDDA dans des canaux fonctionnalisés PEGMA sont en accord avec nos hypothèses (**Figure V.13B**) : Il y a une gamme de temps d'injection (jusqu'à 40 secondes) où la hauteur du pic augmente proportionnellement avec l'aire du pic, ce qui indique qu'il n'y a pas d'élargissement du pic. Pour un temps d'injection de 40 secondes, la hauteur du pic est égale à 0.43 mV. La modification de surface du COC par un monomère hydrophile permet également l'application d'une très longue étape de préconcentration quand la matrice contenant l'échantillon a une plus faible force éluante que la phase mobile. La **figure V.13C** montre que la variation de la hauteur du pic est fonction de l'aire du pic corrigée quand le fluoranthène est injecté dans une phase de solubilisation contenant 30 % ACN (%v) et élué avec une phase mobile contenant 70% ACN (%v). La gamme de temps d'injection étudiée est très large, allant jusqu'à 16 200 secondes (soit 4.5 heures) avec aucun élargissement de pic observé. Pour un temps d'injection de 16 200 secondes, la hauteur du pic du fluoranthène est égale à 57 mV, ce qui correspond à une augmentation de la sensibilité d'un facteur 133 par rapport à l'injection de fluoranthène solubilisé dans la phase mobile.

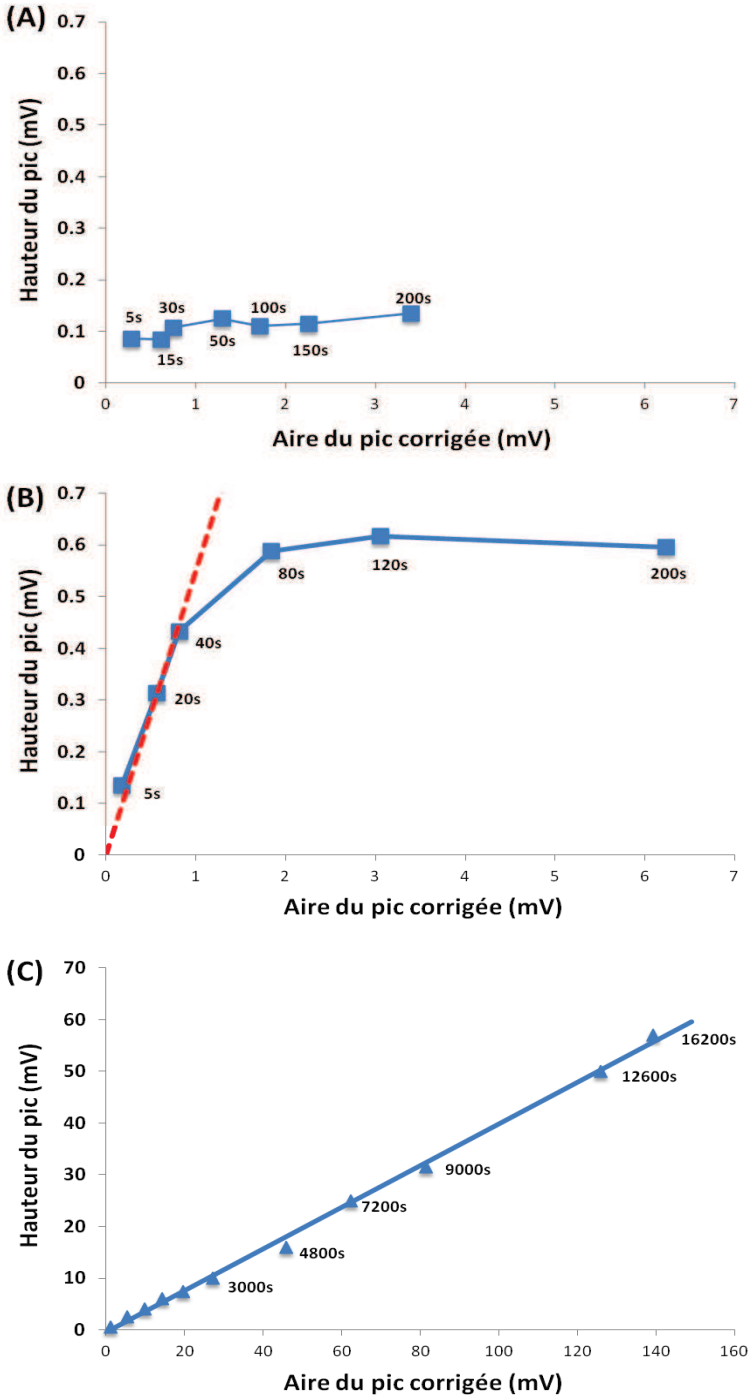


Figure V.13 : Préconcentration du fluoranthène dans (A) un canal en COC rempli de monolithe HA/BDDA et (B,C) dans un canal en COC fonctionnalisé PEGMA rempli de monolithe HA/BDDA : variation de la hauteur du pic en fonction de l'aire du pic corrigée (la valeur placée près de chaque point expérimental correspond au temps d'injection). Matrice contenant l'échantillon : (A, B) ACN/eau 70/30 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$, (C) ACN/eau 30/70 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$. Phase mobile : ACN/eau 70/30 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$. Concentration du soluté injecté : 1 ppb. Injection à 125 V/cm. Longueur de séparation : 3.5 cm. Grossissement ×10. Largeur de la fenêtre de détection : 500 µm.

La **figure V.14** présente un électrochromatogramme obtenu pour la séparation de trois HAP en utilisant les conditions définies précédemment, à savoir une phase mobile contenant 70 % d'ACN (%v), une matrice d'échantillon contenant 30 % d'ACN (%v) et un temps d'injection de 16 200

secondes. Malgré cette très longue étape de préconcentration, la séparation électrochromatographique des trois HAP est encore satisfaisante. Les efficacités variant de 100 000 à 125 000 plateaux/m restent élevées même si elles sont plus faibles par rapport à une injection normale de 5 secondes (200 000 – 250 000 plateaux/m). Grâce à cette étape de préconcentration, des faibles teneurs en HAP peuvent être détectées. Les rapports signal/bruit obtenus pour l'anthracène, le fluoranthène et le pyrène injectés à 3.5, 0.5 et 15 ppb sont de 11.5, 3.8 et 2.0, respectivement.

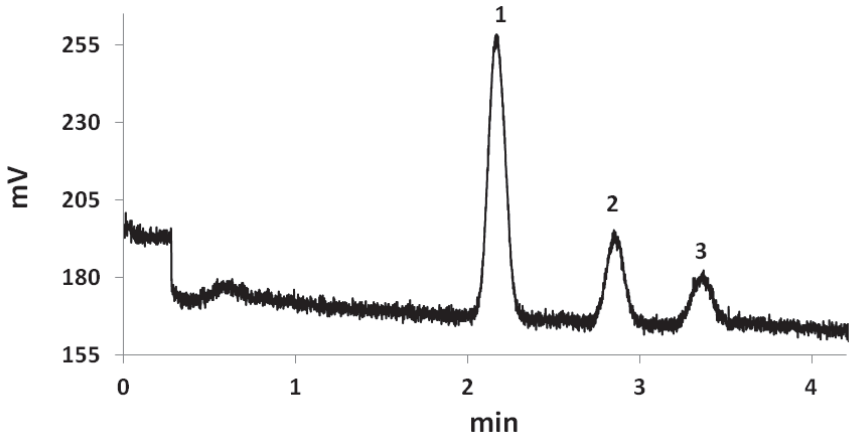


Figure V.14 : Préconcentration et séparation de 3 HAP dans un canal COC fonctionnalisé PEGMA rempli de monolithe HA/BDDA. Solutés (concentration injectée) : 1 = anthracène (3.5 ppb), 2 = fluoranthène (0.5 ppb), 3 = pyrène (15 ppb). Phase mobile : ACN/eau 70/30 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$. Matrice contenant l'échantillon : ACN/eau 30/70 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$. Injection à 125 V/cm pendant 16 200 s (4.5 heures). Longueur de séparation : 3.5 cm. Grossissement ×10. Largeur de la fenêtre de détection : 500 µm.

En résumé, le microsystème en COC rempli de monolithe HA/BDDA est adaptable à la préconcentration et à la séparation d'une large gamme de solutés (apolaires, polaires, neutres, chargés). Il est maintenant possible d'envisager l'utilisation du dispositif pour l'analyse d'échantillons réels.

V.5. Analyse d'échantillons réels : les vins

Les performances du monolithe HA/BDDA en microsystème ont été évaluées pour la détermination des amines biogènes dans les vins. A l'heure actuelle, il n'y a pas de réglementation nationale ou européenne fixant la concentration en amines biogènes à ne pas dépasser. Cependant, aux Pays-Bas, des vins contenant 5 mg/L d'histamine ont été refusés par des importateurs et, en Suisse, une valeur limite de 10 mg/L en histamine a été fixée [14]. Les amines biogènes pouvant provoquer des allergies chez des personnes sensibles, leur formation doit être contrôlée durant la fabrication du vin [15-17]. Un dispositif analytique portable en verre a déjà été utilisé pour contrôler leurs concentrations durant le processus de fermentation [18]. Nous montrons dans cette section que le microsystème en

COC rempli de monolithe HA/BDDA peut être utilisé pour la détermination des teneurs en histamine et tyramine du vin.

Pour repérer les pics correspondant aux solutés d'intérêt et estimer la concentration de ces solutés, on met en œuvre la méthode des ajouts dosés sur un seul point de calibration. Ce procédé repose sur la comparaison de deux électrochromatogrammes. Le premier correspond à l'injection de l'échantillon à doser où les solutés d'intérêt se trouvent à la concentration inconnue $C_{i,ech}$. Soit $A_{i,ech}$ l'aire du pic correspondant au soluté d'intérêt i dans cet électrochromatogramme. Le second électrochromatogramme coorespond à l'injection de l'échantillon à doser préalablement dopé avec la concentration connue $C_{i,dop}$ en soluté d'intérêt i. Soit $A_{i,dop}$ l'aire du pic du soluté i dans ce second électrochromatogramme. Si aucune condition n'a été modifiée entre les deux opérations, on a la relation suivante :

$$\frac{C_{i,ech}}{C_{i,ech}+C_{i,dop}} = \frac{A_{i,ech}}{A_{i,dop}} \qquad \textbf{(V.3)}$$

d'où :

$$c_{i,ech} = \frac{C_{i,dop}}{\left(\frac{A_{i,dop}}{A_{i,ech}} - 1\right)} \qquad \textbf{(V.4)}$$

Les **figures V.15A** et **15B** montrent les deux électrochromatogrammes représentatifs permettant de déterminer les teneurs en histamine et en tyramine présentes dans un vin rouge (Saint Joseph, 2009) par la méthode de quantification décrite au travers de la relation **V.4**. La séparation des solutés d'intérêt de la matrice est obtenue en utilisant une phase mobile hydro-organique contenant 60 % d'ACN (%v). Par comparaison des électrochromatogrammes obtenus pour le vin rouge non dopé (**Figure V.15A**) et le vin rouge dopé avec 1.3 mg/L d'histamine et 1.9 mg/L de tyramine (**Figure V.15B**), les teneurs en histamine et en tyramine dans le vin rouge analysé sont estimées respectivement à 0.2 ± 0.02 et 0.2 ± 0.03 mg/L. Les incertitudes sont calculées à partir de CV observés sur les aires des pics pour 5 injections successives Pour confirmer cette mesure, la **figure V.15C** montre l'injection d'un mélange de standards contenant l'histamine et la tyramine respectivement à la concentration de 1.3 mg/L et 1.9 mg/L. La comparaison des aires des pics dans cet électrochromatogramme à celles observées sur la **figure V.15A**, confirme les teneurs trouvées précédemment en amines biogènes dans le vin rouge. Cette confirmation par étalonnage externe des résultats déterminés par ajouts dosé n'est pas systématiquement appliquée.

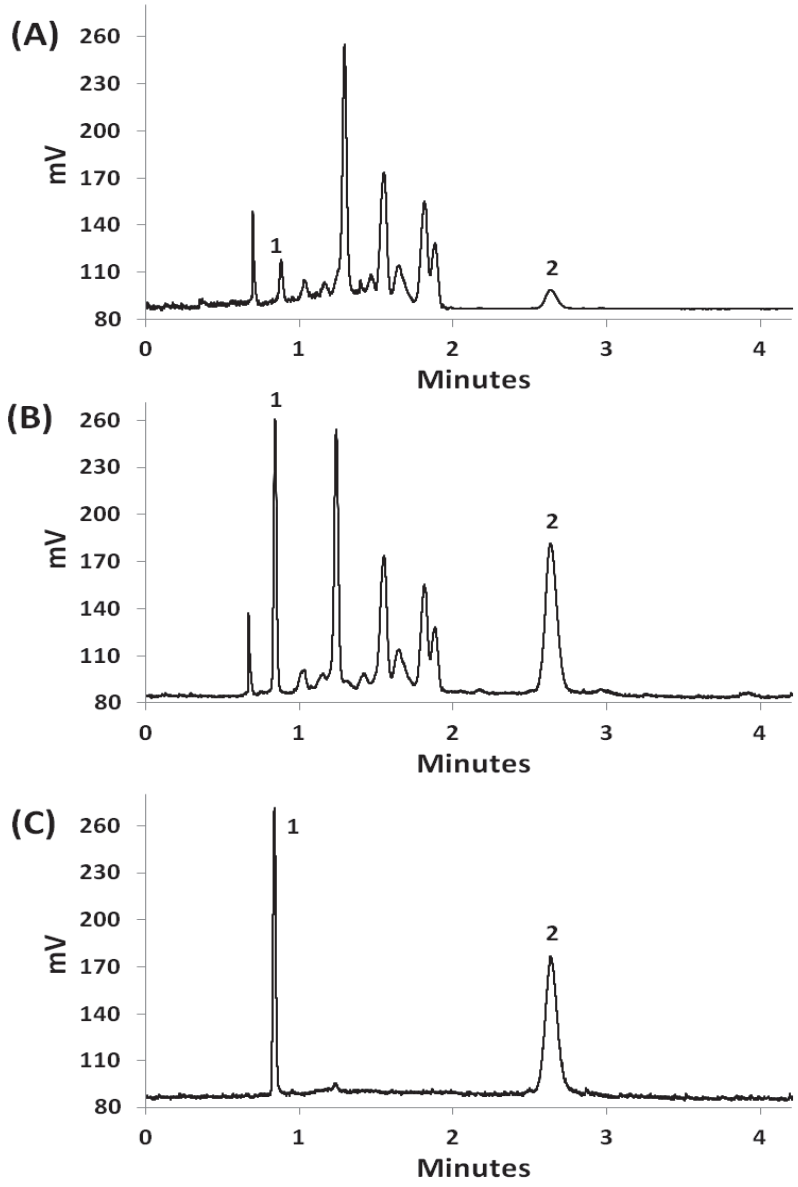


Figure V.15 : Analyse des amines biogènes dérivées NDA : (A) vin rouge non dopé et (B) vin rouge dopé avec 1.3 mg/L d'histamine et 1.9 mg/L de tyramine. (C) mélange de standards avec 1.3 mg/L d'histamine et 1.9 mg/L de tyramine. Solutés : 1 = histamine, 2 = tyramine. Phase mobile : ACN/eau 60/40 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$ ajusté à pH 13 avec NaOH. Injection à 125 V/cm pendant 20 s. Longueur de séparation : 3.5 cm. Grossissement ×10. Largeur de la fenêtre de détection : 500 µm.

La **figure V.16** montre l'exemple de la "Villageoise", qui est un vin bon marché utilisé pour la préparation des plats cuisinés. Les concentrations en histamine et en tyramine sont plus élevées et égales respectivement à 0.7 ± 0.04 mg/L et 0.5 ± 0.02 mg/L.

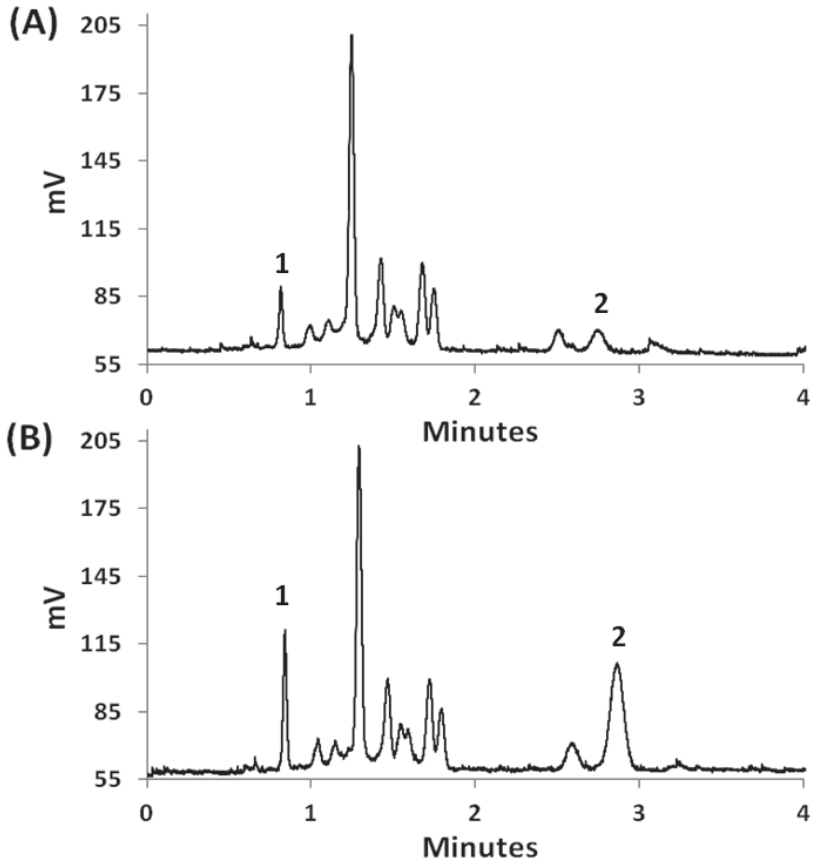


Figure V.16 : Analyse des amines biogènes dérivées NDA : (A) Villageoise non dopé et (B) Villageoise dopé avec 1.3 mg/L d'histamine et 1.9 mg/L de tyramine. Solutés : 1 = histamine, 2 = tyramine. Phase mobile : ACN/eau 60/40 (%v) + 5 mM LiDS + 2 mM $NH_4H_2PO_4$ ajusté à pH 13 avec NaOH. Injection à 125 V/cm pendant 20 s. Longueur de séparation : 3.5 cm. Grossissement ×10. Largeur de la fenêtre de détection : 500 µm. Solutés : 1 = histamine, 2 = tyramine.

La méthode a été appliquée à 14 vins différents et à 4 boissons alcoolisées (cidre, champagne, vinaigre et digestif) en utilisant un seul et unique microsystème. Les concentrations trouvées en amines biogènes sont résumées dans le **tableau V.1**. Les concentrations en histamine et tyramine ne sont pas déterminées (ND) quand elles sont inférieures à la limite de quantification. Cette limite qui correspond à un rapport signal/bruit égal à 10, est estimée à 0.05 mg/L pour l'histamine et à 0.1 mg/L pour la tyramine.

Tableau V.1 : Concentrations en histamine et en tyramine présentes dans 14 vins et 4 boissons alcoolisées.

Boisson alcoolisée	Genre	Année	Histamine (mg/L)	Tyramine (mg/L)
Médoc	vin rouge	2012	0.6 ± 0.03	0.4 ± 0.02
Graves	vin rouge	2009	0.3 ± 0.01	ND
Saint-Joseph	vin rouge	2009	0.2 ± 0.02	0.2 ± 0.02
La Villageoise	vin rouge	2012	0.7 ± 0.04	0.5 ± 0.02
Cahors	vin rouge	2009	ND	ND
Bourgogne	vin rouge	2010	0.6 ± 0.03	ND
Merlot	vin rouge	2009	1.2 ± 0.06	0.5 ± 0.02
Vin italien	vin rouge	2009	0.3 ± 0.01	0.2 ± 0.01
Condrieu	vin blanc	2012	0.2 ± 0.01	ND
Sauvignon	vin blanc	2009	ND	ND
Sancerre	vin blanc	2012	ND	0.4 ± 0.03
Le Petit Caboulot	vin blanc	2012	0.4 ± 0.02	0.6 ± 0.03
Côtes de Provence	vin rosé	2010	0.1 ± 0.01	ND
Gewurträminer	vin blanc	2009	0.3 ± 0.01	0.3 ± 0.01
Reflets de France	cidre doux	2010	0.1 ± 0.01	ND
Vinaigre maison K. Faure	vinaigre	2012	0.25 ± 0.02	ND
Mei kuei lu chew	digestif	2010	ND	ND
Champagne Thibault Desbois	champagne brut	2009	0.3 ± 0.01	0.2 ± 0.01

ND : concentration non déterminée

Les concentrations trouvées en amines biogènes dans tous ces vins et boissons alcoolisées sont nettement inférieures à 5 mg/L, ce qui indique que ces échantillons réels ne présentent pas de risque pour l'homme.

La robustesse du monolithe HA/BDDA synthétisé en microsystème a clairement été confirmée au cours de ces expériences. En effet, le vin qui est un mélange complexe contenant des particules, tanins et colorants, a été injecté sans filtration dans le microsystème. De plus, comme aucun prétraitement n'a été appliqué, la réaction de dérivation spécifique aux amines primaires mènent à

de nombreuses espèces fluorescentes (acides aminés, amines biogènes, …). Les électrochromatogrammes obtenus qui contiennent de nombreux pics, sont reproductibles puisque des CV de 5 % sur les facteurs de rétention, de 8 % sur la mobilité électroosmotique et de 4 % sur les efficacités électrochromatographiques ont été observés sur 10 injections successives. Plus de 200 injections de ces matrices réelles dans un seul microsystème ont été réalisées, ce qui témoigne de la grande longévité de notre système analytique miniaturisé. Cependant, il est nécessaire de développer des méthodes de validation afin de s'assurer que l'outil analytique est parfaitement adapté à l'analyse quantitative de matrices réelles.

V.6. Conclusion

Ce chapitre V a montré que le monolithe HA/BDDA implanté dans un microsystème en COC est adapté aux séparations électrochromatographiques de plusieurs familles de solutés d'intérêt tels que les amines biogènes, les catécholamines, les mycotoxines et les neurotransmetteurs. Cependant, les efficacités varient assez largement suivant la composition de la phase mobile. Dans le but d'accroître le rapport signal/bruit S/N, une étape de préconcentration en ligne peut être mise en place. Pour préconcentrer des solutés apolaires, une modification chimique de la surface du COC par un monomère hydrophile (PEGMA) est nécessaire.

Enfin, les séparations électrochromatographiques de 18 matrices réelles issues de boissons alcoolisées (vin, champagne, digestif, cidre) ont été réalisées avec le microsystème. Les performances séparatives très satisfaisantes, avec des efficacités de l'ordre de 125 000 plateaux/m, ont permis de contrôler les concentrations en amines biogènes (histamine et tyramine) susceptibles d'être dangereuses pour l'homme à des taux de l'ordre de quelques mg/L. Une partie des résultats exposés dans ce chapitre a fait l'objet d'une publication (voir article 4 joint dans la section V.7).

V.7. Article 4 : Electrochromatography on acrylate-based monolith in cyclic olefin copolymer microchip : a cost-effective and easy-to-use technology

Article soumis à
Electrophoresis

Cite this: DOI:

Manuscript

Electrochromatography on acrylate-based monolith in cyclic olefin copolymer microchip : a cost-effective and easy-to-use technologyThis is the title

Y. Ladner, G. Crétier, K. Faure

Received 19th June 2012

This paper shows that there is great interest in using an electrochromatographic microchip made of hexyl acrylate (HA)-based porous monolith cast within the channel of a cyclic olefin copolymer (COC) device. The monolith is simultaneously in-situ synthesized and anchored to the inner walls of the channel in less than 10 min. By appropriate choice of light intensity used during the synthesis, the separation efficiency obtained for non-polar solutes such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) is increased up to 250000 plates/m. The performance of this HA-filled COC microchip was investigated for a wide range of analytes of varying nature. The reversed-phase separation of four aflatoxins is obtained in less than 2 min. The baseline separation of a mixture of neurotransmitters including six amino acids and two catecholamines is possible thanks to the superimposition of the differences in electrophoretic mobility on the chromatographic process. The durability of the system at pH 13 allows the separation of five biogenic amines and the quantitative determination of two of them in numerous wine samples. The feasibility of on-line preconcentration was also demonstrated. Hydrophilic surface modification of COC channel via UV-photografting with poly(ethylene glycol) methacrylate (PEGMA) before in-situ synthesis of HA, is necessary to reduce the adsorption of very hydrophobic solutes such as PAH during enrichment. The detection limit of fluoranthene is decreased down to less than 1 ppb with a preconcentration of 4.5 hours on the HA-filled PEGMA functionalized COC microchip.

Keywords

Electrochromatography / Acrylate-based monolith / COC microchip / Preconcentration

Abbreviations

AMPS, 2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid; BDDA, 1,3-butanediol diacrylate; BME, benzoin methyl ether; COC, cyclic olefin copolymer; HA, hexyl acrylate; NDA, naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde; PEGMA, poly(ethyleneglycol) methacrylate

1. Introduction

As the field of micro-total analysis systems (µTAS) develops, the use of electroosmotic flow (EOF) to control fluid transport across the microfluidic device and the dominance of electrokinetic techniques in separations on microchips are general trends. From an engineering point of view, the application of a voltage across the separation device is much easier than the application of a pressure difference. So, zone electrophoresis (ZE) and micellar electrokinetic chromatography (MEKC) are the major separation modes commonly implemented in microchips. The main interest of MEKC is the efficient separation of both ionisable and neutral compounds. These techniques are performed in an open channel and the separation conditions can be changed in a simple and cost-effective manner i.e. by changing the electrolyte composition. However, the performances of these devices can be affected by hydrodynamic flows resulting from hydrostatic pressure generated by the liquid level difference between the reservoirs. The control of this problem is often difficult with the portable systems used for on-site analysis.

Electrochromatography (EC) on a porous monolithic stationary phase prepared within the channels of the microsystem is an attractive alternative for on-chip separations. It combines the separation mechanisms of electrophoresis (differences in electrophoretic mobility for ionized analytes) and liquid chromatography (differences in specific interactions with the stationary phase for all solutes). The synthesis of the monolithic chromatographic bed is generally easy and rapid via free radical photopolymerisation. A wide variety of monomers is available to adjust the chemistry of the stationary phase to the targeted selectivity. The presence of the porous bed within the separation channel limits or even suppresses the flow effects consequent to a possible hydrostatic pressure in field portable devices.

Most electrochromatographic microchips filled with polymer monolith were composed of quartz or glass and were fabricated using a variety of expensive techniques (wet and dry etching, photolithography, electron beam lithography) which are borrowed from electronic industry and often require clean-room facilities. Because of the high cost of both the material and the

production process, these devices are not disposable. Generally, the acrylate-based porous polymer monoliths cast in these glass chips shows very good chromatographic performances. High efficiencies were obtained for the separation of, on the one hand, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) (200000 plates/m on average) [1], on the other hand, amino acids and bioactive peptides labelled with naphthalene-2,3-dicarboaldehyde (NDA) for fluorescence detection (up to 600000 plates/m) [2, 3]. It was also demonstrated that, by direct injection on the head of the stationary phase, these micro-systems can preconcentrate a wide variety of compounds and interesting signal enhancement factors can be achieved without decrease in efficiency [4, 5]. Implementation of controlled gradient elution conditions is possible for the separation of complex samples such as protein digests [6].

Thermoplastic materials such as cyclic olefin copolymer (COC) allow the fabrication of cost-effective and solvent-resistant devices. With these inexpensive materials, fast prototyping of new devices is possible by classical micromachining steps (milling, drilling, turning). Inexpensive and rapid technologies such as hot embossing and injection molding can be used to mass produced microsystems which could be single-used to eliminate the cross-contamination and sample carryover problems arising from multiple uses of the same system. Some studies deal with the development of COC electrochromatographic microchips using photopatterned acrylate-based monolithic stationary phases [7-10]. We showed that wall ruggedness was sufficient to hold a non-anchored monolith in a COC device used in EC without pressure, but separation efficiency remains poor (about 70000 plates/m) [7]. Anchoring of acrylate monolith inside the COC microchip channel performed by either UV-grafting before monolith synthesis (two-steps method) [8] or increasing the photoinitiator concentration in the polymerization mixture (one-step method) [9], allows improvement of electrochromatographic efficiency (up to 120000 plates/m). The achievement of efficiencies as high as the ones obtained in glass microchips for neutral solutes (200000 plates/m for PAH for example) requires the optimization of light intensity during photopolymerization [10].

The present paper illustrates the simplicity with which a COC electrochromatographic microchip can be used. The hexyl acrylate (HA)-based stationary phase is in situ photo-polymerized within a few minutes. Its robustness over a large range of mobile phase compositions and pH values allows various separations. The micro-system is shown to withstand a large number of injections of real samples such as wines. The possibility of performing preconcentration on the column head is evaluated for analytes of different hydrophobicities. This study demonstrates that the hydrophilic surface modification of COC channel walls is needed to preconcentrate non-polar solutes. The functionalization of native COC is then performed by photo-grafting with poly(ethylene glycol) methacrylate (PEGMA) before the in situ synthesis of HA-based monolith.

Each of these features has already been studied in glass chip but is here, to the best of our knowledge, presented for the first time in COC chip.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals, real samples and materials

Hexyl acrylate (HA), poly(ethyleneglycol) methacrylate (PEGMA), 1,3-butanediol diacrylate (BDDA), 2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid (AMPS) and benzoin methyl ether (BME) were obtained from Acros Organics (France). Naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde (NDA), acetone, ammonium phosphate (NH4H2PO4), lithium dodecyl sulphate (LiDS), orthophosphoric acid, sodium hydroxide, sodium cyanide, boric acid, sodium tetraborate, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) (anthracene, fluoranthene and pyrene), aflatoxins (B1, B2, G1 and G2), biogenic amines (histamine, tyramine, tryptamine, putrescine and cadaverine), catecholamines (noradrenaline and dopamine) and amino acids (arginine, γ-aminobutyric acid (GABA), serine, glycine, glutamic acid and aspartic acid) were from Sigma-Aldrich (France). Acetonitrile (ACN) and ethanol were HPLC-grade (SDS, France). Water was purified by a Purelab UHQ II system (Elga, France). Wine samples were purchased at local supermarkets.

The microchips (1.5 cm x 9.5 cm x 1.5mm) composed of COC (Topas ® 6013) and fabricated by Microfluidic Chipshop GmbH (Germany), exhibit only one 81 mm-long, 75 µm-deep and 75 µm-wide channel.

2.2. Instrumentation

The system used to perform UV irradiations at 365 nm was a Bio-link cross linker (VWR International, France) equipped with five 8 W UV tubes. The light intensity illuminating the microchip was measured with an UV radiometer (Vilbert Lourmat, Germany). A gas chromatograph oven GC-17A (Shimadzu, Japan) was used to dry the COC microchip after hydrophilic modification. For mobile phase preparation, pH value is monitored in the aqueous part using a MeterLab pHmeter (Radiometer, France). For rinsing, injection and elution operations, electric fields generated by a µTK high power supply (Micralyne, Canada) were applied to the microchannel through platinum electrodes placed in the reservoirs. Electrochromatographic separations were monitored by a IX-71 inverted fluorescence microscopic system (Olympus, France) equipped with a XF02-2 100 W mercury lamp (Omega, USA) and an excitation filter of 330 nm (collection above 400 nm) for PAH and aflatoxin detection or 405 nm (collection above 500 nm) for NDA-labelled solutes (amino acids, catecholamines and biogenic amines). A CCD camera was combined with NI Vision software (Alliance Vision, France) for detection processing.

2.3. in situ synthesis of monolith

The monolith based on HA and BDDA monomers, was previously used in COC electrochromatographic microchips [9, 10]. The porogenic mixture made of 54 % w/w of ACN, 23 % w/w of ethanol and 23 % w/w of water, is dissolved in the monomer mixture containing 66.4 % w/w of HA and 33.6 % w/w of BDDA, with the monomerto porogens ratio equal to 34.5 : 65.5 w/w. A charged monomer AMPS (0.5 % w/w of monomers) is added to generate a stable EOF. The concentration of the photoinitiator BME is fixed at 2.5 % of monomers to allow the synthesis of

organic monolith and its anchoring to the COC channel walls in one step [9]. After sonication for 15 min, the polymerisation mixture is introduced in the micro-channel by pressure using a syringe. Then the microchip is placed in the 365 nm illumination system at 2.5 cm from the UV tubes. In this position, the microchip is irradiated with a light intensity of 4.7 mW/cm2, which is optimal for the chip used [10]. After an irradiation of 6 min (which corresponds to an energy of 1.9 J/cm2), the monolith present in the reservoirs is scraped away. Then, the channel filled with the HA-based monolith is rinsed with ACN/water 70:30 (v/v) + 2 mM NH4H2PO4 + 5 mM LiDS by applying an electric field of 620 V/cm for 30 min to remove any remaining reagent. When not in use, the HA-filled COC microchips are immersed in ethanol for conservation.

2.4. Hydrophilic functionalization of COC channel walls

In some experiments, the inner surface of the COC channel was modified with PEGMA before the synthesis of HA-based monolith within the channel. This functionalization was performed in a one step using a photo-grafting procedure [9]. The grafting solution is composed of 70 µL of acetone, 30 µL of 100 mM PEGMA solution (prepared in water) and 2.5 % w/w of BME. The reagent mixture is introduced in the micro-channel by pressure using a syringe and illumination with 365 nm UV light at an intensity of 1.7 mW/cm2 (the microchip is placed at 15 cm from the light source)) is carried out for 20 min (which corresponds to an energy of 1.9 J/cm2). Then the micro-channel is rinsed with ethanol using a syringe to remove any remaining reagent. Finally, the microchip is placed in the oven to dry the microchannel under 30 °C for 1 hour before synthesis of the HA-based monolith.

2.5. Procedure of derivatization with NDA

The derivatization protocol was adapted from a previous work [11]. 50 µL of 100mM pH 9 borate solution (prepared by mixing 500 mM boric acid solution and 125 mM sodium tetraborate solution to obtain pH 9), 50 µL of 43 mM NaCN solution (prepared in water) and 250 µL of 2.5 mM NDA solution (prepared in ACN/water 50/50 v/v) are successively added to 100 µL of sample (wine or aqueous solution of neurotransmitters or biogenic amines). Then the mixture is rapidly shaken and the reaction is allowed to proceed at ambient temperature for 4 min before injection.

2.6. Electrochromatographic separations

Sample injection in the separation channel was performed by using the simple direct injection procedure introduced in a previous publication [7]. A few microliters of sample are placed in the inlet reservoir. The outlet reservoir is filled with mobile phase. To introduce the solutes in the separation channel, an electric field of 125 V/cm is applied for a given time. This injection time is varied in a wide range: from 1 s for normal injections to 16400 s for experiments with extreme preconcentration. The inlet reservoir is then fully washed with the mobile phase and, finally, an electric field of 620 V/cm is applied for separation. The separation length, i.e. the distance between the inlet reservoir and the detection point, is specified for each experiment. LiDS is systematically added in mobile phases to improve the wettability of HA monolith with mobile phase containing high content of water. Adsorption of the surfactant on the surface of stationary phase decreases the surface tension at the interface solid-liquid, which avoids stationary phase drying and subsequent current instability. This mechanism was reported to make easier EC analysis on particles columns [12, 13].

2.7. Wine analysis

Histamine and tyramine contents of wines were determined by spiking each wine with a known concentration of the target analytes. For each analysis of wine, the procedure is as follows: the microchip is first rinsed with ACN/water 70:30 (v/v) + 2 mM NH4H2PO4 + 5 mM LiDS under 620 V/cm for 10 min. The unspiked and spiked wine samples are derivatized with NDA. Three injections of each wine sample (spiked or not) are performed to evaluate histamine and tyramine concentrations.

3. Results and discussion

3.1. Separation of different classes of solutes

The performances of HA-filled COC microchips for the reversed-phase separation of six PAH (anthracene, fluoranthene, pyrene, benzo-a-anthracene, benzo-a-pyrene and benzo-k-fluoranthene) were characterized elsewhere [10]. It was shown that, with a mobile phase containing 70 % ACN, the retention factors of solutes were contained between 5.2 and 17.8 and efficiencies ranged from 200000 to 250000 plates/m at a linear velocity of 1.6 mm/s for a separation length of 2 cm (the corresponding time analysis was 3.5 min). Moreover microchip-to-microchip reproducibility was quite satisfactory since the mean relative standard deviation for EOF, retention factors and efficiencies were 10 %, 8 % and 6 %, respectively.

The usefulness of HA-filled COC microchips was further evaluated in separating a mixture of four aflatoxins. The development of a simple, rapid and cheap analytical procedure of these toxic compounds is important because European Union has fixed the maximum permitted levels (a few nanograms per gram) in agricultural products such as corn, peanuts, cotton seed and tree nuts [14]. Using a hydro-organic mobile phase containing 70 % water, the four aflatoxins were separated within 1.7 min on a 7 cm separation length affording an average theoretical plate count of 34000 per meter (Figure 1). Their order of elution which is G2, G1, B2 and B1, is identical to the one observed in reversed-phase liquid chromatography [15]. Using HA stationary phase, 70% water content is required in the mobile phase to separate the critical pair of G1 and B2 aflatoxins (solutes 2 and 3). A possible explanation for the relatively low separation efficiency obtained could be the slow mass transfer between stagnant and mobile zones in the column, when it is used with very aqueous mobile phase [16]. However it was also observed that peak broadening on acrylate monolithic column is strongly dependent on the type and functionality of the solutes [16, 17].

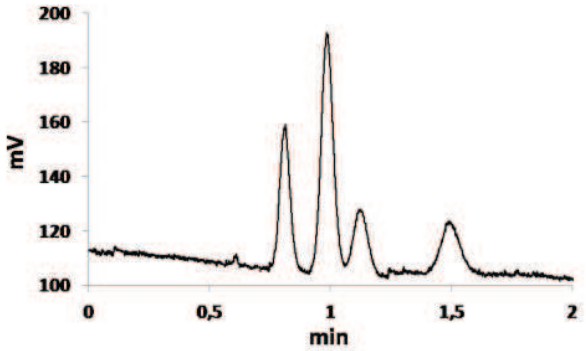
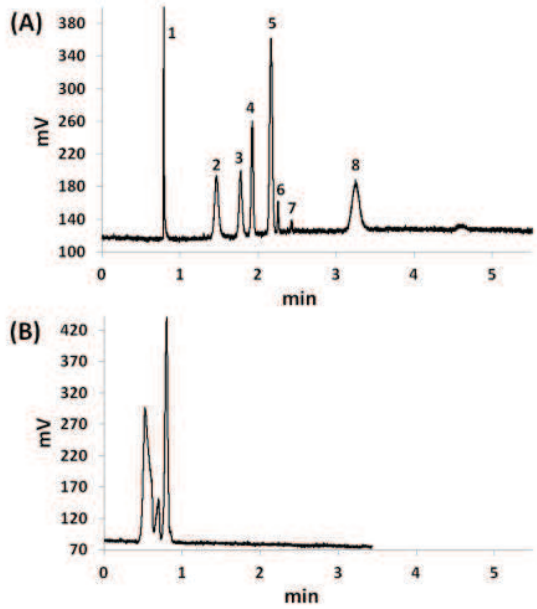


Figure 1 : Separation of four aflatoxins in HA-filled COC microchip. Solutes (injected concentration) : 1 = aflatoxin G2 (1.2 µM), 2 = aflatoxin G1 (2.3 µM), aflatoxin B2 (4.8 µM), 4 = aflatoxin B1 (23 µM). Mobile phase: ACN/water 30:70 (v/v) + 2 mM NH4H2PO4 + 5 mM LiDS. Separation length: 7 cm. Injection time: 10 s.

Unlike neutral solutes whose separation is solely based on chromatographic partitioning between stationary and mobile phases, ionisable solutes such as amino acid and catecholamines can be separated on the basis of the differences between both their electrophoretic mobilities and their interactions with stationary phase. The performance of HA-filled COC microchip for this separation type was evaluated with a mixture of neurotransmitters composed of five amino acids (arginine,, serine, glycine, glutamic acid and aspartic acid), GABA (γ-aminobutyric acid) and two catecholamines (noradrenaline and dopamine). The determination of these solutes in small samples such as brain microdialysates is important to understand various neuro-physiological processes [18]. For fluorescence detection, the primary amine function of the different solutes was off-line labelled with NDA before injection and the baseline separation of the eight solutes was obtained at pH = 4 in about 3.5 min on a separation length of 7 cm with an efficiency ranging from 100000 to 330000 plates/m (Figure 2A). Various pH values between pH 2 and pH 13 have been tested and pH 4 seems to offer the largest selectivity. Indeed, at this pH value, the NDA-derivatized catecholamines with pKa of their catechol function of about 6-7 are undissociated and can be considered as neutral. Their migration in HA monolith results totally from a chromatographic process. On the other hand, the carboxylic acid function of free alphaamino acids is nearly totally dissociated (pKa = 2.1 - 2.4). So serine, glycine, glutamic acid and aspartic acid are anionic and an interplay between the electrophoretic and chromatographic processes controls their migration. Since the carboxylic function of GABA exhibits a pKa of 4.2, and the electrolyte is not buffered, its migration time can vary and special attention should be paid for the preparation and replenish of fresh mobile phase. With a pKa of 12.5, the guanidinium group of arginine is positively charged and NDA-derivatized arginine is globally neutral. But its high polarity results in a low retention on HA monolith. With no electrophoretic mobility and weak chromatographic retention, NDA-derivatized arginine almost migrates with the electroosmotic flow. In the separation of neurotransmitters, the chromatographic process i.e. the interactions of solutes with monolith play a major part. Indeed, Figure 2B shows that there is no separation with the used mobile phase in an open channel COC microchip i.e. a COC microchip without HA monolith. Therefore electrophoretic process on its own is not sufficient to separate these analytes. Electrochromatography offers here the ability to simultaneously separate neutral and charged compounds with a higher selectivity.

Figure 2 : Separation of eight neurotransmitters labelled with NDA in (A) HA-filled



COC microchip and (B) open channel COC microchip. Solutes : 1 = arginine, 2 = noradrenaline, 3 = GABA, 4 = serine, 5 = glycine, 6 = glutamic acid, 7 = aspartic acid, 8 = dopamine. Mobile phase : ACN/water 50:50 (v/v) + 2 mM NH4H2PO4 + 5 mM LiDS, pH adjusted to 4 with H3PO4. Separation length : 7 cm. Injected concentration of each solute : 120 µM. Injection time : 10 s.

The performance of HA-filled COC microchip was also investigated for the determination of some biogenic amines in wines. The ingestion of histamine and tyramine can induce headaches in sensitive persons. Their formation has to be controlled during wine making. A portable glass microchip electrophoresis system was already used to monitor their concentration during the fermentation process [19] and we show here that the HA-filled COC microchip is usable for this control. Figure 3 shows the separation of five NDA-derivatized biogenic amines (histamine, tyramine, tryptamine, cadaverine and putrescine) performed at 70% ACN, pH 13. As the derivatization of diamines (cadaverine and putrescine) is not total, the choice of pH 13 prevents from the dissociation of the non-derivatized primary amine function (pKa = 10.2 – 10.8) and reduces peak tailing due to electrostatic interactions between solutes and anionic stationary phase. The average efficiency was 125 000 plates/m.

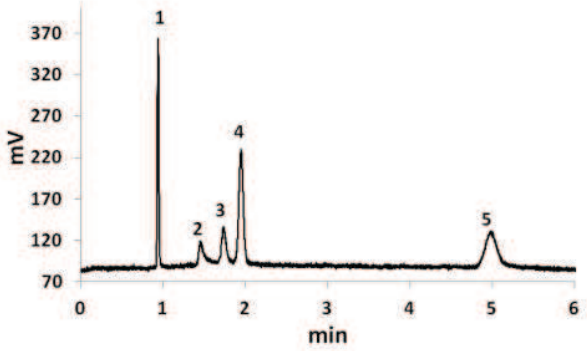


Figure 3 : Separation of five biogenic amines labelled with NDA in HA-filled COC microchip. Solutes : 1 = histamine, 2 = putrescine, 3 = cadaverine, 4 = tyramine, 5 = tryptamine. Mobile phase : ACN/water 70:30 (v/v) + 2 mM NH4H2PO4 + 5 mM LiDS - pH adjusted to 13 with NaOH. Separation length : 7 cm. Injected concentration of each solute : 0.2 mM. Injection time : 10 s.

Figures 4A and 4B show the representative electrochromatograms corresponding to the determination of histamine and tyramine concentrations in a red wine. The separation of the solutes of interest from the matrix is obtained by adapting the mobile phase to 60% ACN. By comparison of the electrochromatogram of the unspiked wine sample (Figure 4A) and the electrochromatogram of the wine sample spiked with 1.3 mg/L histamine and 1.9 mg/L tyramine (Figure 4B), the levels of histamine and tyramine in the analyzed red wine were evaluated at 0.2 ± 0.02 and 0.2 ± 0.03 mg/L, respectively. For confirmation, Figure 4C shows the injection of a standard solution containing histamine and tyramine at 1.3mg/L and 1.9 mg/l, respectively.

The durability of the HA-filled COC microchips was clearly confirmed during these experiments. Indeed, a wine sample is a complex mixture (particle, tannins, dyes ...) and was injected without filtration in the microchip. Since no pretreatment was applied, derivatization with NDA (specific of primary amines) led to numerous fluorescent species (amino acids, biogenic amines...). The obtained electrochromatograms containing numerous peaks were reproducible, with CV of 5 % for retention factor, 8 % for electroosmotic mobility and 4 % for electrochromatographic efficiency, measured over 10 injections. Fifteen different wines (red wines and white wines) were analyzed on the same HA-filled COC microchip. This corresponds to about one hundred injections of real samples performed on the same microchip.

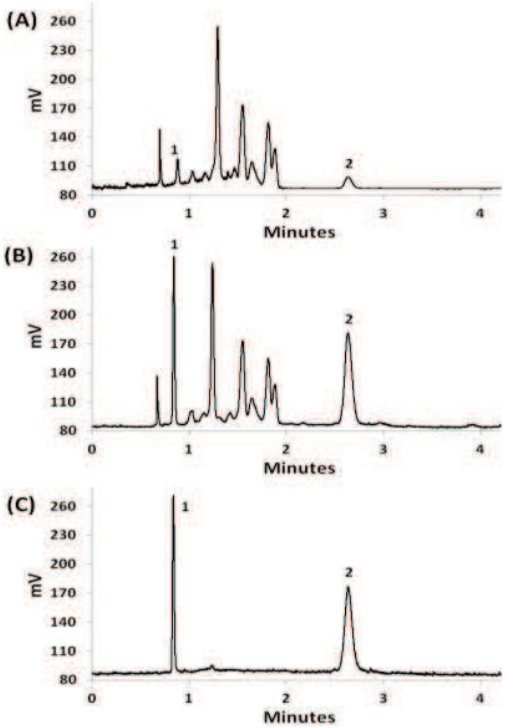


Figure 4 : Analysis of NDA-derivatized biogenic amines : (A) unspiked wine sample and (B) wine sample spiked with 1.3 mg/L histamine and 1.9 mg/L tyramine. (C) mixture of standards with 1.3 mg/L histamine and 1.9 mg/L tyramine. Solutes : 1 = histamine, 2 = tyramine. Mobile phase : ACN/water 60:40 (v/v) + 2 mM NH4H2PO4 + 5 mM LiDS - pH adjusted to 13 with NaOH. Separation length : 7 cm. Injection time : 20 s.

3.2. On-line preconcentration

The effect of water content of the sample matrix on the extent of preconcentration phenomenon in the HA-filled COC microchip was first studied with NDA-derivatized tyramine as model solute (Figure 5). The variations of peak height in function of corrected peak area (peak area divided by migration time) obtained for different injection times were studied when the sample matrix is identical to the mobile phase (Figure 5A) and less eluting than the mobile phase (Figure 5B). When the sample solvent has the same composition as the mobile phase (70 % ACN v/v), peak height variation is linear until an injection time of 10 s. For larger injection times, peak height tends to level off because peak broadening occurs due to excessive injected volume. This injection time of 10 s offers the maximal sensitivity that can be reached when the sample is dissolved in mobile phase. Under these injection conditions, peak height is equal to 170 mV. When the sample matrix contains less eluting solvent than the mobile phase (30 % ACN v/v), the peak height variation is linear until an injection time of 400 s This shows that no volume overload phenomenon occurs in this injection time range. Thus, by injecting the sample dissolved in a weakly eluting matrix (30 % ACN v/v) during 400 s, peak reaches the height of 5820 mV, which corresponds to sensitivity 34 times larger than the maximal sensitivity obtained with the sample dissolved in mobile phase. Above 400s injection time, the curve is almost linear up

to 900 s injection time (which is the largest injection time tested in this experiment). This slight deviation from linearity may not be due to sample overloading but to degradation in the fluorescence signal of the solute. The study could not be conducted further on, as the fluorescent derivatives of tyramine-NDA are not stable over more than 30 min.

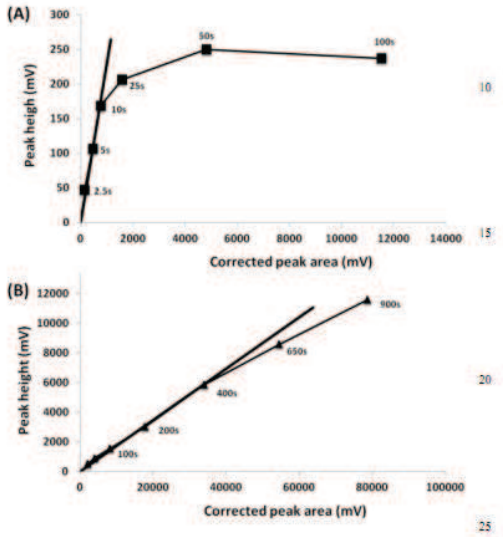


Figure 5 : Preconcentration of NDA-derivatized tyramine on HA-filled COC microchip : variations of peak height versus corrected peak area (the value placed close to each experiment point states the corresponding injection time). Sample matrix : (A) ACN/water 70:30 (v / v) + 2mM NH4H2PO4 + 5 mM LiDS – pH 13 , (B) ACN/water 30:70 (v / v) + 2 mM NH4H2PO4 + 5 mM LiDS – pH 13. Mobile phase : ACN/water 70:30 (v / v) + 2 mM NH4H2PO4 + 5 mM LiDS – pH13. Separation length : 3.5 cm. Injected concentration : 2 µM.

The same study was undertaken with fluoranthene as model solute (Figure 6). Figure 6A shows that the height of fluoranthene peak does not increase with increasing injection time when the sample matrix is identical to mobile phase. As this behaviour was not observed with a more polar solute such as tyramine (Figure 5A), we suppose that it could originate from the hydrophobicity of fluoranthene and the possible adsorption of fluoranthene on COC channel walls. In order to verify this hypothesis, the same experiments were performed on a COC microchip of which the channel was functionalized with PEGMA before in situ synthesis of HA monolith. It was checked that this wall chemical modification had no impact on the electrochromatographic values (retention, EOF, efficiency). The results obtained with this HA-filled PEGMA-functionalized COC microchip were in agreement with expectation (Figure 6B): there is a range of injection time (until 40 s) within which peak height increases proportionally to peak area and consequently no peak broadening occurs. With the maximal injection time of 40 s, the peak height is equal to 0.43 mV. Hydrophilic surface modification of COC channel also allows implementation of very long preconcentration operation when the sample matrix has a lower eluting force than the mobile phase. Figure 6C shows the variation of peak height versus corrected peak area when fluoranthene is injected in 30 % ACN v/v sampling phase and eluted with 70 % ACN v/v mobile phase. The range of injection time investigated was very wide, up to 16200 s (4.5 hours) and no peak broadening was observed. With the injection time of 16200 s, the peak height is equal to 57 mV. This allows an increase of 133 in sensitivity compared with injection of fluoranthene dissolved in mobile phase.

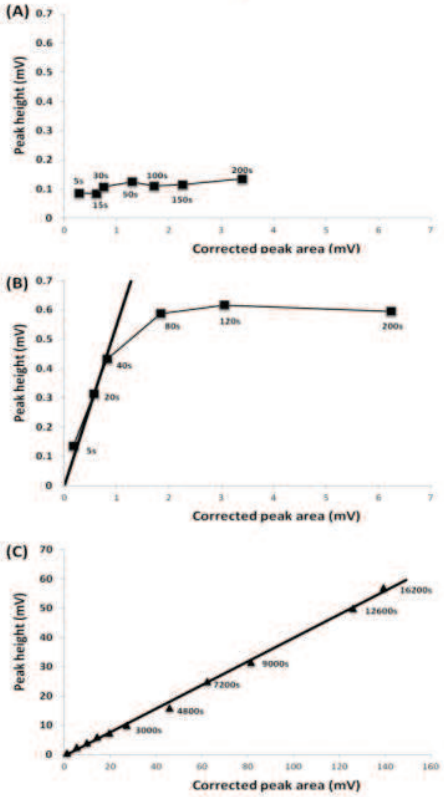


Figure 6 : Preconcentration of fluoranthene on (A) HA-filled COC microchip and (B, C) HA-filled PEGMA-functionalized COC microchip : variations of peak height versus corrected peak area (the value placed close to each experiment point states the corresponding injection time. Sample matrix : (A, B) ACN/water 70:30 (v/v) + 2 mM NH4H2PO4 + 5 mM LiDS, (C) ACN/water 30:70 (v/v) + 2mM NH4H2PO4 + 5 mM LiDS . Mobile phase : ACN/water 70:30 (v/v) + 2 mM NH4H2PO4 + 5 mM LiDS. Separation length : 3.5 cm. Injected concentration : 1 ppb.

Figure 7 presents the electrochromatogram obtained for the separation of three PAH using these conditions, i.e. a mobile phase containing 70 % v/v ACN, a sample matrix containing 30 % ACN v/v and an injection time of 16200 s. After this very long preconcentration step, the separation is still satisfactory. The efficiencies (ranging from 100000 to 125000 plates/m) are kept high, even if they are decreased compared with those obtained with a normal injection of 5 s (200000 – 250000 plates/m). Low levels of PAH can be detected. The signal-to-noise ratios obtained for anthracene, fluoranthene and pyrene injected at 3.5, 0.5 and 15 ppb are 11.5, 3.8 and 2.0, respectively.

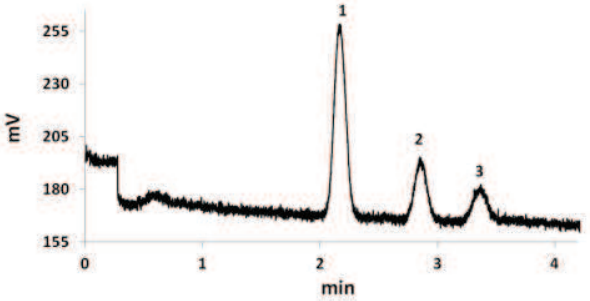


Figure 7 : Preconcentration and separation of three PAH on HA-filled PEGMA-functionalized COC microchip. Solutes (injected concentration) : 1 = anthracene (3.5 ppb), 2 = fluoranthene (0.5 ppb), 3 = pyrene (15 ppb). Mobile phase : ACN/water 70:30 (v/v) + 2 mM NH4H2PO4 + 5 mM LiDS. Sample matrix : ACN/water 30:70 (v/v) + 2 mM NH4H2PO4 + 5 mM LiDS . Separation length : 3.5 cm. Injection time : 16200 s (4.5 hours).

4. Concluding remarks

The present investigation shows that HA-filled COC microchips are promising tools for field portable analysis. They offer many interesting features such as low cost, ease and rapidity of fabrication, simplicity of use, resistance to aggressive conditions (organic solvents, extreme pH), application to a wide range of analytes (non-polar or polar, neutral or charged), high separation efficiency and ability for on-line preconcentration.

References

[1] Fintschenko, Y., Choi, W-E, Ngola, S. M., Shepold, T. J., Fres. J. Anal. Chem. 2001, 371, 174-181.

[2] Shediac, R., Ngola, S. M., Throckmorton, D. J., Anex, D. S., Shepold, T. J., Singh, A. K., J. Chromatogr. A 2001, 925, 251-263.

[3] Trockmorton, D. J., Shepold, T. J., Singh, A. K., Anal. Chem. 2002, 74, 784-789.

[4] Augustin, V., Proczek, G., Dugay, J., Descroix, S., Hennion, M-C, J. Sep. Sci. 2007, 30, 2858-2865.

[5] Proczek, G., Augustin, V., Descroix, S., Hennion, M-C., Electrophoresis 2009, 30, 515-524.

[6] Watson, M. W., Mudrik, J. M., Wheeler, A. R., Anal. Chem. 2009, 81, 3851-3857.

[7] Ladner, Y., Cretier, G., Faure, K., J. Chromatogr. A 2010, 1217, 8001-8008.

[8] Faure, K., Albert, M., Dugas, V., Cretier, G., Ferrigno, R., Morin, P., Rocca, J-L., Electrophoresis 2008, 29, 4948-4955.

[9] Ladner, Y., Bruchet, A., Cretier, G., Dugas, V., Randon, J., Faure, K., Lab Chip 2012, 12, 1680-1685.

[10] Ladner, Y., Cretier, G., Faure, K., J. Sep. Sci., accepted.

[11] Robert, F., Bert, L., Denoroy, L., Renaud, B., Anal. Chem. 1995, 67, 1838-1844.

[12] Ping, G., Zhang, W., Zhang, L., Schmitt-Kopplin, P., Zhang, Y., Kettrup, A., Chromatographia 2003, 57, 629-633.

[13] Valette, J-C., Bizet, A. C., Demesmay, C., Rocca, J-L., Verdon, E., J. Chromatogr. A, 2004, 1049, 171-181.

[14] Commission Regulation (EC) 1525/98, Off. J. Eur. Communities 1998, L 201, 43-46.

[15] Sobolev, S. V., J. Agric. Food Chem. 2007, 55, 2136-2141.

[16] Huo, Y., Schoenmakers, P. J., Kok, W. T., J. Chromatogr. A 2007, 1175, 81-88.

[17] Eeltink, S., Rozing, G. P., Shoenmakers, P. J., Kok, W. T., J. Chromatogr. A 2006, 1109, 74-79.

[18] Parrot, S., Sauvinet, V., Riban, V., Depaulis, A., Renaud, B., Denoroy, L., J. Neurosci. Methods 2004, 140, 29-38.

[19] Jayarajah, C. N., Skelley, A. M., Fortner, A. D., Mathies, R. A., Anal. Chem. 2007, 79, 8162-8169.

V.8. Références bibliographiques

[1] De Montigny, P., Riley, C. M., Sternson, L. A., Stobaugh, J. F., *J. Pharmaceut. Biomed.* 1990, *8*, 419-429.

[2] Rammouz, G., Lacroix, M., Garrigues, J. C., Poinsot, V., Couderc, F., *Biomed. Chromatogr.* 2007, *21*, 1223-1239.

[3] Robert, F., Bert, L., Denoroy, L., Renaud, B., *Anal. Chem.* 1995, *67*, 1838-1844.

[4] www.ijm.fr/fileadmin/IJM/MEDIA/imagerie/fichiers/formations/imagerienumerique.pdf, consulté le 15/06/2012.

[5] Blas, M., *Thèse*, Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne, France, 2006.

[6] Commission Regulation (EC) 1525/98, O. J. E. C., L 201, 43-46.

[7] Sobolev, S. V., J. Agric. Food Chem. 2007, 55, 2136-2141. .

[8] Huo, Y., Schoenmakers, P. J., Kok, W. T., *J. Chromatogr. A* 2007, *1175*, 81-88.

[9] Chamieh, J., Faye, C., Dugas, V., Moreau, T.*, et al.*, *J. Chromatogr. A* 2011, *1232*, 93-100.

[10] Eeltink, S., Rozing, G. P., Schoenmakers, P. J., Kok, W. T., *J. Chromatogr. A* 2006, *1109*, 74-79.

[11] Gunasena, D. N., El Rassi, Z., *Electrophoresis* 2012, *33*, 251-261.

[12] Viklund, C., Irgum, K., *Macromolecules* 2000, *33*, 2539-2544.

[13] Parrot, S., Sauvinet, V., Riban, V., Depaulis, A., Renaud, B., Denoroy, L., J. Neurosci. Methods 2004, 140, 29-38.

[14] www.vignevin-sudouest.com/publications/fiches-pratiques/amine-biogenes.php, consulté le 30/05/2012.

[15] Herbert, P., Cabrita, M. J., Ratola, N., Laureano, O., Alves, A., *J. Food. Eng.* 2005, *66*, 315-322.

[16] Landete, J. M., Ferrer, S., Polo, L., Pardo, I., *J. Agr. Food. Chem.* 2005, *53*, 1119-1124.

[17] González Marco, A., Ancín Azpilicueta, C., *Food Chemistry* 2006, *99*, 680-685.

[18] Jayarajah, C. N., Skelley, A. M., Fortner, A. D., Mathies, R. A., Anal. Chem. 2007, 79, 8162-8169.

Conclusion générale et perspectives

L'objectif principal de ce travail était de développer et de mettre en œuvre une phase stationnaire monolithique photopolymérisée *in-situ* dans un microsystème électrochromatographique en COC.

Dans un premier temps, des études préliminaires ont permis de choisir un monolithe adapté à son support. Pour ce faire, deux monolithes ont été synthétisés en capillaire et en microsystème. Le premier monolithe à base de porogènes exclusivement organiques et contenant des monomères lauryl méthacrylate (LMA) susceptibles de générer une forte rétention, s'est montré très inefficace en présence de phases mobiles très aqueuses. Par suite, l'impossibilité de pratiquer une étape de préconcentration nous à conduit à écarter ce monolithe, considéré comme non viable pour l'objectif fixé. Un deuxième monolithe à base de porogène hydroorganique et de monomères hexyl acrylate (HA) et 1,3-butanediol diacrylate (BDDA) a conduit à des efficacités de 250 000 plateaux/m, ceci indépendamment de la taille et de la rétention des solutés ainsi que de la composition de la phase mobile. Comme il est compatible avec une étape de préconcentration permettant la diminution des limites de détection, ce monolithe HA/BDDA a donc été choisi pour la suite de l'étude. Pour tester son efficacité en microsystème, un nouveau mode d'injection (injection directe) a été développé afin de simplifier l'étape d'injection et la rendre plus compatible avec l'analyse-sur-site. Ce mode d'injection directe permet d'obtenir des performances similaires à celles obtenues en injection classique (injection dynamique). Lors du transfert de sa synthèse en microsystème, il a été montré que l'absence d'ancrage du monolithe HA/BDDA à la surface du COC est responsable de la dégradation des performances séparatives du monolithe.

Dans un deuxième temps, afin de palier à la perte d'efficacité observé lors du transfert de la synthèse du format capillaire vers le format microsystème, nous nous sommes orientés sur le développement d'un nouveau procédé permettant la synthèse et l'ancrage du monolithe HA/BDDA dans les microcanaux en COC en une seule étape à l'aide des photoinitiateurs de type I (BME ou AIBN). Ces photoamorceurs sont à l'origine d'un mécanisme majoritaire générant des radicaux libres pouvant initier la polymérisation et d'un mécanisme minoritaire permettant d'abstraire des atomes d'hydrogène à la surface du matériau afin d'y greffer des monomères. L'étude a porté sur l'influence du pourcentage massique en photoinitiateur dans le mélange de polymérisation sur la morphologie du monolithe à l'intérieur du canal en COC et sur les performances séparatives du microsystème obtenu. Ce procédé de synthèse et d'ancrage en une seule étape, breveté en 2011, permet de diminuer considérablement le temps de préparation du microsystème et de générer une phase stationnaire robuste, capable de supporter des pressions supérieures à 20 bars. Cet ancrage améliore également les efficacités d'un facteur 3 par rapport à un monolithe non ancré. Cependant, ces efficacités qui atteignent 130 000 plateaux/m, restent inférieures à celles obtenues en capillaire.

En vue d'améliorer les performances séparatives du monolithe HA/BDDA ancré aux parois des canaux en COC, nous avons étudié l'influence des conditions d'irradiation sur la structure et les

performances électrochromatographiques de la phase stationnaire. Cette étude a mis en évidence l'influence de l'intensité d'irradiation sur l'efficacité du monolithe et l'utilisation d'une intensité optimale de 4.7 mW/cm² permet l'obtention de 250 000 plateaux/m pour la séparation de 6 HAP, ceci quelles que soient la rétention et la taille des solutés.

Enfin, la réalisation de la séparation de différentes familles de solutés (amines biogènes, mycotoxines et neurotransmetteurs) a montré la capacité du monolithe HA/BDDA à séparer des solutés neutres et ionisés. La quantification de deux amines biogènes (histamine et tyramine) présentes dans les vins à des concentrations de l'ordre du mg/L a également été réalisée afin d'illustrer l'intérêt de notre dispositif analytique miniaturisé pour analyser des matrices réelles. 200 injections dans un même microsystème de 18 boissons alcoolisées ont donné des CV inférieurs à 10 % sur H, k_i et μ_{eo}. Ces résultats illustrent parfaitement la longévité et les bonnes performances électrochromatographiques du système. La validation de la méthode proposée reste à réaliser.

Dans le but d'améliorer les limites de détection, une étape de préconcentration en tête de canal de séparation est également possible quelle que soit la nature du soluté d'intérêt. Dans le cas des solutés apolaires, la modification chimique des parois internes du canal en COC par un monomère monofonctionnel hydrophile (PEGMA) est requise.

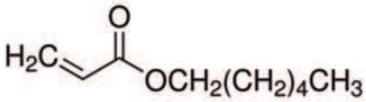
Ces travaux couronnés par le prix "Recherche et Innovation" du palmarès 2012 de l'Association des Amis de l'Université de Lyon, ont permis la mise en place d'une nouvelle technologie de phase stationnaire monolithique dans un microsystème plastique, permettant des préconcentrations et des séparations performantes de matrices réelles. Etant donné la grande modularité d'une telle phase stationnaire et du format microsystème, des applications très variées peuvent être développées avec des séparations très efficaces fondées sur des interactions spécifiques, dans le but d'établir des analyses à haut débit.

Le développement d'un monolithe hydrophile en microsystème semble nécessaire afin de séparer les molécules polaires par électrochromatographie en mode chromatographie d'interaction hydrophile (HILIC). Ceci éviterait l'utilisation d'une phase stationnaire hydrophobe avec une phase mobile riche en eau qui est souvent source de perte d'efficacité. Cette phase stationnaire hydrophile faciliterait aussi la mise œuvre de préparations d'échantillons spécifiques en amont de l'étape de séparation. En effet, dans des méthodes d'extraction par immunoaffinité ou utilisant des polymères à empreintes moléculaires (MIP), les solutés d'intérêt sont souvent désorbés avec des phases très riches en solvants organiques, donc de très faible force éluante en mode HILIC. Il serait alors possible d'envisager une préconcentration de ces solutés polaires en tête de colonne.

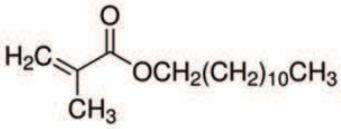
L'un des enjeux majeurs de ces prochaines années va porter sur la miniaturisation de la détection afin de développer un laboratoire sur puce (Lab on a chip) applicable à l'analyse chromatographique sur site. L'intégration du dispositif de détection dans le microsystème doit rester simple d'utilisation et le moins coûteux possible. L'incorporation d'un détecteur UV permettrait d'agrandir le champ d'application des microsystèmes et éviterait l'ajout d'une étape de dérivation qui est souvent nécessaire dans le cas de la détection par fluorescence.

Annexes

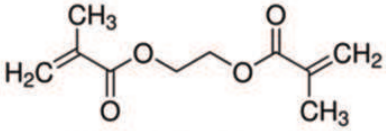
Annexe 1 : Les différents monomères utilisés



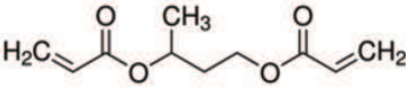
hexyl acrylate



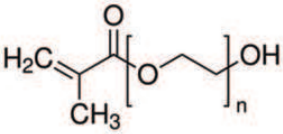
lauryl méthacrylate



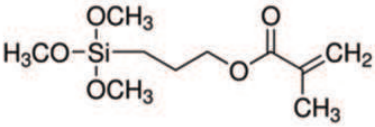
éthylène diméthacrylate



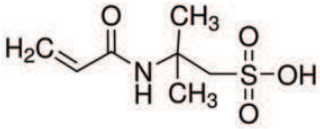
1,3-butanediol diacrylate



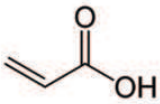
poly(éthylène glycol) méthacrylate (PEGMA)



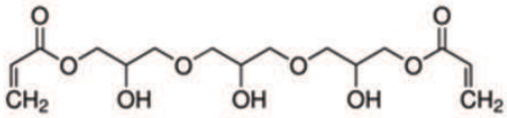
3-(trimethoxysilylpropyl) méthacrylate (γ-MAPS)



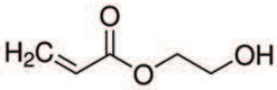
acide 2-acrylamido-2-méthyl-1-propanesulfonic (AMPS)



acide acrylique



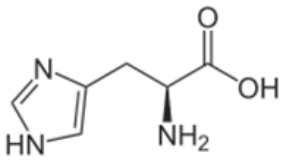
glycerol 1,3-diglycérolate diacrylate (GDDA)



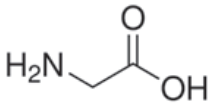
2-hydroxyéthyle acrylate (2-HA)

Annexe 2 : Les différents solutés séparés

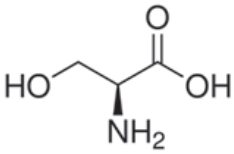
➢ Les acides aminés



histidine



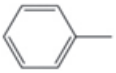
glycine



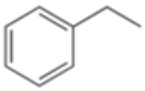
sérine

➢ Les alkylbenzènes

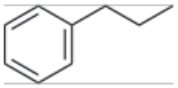
benzène



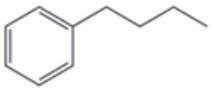
toluène



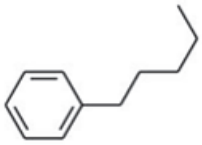
éthylbenzène



propylbenzène



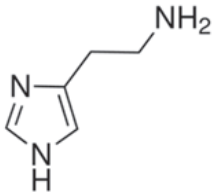
butylbenzène



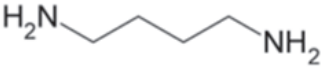
pentylbenzène

➢ Les amines biogènes

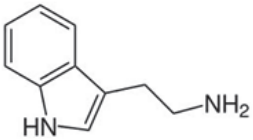
cadavérine



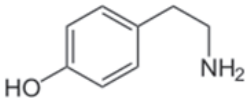
histamine



putrescine

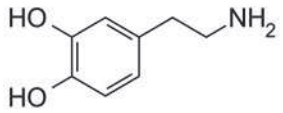


tryptamine

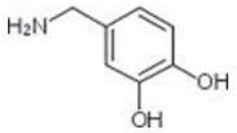


tyramine

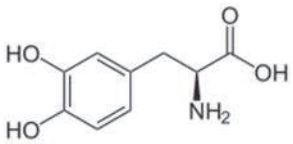
➢ Les catécholamines



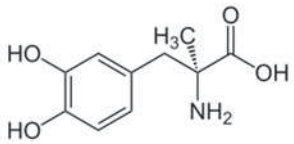
dopamine



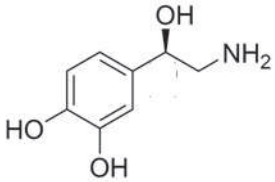
3,4-Dihydroxybenzylamine (DHBA)



L-dopa

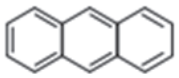


méthyldopa

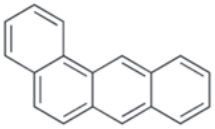


noradrénaline

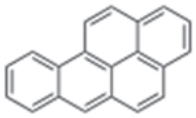
➢ Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)



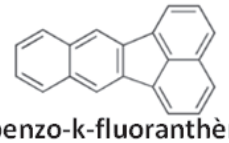
anthracène



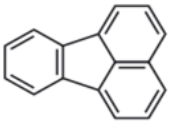
benzo-a-anthracène



benzo-a-pyrène



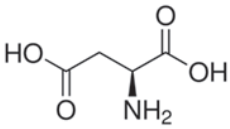
benzo-k-fluoranthène



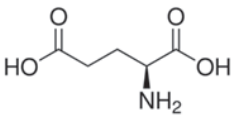
fluoranthène

pyrène

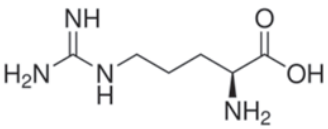
➢ Les neurotransmetteurs



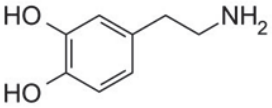
acide aspartique



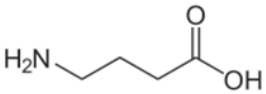
acide glutamique



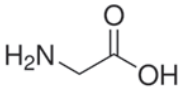
arginine



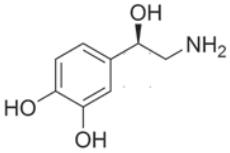
dopamine



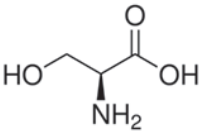
GABA
(acide γ-aminobutyrique)



glycine

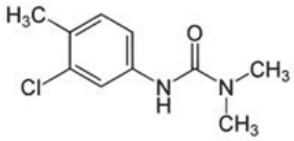


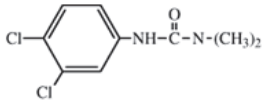
noradrénaline

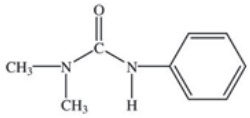


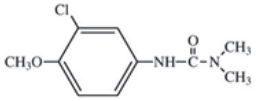
sérine

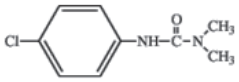
➢ Les pesticides


chlortoluron

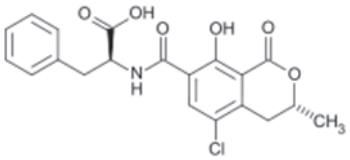

diuron

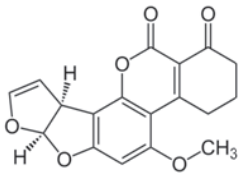

fénuron

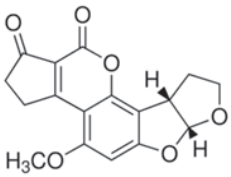

métoxuron

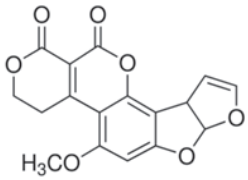

monuron

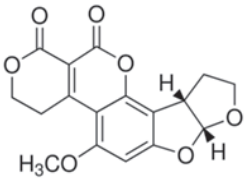
➢ Les mycotoxines


Ochratoxine A


aflatoxine B1


aflatoxine B2


aflatoxine G1


aflatoxine G2

Annexe 3 : Influence de la nature et de la concentration en monomères hydrophiles pour la modification chimique des parois en COC à partir des photoinitiateurs de type I

Le chapitre 3 a montré que la modification chimique de la surface du COC peut être réalisée à partir des photoinitiateurs de type I tels que la BME ou l'AIBN. Ces photoamorceurs présentent un mécanisme minoritaire d'abstraction d'hydrogène permettant de greffer des monomères à la surface de matériaux polymériques. La seule contrainte est que le polymère substrat doit présenter des hydrogènes abstractibles, c'est-à-dire des hydrogènes capables d'être enlevés sous photo-activation, en présence d'un abstracteur d'hydrogène, pour former des radicaux. Dans cette étude, les surfaces en COC ont été modifiées chimiquement en une seule étape à partir d'un mélange contenant 2.5 % wt de BME et différentes concentrations de PEGMA (de 0.03 à 0.25 M) dans l'acétone. La description complète du protocole de fonctionnalisation des parois en COC est donnée dans l'article 3.

La **figure A3.1** montre les influences de la concentration en PEGMA et du temps d'irradiation sur l'angle de contact de l'eau sur les plaques COC.

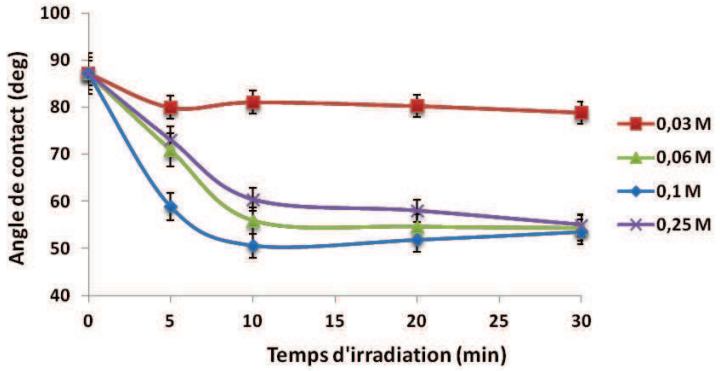


Figure A3.1 : Effet de la concentration en PEGMA sur l'angle de contact de l'eau sur la surface COC fonctionnalisée PEGMA. Concentration en BME de 2.5 % wt. Intensité d'irradiation P : 1.7 mW/cm².

Une concentration trop faible en PEGMA (0.03 M) n'entraîne pas de modification de l'angle de contact quel que soit le temps d'irradiation. Le taux de greffage en PEGMA est trop faible pour pouvoir changer les propriétés hydrophobes du COC. Lorsque la concentration en PEGMA passe de 0.03 à 0.1 M, l'angle de contact diminue de 80 à 50 degrés. La surface COC devient donc de plus en plus hydrophile quand la quantité de monomères PEGMA pouvant réagir avec les radicaux présents à la surface du COC augmente. Cependant, pour des concentrations élevées en PEGMA (0.25 M), des angles de contact plus importants sont observés, ce qui peut être expliqué par l'apparition d'effets écran du fait de la forte absorption de ce monomère à 365 nm [1]. Ceci se traduit par une diminution den l'intensité du rayonnement UV arrivant dans le canal en COC et entraîne un taux de greffage en PEGMA à la surface du COC plus faible. Les parois du COC modifiées par 0.25 M de PEGMA sont donc moins hydrophiles qu'avec une solution à 0.1 M. L'observation de l'interface air/eau dans le canal

COC confirme cette tendance (**figure A3.2**). L'étalement de l'eau sur les parois COC augmente lorsque la concentration en PEGMA varie de 0.06 à 0.1 M, puis diminue pour des concentrations plus importantes (effet écran).

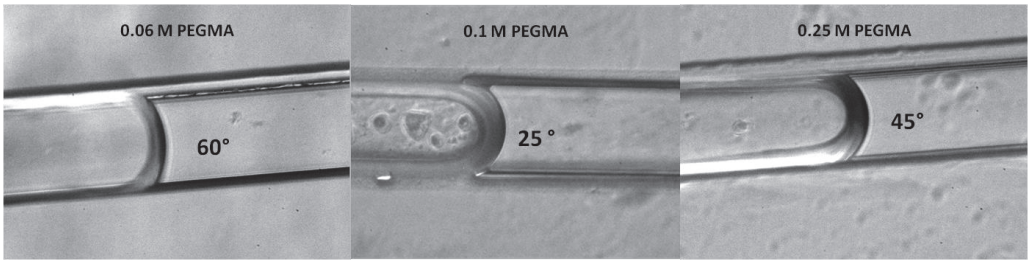


Figure A3.2 : Observation de l'interface air/eau dans un canal COC fonctionnalisé PEGMA à partir de 2.5 % de BME et pour différentes concentrations en PEGMA.

A la vue de ces résultats, il semble que la présence de 0.1 M de PEGMA dans un mélange contenant 2.5 % wt de BME soit la concentration optimale en monomère pour obtenir une surface COC la plus hydrophile possible. L'angle de contact mesuré dans un canal (milieu fermé) est plus important que celui obtenu sur des surfaces (milieu ouvert) en raison d'un rapport volume/surface plus important.

Le greffage de différents monomères hydrophiles à la surface du COC a aussi été réalisé afin de vérifier la versatilité de la méthode proposée dans le chapitre III. Quatre monomères ont été greffés sur les parois du COC : l'acide acrylique, le glycerol 1,3-diglycérolate diacrylate (GDDA), le 2-hydroxyéthyle acrylate (2-HA) et le 3-(trimethoxysilylpropyl) méthacrylate (γ-MAPS). Tous ces produits proviennent de chez Sigma-Aldrich et leurs structures chimiques sont présentées en annexe 1. Le protocole de fonctionnalisation utilisé est décrit dans la section III.1.4. Une irradiation UV de 10 minutes à 365 nm (E = 0.95 J/cm^2, P = 1.7 mW/cm^2) a été réalisée après introduction du mélange dans le canal en COC. Le **tableau A3.1** rassemble les angles de contact obtenus directement par observation de l'interface air/eau dans le canal COC fonctionnalisé.

Tableau A3.1 : Fonctionnalisation *in-situ* des parois d'un microcanal COC à partir de différents monomères

Monomères	Θ avant fonctionnalisation	θ après fonctionnalisation
PEGMA	90°	25°
GDDA	90°	34°
Acide acrylique	90°	15°
2-HA	90°	25°
γ-MAPS	90	22°

L'ensemble des résultats montrent un étalement important de l'eau sur les parois du COC puisque des angles de contact inférieurs à 35 degrés sont observés pour l'ensemble des monomères utilisés. Il est donc possible de greffer différents monomères hydrophiles sur le matériau COC en quelques minutes, ce qui démontre la robustesse et la versatilité de notre protocole.

Annexe 4 : Comparaison BME – BP pour la fonctionnalisation de parois COC

Le chapitre III a montré que la fonctionnalisation du COC peut être réalisée à partir des photoinitiateurs de type I (BME, AIBN) et de type II (BP). Des études complémentaires ont été réalisées afin de comparer le mécanisme photochimique de la BP à celui de la BME.

La **figure A4.1** montre l'évolution de l'angle de contact de l'eau sur la surface COC fonctionnalisée PEGMA 0.1 M en fonction du temps d'irradiation et selon le type d'initiateur. La fonctionnalisation du COC en une seule étape à partir d'un mélange contenant 2.5 % wt de BME et 0.1 M de PEGMA est décrite dans l'article 3. La modification chimique du COC à partir de 5 % en poids de benzophénone et de 0.1 M de PEGMA est réalisée selon le protocole 1 (en deux étapes) décrit dans la partie III.1.1. Ces protocoles ont été choisis car ils permettent d'obtenir un taux de greffage en PEGMA optimal à la surface du COC. L'irradiation UV est effectuée à une intensité P constante de 1.7 mW/cm^2 pour des temps d'irradiation variant de 1 à 30 min.

Une variation de l'angle de contact de 40 degrés environ (de 90° à 50°) est observée durant les 10 premières minutes d'irradiation quel que soit le protocole utilisé.

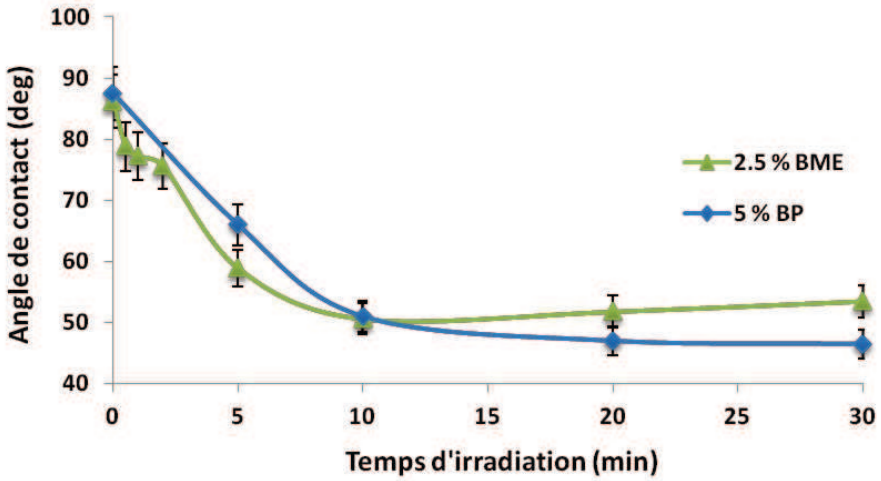


Figure A4.1 : Effet du temps d'irradiation sur l'angle de contact de l'eau sur la surface COC fonctionnalisée PEGMA à partir de 2.5 % wt BME et de 5 % wt de BP. 0.1 M PEGMA dans de l'acétone.

L'angle de contact atteint n'évolue plus au-delà de ce temps d'irradiation. Le taux de greffage en PEGMA à la surface du COC par l'intermédiaire de la BME est donc identique à celui obtenu à partir de la benzophénone en deux étapes. Les angles de contact mesurés dans ces expériences sont également similaires à ceux observés dans la littérature [1].

Les protocoles basés sur la BME et la BP ont aussi été comparés pour la modification chimique *in-situ* des parois d'un canal en COC. La mesure de l'angle de contact à l'interface air/eau (**figure A4.2**) montre que l'eau s'étale plus facilement sur les parois lorsqu'elles sont fonctionnalisées avec le

protocole en une seule étape à la BME (angle de 25°) que dans le cas du protocole en deux étapes à base de BP (angle de 58°).

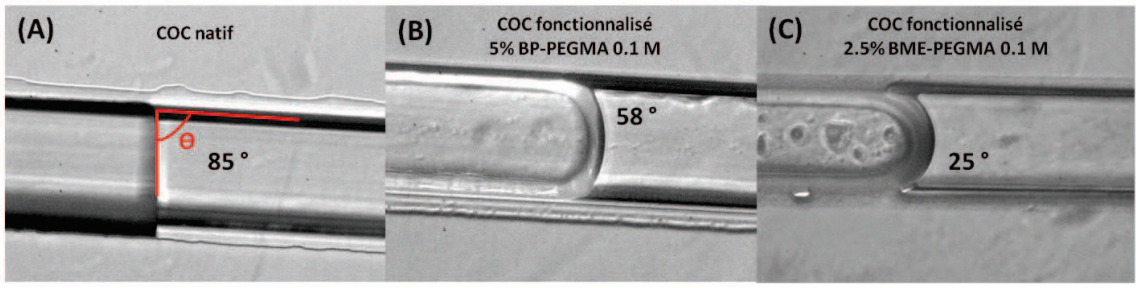


Figure A4.2 : Observation de l'interface air/eau dans un canal COC (A) natif, (B) fonctionnalisé PEGMA à partir de 5 % de BP et (C) fonctionnalisé PEGMA à partir de 2.5 % de BME.

Ces différences peuvent être expliquées, d'une part, par un manque de réactivité de la BP à 365 nm dans un environnement COC (cf partie III.2.3), et d'autre part, par la très grande réactivité de la BME dans un canal COC à cette même longueur d'onde d'irradiation.

Dans le but de comparer les mécanismes d'action des deux initiateurs, la BME et la BP ont été mis en œuvre dans un procédé en deux étapes. Le protocole utilisé est similaire à celui décrit dans la partie III.1.1. Dans une première étape, il y a une activation de la surface du COC par abstraction d'hydrogène initiée par les photoinitiateurs (BME ou BP). Dans une seconde étape, une solution PEGMA à 0.1 M diluée dans l'acétone et sans photoinitiateur est introduite en les deux plaques COC puis l'ensemble est irradié à 365 pendant 10 minutes. La **figure A4.3** montre les variations de l'angle de contact de l'eau sur la surface en fonction du temps d'irradiation et suivant l'initiateur et sa concentration.

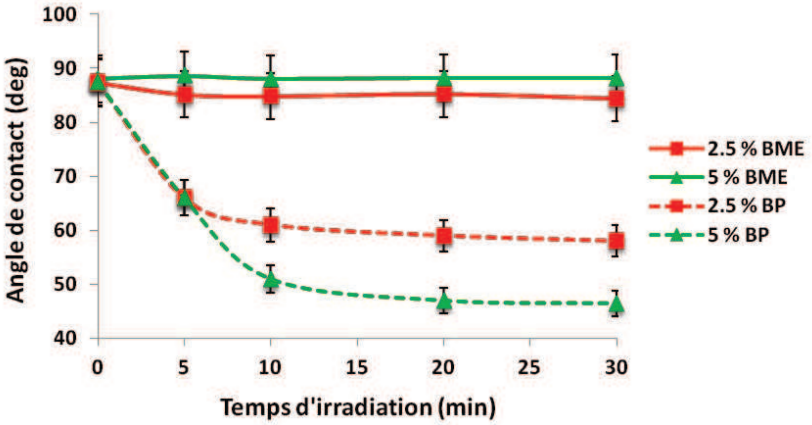


Figure A4.3 : Effet du temps d'irradiation, de la nature et la concentration en photoinitiateur sur l'angle de contact de l'eau sur la surface COC fonctionnalisée PEGMA à 0.1 M pour un protocole en deux étapes.

Comme remarqué précédemment, avec la BP, la modification chimique de la surface du COC dépend de la concentration en BP et du temps d'irradiation. Un angle de contact de 50 degrés est observé pour 5 % en poids de BP au bout de 10 minutes d'irradiation. La fonctionnalisation du COC par des monomères PEGMA à l'aide de la BP, en deux étapes, est donc effective. Dans une première étape,

des groupements semi-pinacol sont formés à la surface du COC en présence de BP. Dans une seconde étape, ces mêmes groupements peuvent ensuite se décrocher des parois en COC pour laisser place à des radicaux à la surface du COC, ce qui permet ensuite de greffer des monomères PEGMA.

Lorsque la BME est utilisée pour activer la surface du COC par abstraction d'hydrogène dans le but de greffer des monomères PEGMA, l'angle de contact ne varie pas et reste égal à 85° quelle que soit la durée d'irradiation. Ces résultats suggèrent qu'il n'y a eu aucune modification chimique de la surface du COC. Il semble que la BME ne permet pas de fonctionnaliser le COC en deux étapes bien qu'elle présente une structure chimique similaire à celle de la BP.

L'hypothèse envisagée est qu'il existe une différence de réactivité entre les produits formés à partir de la BME et de la BP. Au cours de la première étape, la BME abstrait des hydrogènes sous irradiation et crée des radicaux libres à la surface du canal COC et des radicaux benzyl en solution. En absence de monomères, ces derniers radicaux se recombinent et se lient par liaison covalente à la surface du COC pour former des groupements benzyl. L'énergie apportée par l'irradiation UV durant la seconde étape est insuffisante pour casser les liaisons covalentes des groupements benzyl qui sont beaucoup plus fortes que celles des groupements semi-pinacol formés par la BP. Cette forte énergie de liaison des groupements benzyl ne permet donc pas de greffer ensuite des monomères PEGMA à la surface du COC.

[1] Stachowiak, T., Mair, D., Holden, T., Lee, L. J.*, et al.*, *J. Sep. Sci.* 2007, *30*, 1088-1093.

TITRE en français : **Développement de microsystèmes électrochromatographiques en copolymère d'oléfine cyclique (COC)**

RESUME en français :
Ce manuscrit est consacré à l'élaboration de phases stationnaires monolithiques organiques pour les microsystèmes électrochromatographiques plastiques. La partie bibliographique situe d'abord l'intérêt des techniques électrocinétiques en microsystème. Ensuite, l'état de l'art sur l'utilisation des monolithes dans ces techniques séparatives est présenté en portant une attention particulière à la description du processus de photopolymérisation. La fonctionnalisation de surface du copolymère d'oléfine cyclique (COC) est ensuite détaillée afin d'envisager l'ancrage du monolithe aux parois du canal.
La partie expérimentale a porté tout d'abord sur le développement et la caractérisation de deux monolithes acrylates dédiés à la chromatographie à polarités des phases inversées. Le travail expérimental s'est ensuite orienté vers le développement d'un nouveau procédé permettant la synthèse et l'ancrage du monolithe dans les microcanaux en COC, ceci en une seule étape et à partir des photoinitiateurs de type I. Ce protocole permet l'obtention d'efficacités intéressantes qui restent cependant inférieures à celles obtenues en capillaire. Des adaptations des conditions d'irradiation ont alors été apportées pour la synthèse de ces monolithes à l'intérieur des microsystèmes afin d'obtenir des efficacités de l'ordre de 250 000 plateaux/m. Pour terminer, les domaines d'applications et la longévité du dispositif ont été illustrés par la séparation de différentes familles de solutés (PAH, mycotoxines, catécholamines, acides aminés, amines biogènes) et l'analyse d'échantillons réels tels que les vins (pour déterminer la teneur en certaines amines biogènes : histamine et tyramine).

TITRE en anglais : **Development of electrochromatography in cyclic olefin copolymer microsystems**

RESUME en anglais
This manuscript is dedicated to the synthesis of organic monolithic stationary phases in plastic electrochromatographic microchips. The bibliography part shows the benefit of electrokinetic techniques for microsystems. After an overview on the use of monoliths in separation techniques, the manuscript is focused on the description of photopolymerization process. Finally, a detailed review of the different protocols of functionnalization of cyclic olefin copolymer (COC) surface to allow anchoring of the monolith to the channel walls is produced.
The experimental study firstly deals with the development and characterization of two acrylate monoliths dedicated to the reversed phase mode in chromatography. Then, the experimental part focus on a new one-step method for the simultaneous synthesis and anchoring of organic monolith inside COC microchip channel, thanks to the use of type I photoinitiators. This protocol improves efficiencies which nevertheless stay below those obtained in capillary. Further, the adjustment of the irradiation conditions allows to reach up to 250 000 plates/m. Finally, the field of applications and the durability of microsystem have been illustrated by the separation of different kinds of solutes (HAP, mycotoxins, catecholamines, biogenic amines) and the analysis of real matrices such as wine samples (for the quantitative determination of two biogenic amines : histamine and tyramine).

DISCIPLINE : **Chimie Analytique**

MOTS-CLES : **Monolithe, photopolymérisation, électrochromatographie, miniaturisation, copolymère d'oléfine cyclique (COC), préconcentration.**

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE : **Institut des Sciences Analytiques, Université Lyon 1, Bâtiment Curien, Domaine scientifique de la Doua, 43 Boulevard du 11 Novembre, 69622 Villeurbanne cedex**