



HAL
open science

Colonnes monolithiques multimodales photofonctionnalisées dédiées aux techniques séparatives miniaturisées

Audrey Maréchal

► **To cite this version:**

Audrey Maréchal. Colonnes monolithiques multimodales photofonctionnalisées dédiées aux techniques séparatives miniaturisées. Chimie analytique. Université Claude Bernard - Lyon I, 2015. Français. NNT : 2015LYO10308 . tel-01315548

HAL Id: tel-01315548

<https://theses.hal.science/tel-01315548v1>

Submitted on 13 May 2016

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

Année 2015

THESE DE L 'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 18 décembre 2015

par :

Mlle Audrey MARECHAL

TITRE :

Colonnes monolithiques multimodales photofonctionnalisées dédiées aux techniques séparatives miniaturisées

JURY :

Mr Serge RUDAZ	(Rapporteur)
Mr Eric PEYRIN	(Rapporteur)
Mme Nathalie DELAUNAY	(Examineur)
Mr Arnaud SALVADOR	(Examineur)
Mme Claire DEMESMAY	(Directeur de thèse)
Mr Vincent DUGAS	(Co-directeur 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

RESUME en français

Une des évolutions dans le domaine de l'analyse chimique concerne la miniaturisation des systèmes d'analyse. Cette tendance s'accompagne du développement de nouvelles approches expérimentales basées, par exemple, sur l'intégration de plusieurs étapes analytiques, couplées en ligne en système miniaturisé. Cette intégration, en ligne, d'étapes mettant en jeu des mécanismes de séparation différents et généralement orthogonaux, implique cependant d'être capable de définir des zones (segments de colonne vides et/ou remplis de phase stationnaire) présentant des chimies de surface adaptées. L'approche choisie pour la préparation de ces colonnes « multimodales », repose sur (1) la synthèse d'un monolithe de silice poreux « générique » dans des tubes capillaires de quelques dizaines de microns de diamètre interne et (2) la modification de surface localisée dans le capillaire permettant d'apporter des propriétés de surface complémentaires. Dans le cadre de cette thèse, deux procédés de fonctionnalisation innovants, initiés par photochimie, ont été développés pour la préparation des colonnes multimodales miniaturisées : la photopolymérisation, basée sur des réactions de polymérisation radicalaire, et la « photoclick chemistry », basée sur un greffage radicalaire contrôlé (et non plus une polymérisation). Un état de l'art de leur utilisation en sciences séparatives a été dressé pour chacun des procédés, afin de guider le choix des stratégies de greffage. Après une optimisation des conditions de greffage, les résultats présentés dans ce manuscrit montrent que ces procédés de fonctionnalisation sont rapides (fonctionnalisation en quelques minutes), efficaces, polyvalents (transposables à de multiples greffons) et localisables. Leurs potentiels respectifs dans la préparation des colonnes multimodales ont ensuite été démontrés pour la préconcentration/séparation en ligne de plusieurs composés. L'approche par « click chemistry » qui permet un meilleur contrôle du greffage, a été étendue au greffage de biomolécules pour la préparation de supports d'immunoaffinité. Ainsi, une colonne multimodale composée d'une première zone remplie de monolithe photogreffée avec des aptamères et une deuxième zone vide a été préparée pour la préconcentration/séparation électrocinétique en ligne de l'Ochratoxine A.

TITRE en anglais : Photografted multimodal monolithic columns dedicated to miniaturized separation techniques

RESUME en anglais

Miniaturization of analytical processes is a general trend in analytical chemistry. Such trend is driven by the development of new experimental approaches based, for example, on hyphenated analytical steps or techniques. The in-line coupling of different and generally orthogonal/complementary separation mechanisms at the microscale, is dependent on the capability to define functional segments (open column segments and/or filled with stationary phase). Preparation of such "multimodal" capillary columns is based on (1) the in-capillary synthesis of a "generic" porous silica monolith and (2) on its localized chemical surface modification to define specific functional segments. Herein, two innovative photo-functionalization processes have been investigated for the preparation of multimodal miniaturized columns. The former, called photopolymerization is based on acrylate free radical polymerization reactions while the latter, called photografting, implements the thiol-ene "photoclick chemistry" reaction. These photo-initiated processes, after optimization, prove to be rapid (within few minutes), versatile (adapted to the grafting of various monomers) and localizable. Photopolymerization of acrylate monomers on activated silica monolith (using γ -methacryloxypropyltrimethoxysilane) gives rise to highly retentive columns due to the polymeric nature of the layer obtained. Photografting of octadecanethiol on vinylized silica columns leads to monolayer-like coating. The preparation of dedicated multimodal columns using such approaches was then successfully applied to the in-line preconcentration / separation of neuropeptides and preconcentration / fractionation of various neutral and charged compounds. The "click chemistry" approach which allows a better control of the reaction, has been extended to the grafting of biomolecules for the preparation of immunoaffinity supports. Thus, a multimodal column composed a 1-cm length aptamer-functionalized monolith at the entrance of a CZE open capillary has been prepared and successfully applied to the in-line preconcentration/electrokinetic separation of Ochratoxin A in white wine and beer.

DISCIPLINE : Chimie Analytique

MOTS-CLES : Monolithe, silice, nanochromatographie, électrophorèse capillaire, fonctionnalisation, photopolymérisation, photoclick chemistry, colonne multimodale

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :

Institut des Sciences Analytiques, 5 rue de la Doua, 69100 Villeurbanne

Remerciements

J'adresse tout d'abord mes remerciements à Mr Eric PEYRIN et Mr Serge RUDAZ pour avoir accepté de rapporter ce travail et à Mr Arnaud SALVADOR et Mme Nathalie DELAUNAY pour avoir accepté de faire partie de ce jury en tant qu'examinateurs.

Mes plus sincères remerciements s'adressent à mes deux encadrants de thèse, Mme Claire DEMESMAY et Mr Vincent DUGAS pour m'avoir accueillie au sein de leur équipe et pour m'avoir permis de diriger ce projet de recherche. Je les remercie pour les nombreuses connaissances qu'ils m'ont apportées, pour leurs conseils précieux et pour la qualité de leur encadrement. Plus personnellement, je souhaiterais les remercier pour tous ces bons moments passés ensemble, pour leur soutien au quotidien, leur gentillesse, leur disponibilité et surtout leur bonne humeur au quotidien. J'ai passé trois excellentes années en votre compagnie et je vous en suis extrêmement reconnaissante.

Je tiens à remercier vivement ma collègue et amie Racha pour m'avoir transmis son savoir-faire et ses nombreuses expériences dans le domaine des monolithes. Merci pour ton amitié, pour tous ces bons repas libanais et tous ces beaux moments que nous avons pu partager ensemble.

Je remercie aussi Mr Jérôme RANDON pour son accueil chaleureux au sein du laboratoire et pour ses anecdotes souvent très drôles!

Un grand merci également à tous les doctorants/stagiaires du laboratoire : Elodie, Josiane, Fériel, Morgan, Amélie, Louise, Félicité, Pauline, Sophie, Mériem pour tous les fous-rires ensembles, toutes nos belles discussions autour de chocolats et/ou gâteaux et pour la bonne ambiance générale qui régnait au quotidien.

Je remercie également le personnel de l'Institut des Sciences Analytiques et plus particulièrement Mr Alain BERTHOD, Mme Sabine HEINISH, Mme Karine FAURE, Mr Gérard CRETIER, Mme Florence LAGARDE, Mme Nicole GILON, Mme Florence GUILLIERE, Mme Maggy HOLOGNE, Mr Didier LEONARD et Mme Carole CHAIX, pour les discussions enrichissantes que nous avons pu avoir.

Merci aux berthollettes, Cathy, Sylvie et Julie pour leur bonne humeur et leur sympathie.

J'ai une pensée toute particulière pour mes parents, mes frères et Fred que j'aime tant et que je remercie énormément pour leur soutien au quotidien.

Enfin je souhaiterais dédier cet ouvrage à mon fils EVAN avec qui j'ai partagé une grande partie de ma thèse et qui aujourd'hui me comble de bonheur.

Principaux acronymes

ACN : Acétonitrile

AIBA : 2.2'-azobis(2-methylpropionamide)

AIBN : 2,2'-azobisisobutyronitrile

BME : Benzoinméthyléther

CBB : Bleu de Coomassie

CE : Electrophorèse capillaire

CEC : Electrochromatographie capillaire

CGE : Electrophorèse Capillaire sur Gel

CN⁻ : Ions cyanure

Colonne ODM : Colonne greffée avec l'octadécylméthacrylate

Colonne ODS : Colonne greffée avec l'ODS-DEA

CZE : Electrophorèse Capillaire de Zone

ESI : Source d'ionisation par électrospray

FEO : Flux électroosmotique

GC : Chromatographie Gazeuse

HILIC : Chromatographie liquide d'interactions hydrophiles

LIF : Fluorescence Induite par Laser

γ -MAPS : 3-méthacryloxypropyltriméthoxysilane

MEB : Microscopie Electronique à Balayage

MeOH : Méthanol

MS : Spectrométrie de masse

MudPiT : Multidimensional Protein Identification Technology

Nano-LC : Nanochromatographie Liquide

NDA : Naphtalène-2,3-dicarboxaldéhyde

ODS-DEA : Octadecyl-N,N-diéthylaminosilane

ODT : Octadécane-thiol

OTA : Ochratoxine A

SAX : Chromatographie d'échange d'anions

SCX : Chromatographie d'échange de cations

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate

SIP : Polymérisation initiée en surface

SPE : Extraction sur phase solide

TCEP : *Tris*(2-carboxyéthyl)phosphine

THF : Tétrahydrofurane

TOF : Spectromètre de masse à temps de vol

VTMS : Vinyltriméthoxysilane

Table des matières

Introduction générale	1
CONTEXTE	3
Références bibliographiques	23
Chapitre 1 : Préparation de colonnes multimodales par photopolymérisation localisée de monolithes de silice. Application à la préconcentration/séparation en ligne de la Met et Leu-enképhaline	27
Introduction	29
I. Partie bibliographique	31
I.1. Etat de l'art de la fonctionnalisation de surface par des polymères	31
I.1.1. Stratégies de greffage des polymères	32
I.1.1.1. Greffage non covalent par physisorption.....	32
I.1.1.2. Greffage covalent	32
• « Grafting to ».....	33
• « Grafting from »	33
• « Grafting through »	35
I.1.2. Le « grafting through » comme outil de fonctionnalisation des monolithes	35
I.2. La photopolymérisation ou « grafting through » photo-initié.....	42
I.2.1. Paramètres expérimentaux en photopolymérisation	43
I.2.2. Etat de l'art de la photopolymérisation sur monolithe de silice	46
Références bibliographiques	51
II. Résultats et discussion	55
II.1. « Photopolymerization of acrylamide as a new fonctionnalization way of silica monoliths for hydrophilic interaction chromatography and coated silica capillaries for capillary electrophoresis »	55
II.2. Colonnes multimodales modifiées par photopolymérisation pour l'analyse d'enképhalines par couplage « in-line » μ -SPE/dérivation sur support/CZE/LIF	63
II.2.1. Etude bibliographique.....	64
II.2.2 Partie expérimentale	70
II.2.2.1 Etude de faisabilité d'un système d'analyse en ligne pour la préconcentration/séparation de la Met et Leu-enképhaline	70
• Protocole de percolation/élution des peptides sur capillaire C12/Acrylamide.....	70
• Influence du revêtement acrylamide dans la zone de séparation des peptides	71
• Evaluation de la limite de détection atteignable avec ce système.....	73

• Conclusions et perspectives.....	74
II.2.2.2 Elaboration d'un protocole d'analyse en ligne pour la préconcentration/ dérivation/séparation de la Met et Leu-enképhaline	75
II.2.2.2.1. Séparation de la Met et Leu-enképhaline dérivées à la NDA en tube vide acrylamide	76
• Choix de l'électrolyte de séparation	76
• Créneau d'éluion	77
• Récapitulatif des conditions optimales de séparation des peptides dérivés en capillaire acrylamide.....	78
II.2.2.2.2 Mise au point de la dérivaison en off-line.....	79
a. Optimisation de la dérivaison sur support.....	80
• Protocole de dérivaison sur support.....	80
• Optimisation des conditions de percolation de la NDA.....	80
• Stabilité de la Met dérivée	82
• Détermination expérimentale du volume maximal de percolation de la Met.....	83
• Linéarité de la dérivaison sur support.....	83
• Influence du temps de dérivaison.....	84
• Récapitulatif des conditions optimales de dérivaison sur support	84
b. Essais de préconcentration/dérivaison/séparation en ligne	85
Références bibliographiques	89
 Chapitre 2 : Préparation de colonnes multimodales par photogreffage localisé (photoclick chemistry) de monolithes de silice. Application à la préconcentration/séparation en ligne de l'Ochratoxine A	93
Introduction	95
I. Développement d'un procédé de photofonctionnalisation par photoclick chemistry	97
I.1. Etat de l'art sur l'utilisation de la « click chemistry » en sciences séparatives	97
I.2. Fonctionnalisation de monolithes de silice par « thiol-ene » et « ene-thiol » photoclick chemistry	113
I.3. Polyvalence de la « ene-thiol » photoclick chemistry pour la fonctionnalisation de monolithes de silice	121
II. Préparation de supports d'affinité pour la préconcentration sélective de solutés cibles – Couplage avec l'électrophorèse capillaire	131
Conclusion générale et Perspectives	143
ANNEXES.....	147
PROTOCOLES.....	171
Références bibliographiques	179

Introduction générale

Une des évolutions dans le domaine de l'analyse chimique concerne la miniaturisation des systèmes d'analyse. Cette tendance s'accompagne du développement de nouvelles approches expérimentales basées, par exemple, sur l'intégration de plusieurs étapes analytiques, couplées en ligne en système miniaturisé. Cette intégration en ligne, d'étapes mettant en jeu des mécanismes de séparation différents et généralement orthogonaux, implique cependant d'être capable de définir des zones (segments de colonne vides et/ou remplis de phase stationnaire) présentant des chimies de surface adaptées. L'approche choisie pour la préparation de ces colonnes « multimodales », repose sur (1) la synthèse d'un monolithe de silice poreux « générique » dans des tubes capillaire de quelques dizaines de microns de diamètre interne et (2) la modification de surface localisée dans le capillaire permettant d'apporter des propriétés de surface complémentaires. Dans le cadre de cette thèse, deux procédés de fonctionnalisation innovants, initiés par photochimie, ont été développés pour la préparation des colonnes multimodales miniaturisées : la photopolymérisation, basée sur des réactions de polymérisation radicalaire et la « photoclick chemistry », basée sur un greffage radicalaire contrôlé (et non plus une polymérisation).

La première partie de ce manuscrit décrit, dans un contexte assez large, l'évolution des systèmes chromatographiques miniaturisés depuis une trentaine d'années. Cette étude sur l'ensemble des systèmes chromatographiques miniaturisés a permis de définir les stratégies utilisées pour ce travail de thèse et met en évidence les raisons de ces choix. Cette partie se conclut par la mise en place du cahier des charges proposé pour la suite des travaux.

Le premier chapitre est consacré au développement de la photopolymérisation. Afin de choisir le procédé de photopolymérisation le plus adapté pour la réalisation des colonnes multimodales par voie photochimique, un état de l'art de la fonctionnalisation de surface par des polymères a d'abord été dressé, indépendamment du mode d'initiation. Une étude plus ciblée sur la photopolymérisation est ensuite réalisée et met en évidence les différents paramètres à prendre en compte pour ce procédé. La deuxième partie de ce chapitre démontre la polyvalence de ce mode de fonctionnalisation et complète l'étude sur la photopolymérisation initiée au laboratoire. Ainsi, la photopolymérisation de monomères acrylamide a été réalisée et les résultats sont présentés sous forme de publication intitulée « Photopolymerization of acrylamide as a new functionalization way of silica monoliths for hydrophilic interaction chromatography and coated silica capillaries for capillary electrophoresis ». Les principaux paramètres (concentration en monomère et temps d'irradiation) ont été optimisés en suivant l'évolution des propriétés chromatographiques (rétention/sélectivité et efficacité) à partir de

la séparation de nucléosides en mode HILIC. Le revêtement acrylamide a ensuite été utilisé en électrophorèse capillaire pour la suppression du flux électroosmotique et la réduction des phénomènes d'adsorption. La stabilité du greffage a également été étudiée en milieu acide et basique. La troisième partie de ce chapitre présente une étude de faisabilité d'un système d'analyse en ligne pour la préconcentration/séparation de la Met et Leu-enképhaline. Des essais de dérivation sur support en vue d'un couplage préconcentration/dérivation et séparation des peptides sont également présentés.

Enfin, le deuxième chapitre est dédié à la photofonctionnalisation par chimie « click ». La première partie présentée sous forme d'une revue intitulée « Is click chemistry attractive for separation sciences ? » dresse un état de l'art de son utilisation en sciences séparatives. Les différentes réactions dites de « click » sont présentées avec leurs avantages et inconvénients respectifs. Cette étude a guidé notre choix vers l'utilisation des réactions « ene-thiol ». Les conditions de photogreffage (nature et concentration des réactifs, photoinitiateurs, thiols, durée d'irradiation) ont ensuite été optimisées en suivant l'évolution de propriétés chromatographiques (rétention/sélectivité et efficacité) des colonnes photogreffées. Les résultats sont présentés dans une « short communication » intitulée « "Thiol-ene" photoclick chemistry as a rapid and localizable functionalization pathway for silica capillary monolithic columns ». Dans un deuxième article intitulé « Versatile ene-thiol photoclick reaction for preparation of multimodal monolithic silica capillary columns », la polyvalence de cette approche est mise en évidence par le greffage de différents réactifs thiolés de façon à couvrir différents modes chromatographiques : l'octadécane-thiol pour la phase inverse, la cystéine pour le mode HILIC ou encore le mercaptoéthanesulfonate de sodium pour l'échange d'ions. La deuxième partie de l'article démontre l'intérêt de cette approche photochimique pour la préparation de colonnes capillaires monolithiques multimodales par photogreffages successifs et localisés de différents réactifs thiolés. L'approche par « click chemistry » a ensuite été étendue au greffage de biomolécules pour la préparation de supports d'immunoaffinité. Ainsi une colonne multimodale composée d'une première zone remplie de monolithe photogreffée avec des aptamères et une deuxième zone vide a été préparée pour la préconcentration/séparation électrocinétique en ligne de l'Ochratoxine A (OTA). Les résultats sont présentés dans l'article « In-line coupling of an aptamer based miniaturized monolithic affinity preconcentration unit with capillary electrophoresis and Laser Induced Fluorescence detection » présenté dans la deuxième partie de ce chapitre.

CONTEXTE

Contexte

Un des champs d'investigation scientifique majeurs de ces dernières décennies concerne la miniaturisation. Ce terme est commun à différents champs/niveau d'étude. Dans certains cas, la réduction d'échelle permet d'atteindre des propriétés physiques, chimiques et/ou physico-chimiques spécifiques ou exaltées alors que dans d'autres, la réduction d'échelle ouvre de nouvelles perspectives en termes d'utilisation.

Une illustration des relations structure-propriétés concerne par exemple l'étude des nanomatériaux. En effet, certaines nanoparticules présentent des propriétés optiques et catalytiques uniques alors que les nanotubes de carbone présentent des propriétés mécaniques ou électriques singulières. Par ailleurs, la nature exploite depuis longtemps certaines propriétés liées à des effets d'échelle. Les arbres par exemple utilisent, entre autres, les forces capillaires pour alimenter le feuillage en sève, en s'appuyant sur un réseau de millions de petits capillaires, dont les diamètres varient entre des centaines de microns et une trentaine de nanomètres [1]. L'étude et la compréhension des phénomènes de transport et de mélange de fluide en système miniaturisé ont donné naissance à une discipline à part entière en plein essor, la microfluidique.

Cette discipline, à l'instar de la microélectronique dans le domaine de l'informatique et des télécommunications, permet d'envisager la miniaturisation de systèmes fluidiques intégrant différentes fonctions, tout en étant portables. Les enjeux de la miniaturisation portent donc sur son formidable potentiel d'application. L'analyse chimique n'échappe pas à cette tendance dans la mesure où la miniaturisation ouvre des perspectives tant d'un point de vue scientifique que sociétaux. Dans le domaine de la santé par exemple, se développe le concept de médecine personnalisée. Cette émergence d'une telle médecine « à la carte » pour « le bon médicament, à la bonne personne, au bon moment » est de nature à bouleverser notre vision de la santé publique [2]. Dans cette tendance, on peut citer la commercialisation des capteurs de glycémie portables.

Dans le domaine des techniques séparatives, la miniaturisation concerne en premier lieu la diminution des dimensions des colonnes de séparation. La miniaturisation permet également d'envisager de réaliser l'ensemble des étapes, de la préparation d'échantillon au rendu du résultat, en intégrant/couplant plusieurs étapes dans un même dispositif. Cette miniaturisation permet(tra) de répondre à certaines problématiques actuelles, liées notamment aux faibles volumes d'échantillon disponibles et à leur complexité. C'est également, d'un point de vue écologique, une voix permettant de réduire les consommations de solvants et dans certains cas l'exposition à des produits dangereux (dans le domaine du nucléaire par exemple).

Le schéma « classique » des méthodes analytiques de la fin du XX^{ième} siècle a subi une mutation depuis plus d'une décennie. L'évolution des besoins (en termes de complexité, de réduction des délais, de limites de détection, de quantité d'analyses à réaliser etc..) nécessite des développements technologiques constants pour répondre aux nouvelles exigences. Comme le montre la **Figure 1**, la miniaturisation, qui facilite l'intégration et donc l'automatisation, est une des réponses apportées.

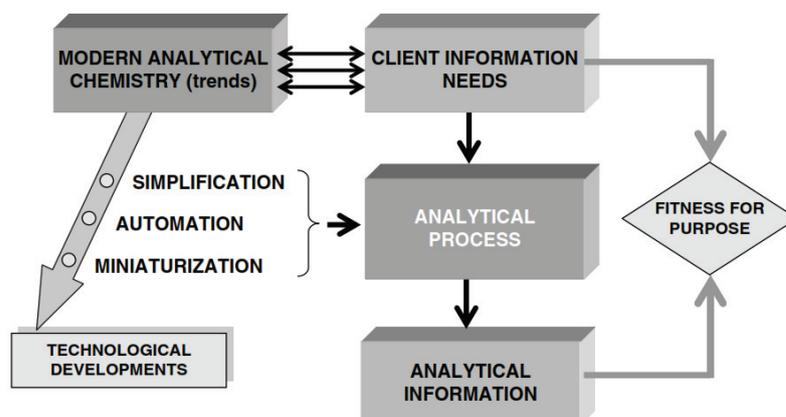


Figure 1: Diagramme présentant les relations entre les développements analytiques actuels et la tendance concernant les besoins analytiques actuels [3].

Ainsi, outre les challenges technologiques, la miniaturisation a pour finalité de répondre à des besoins de simplification, d'utilisation et d'automatisation des outils développés.

Les débuts de la miniaturisation

L'histoire de la miniaturisation des systèmes chromatographiques, comme celle d'autres techniques instrumentales, est liée aux progrès réalisés en parallèle dans d'autres domaines (fabrication des colonnes, systèmes de pompages, détection, électronique etc...). Ainsi, pour des raisons de simplicité de mise en œuvre, la miniaturisation des systèmes séparatifs a débuté fin des années 50 dans le domaine de la chromatographie en phase gazeuse. Ces développements ont été supportés d'un point de vue théorique par les résultats prometteurs des travaux de Golay portant sur la théorie de la dispersion en tube ouvert de petit diamètre interne (Open Tubular Column) [4]. Ces colonnes GC, appelées colonnes capillaires, se limitaient à des tubes métalliques (par exemple des tubes en cuivre de 1/16 in. O.D and 0.010 I.D) ou en nylon. Il est important de noter que cette miniaturisation des colonnes de séparation a nécessité, en parallèle, des adaptations au niveau des systèmes d'injection et de détection. Basé sur des techniques de fabrication empruntées à la microélectronique, Terry décrit en 1975, un système miniaturisé (microchip GC) intégrant sur une puce en silicium de quelques centimètres, une injection électromagnétique, une colonne de séparation sous forme de microcanaux gravés dans le silicium et une détection par conductivité (**Figure 2**)[1].

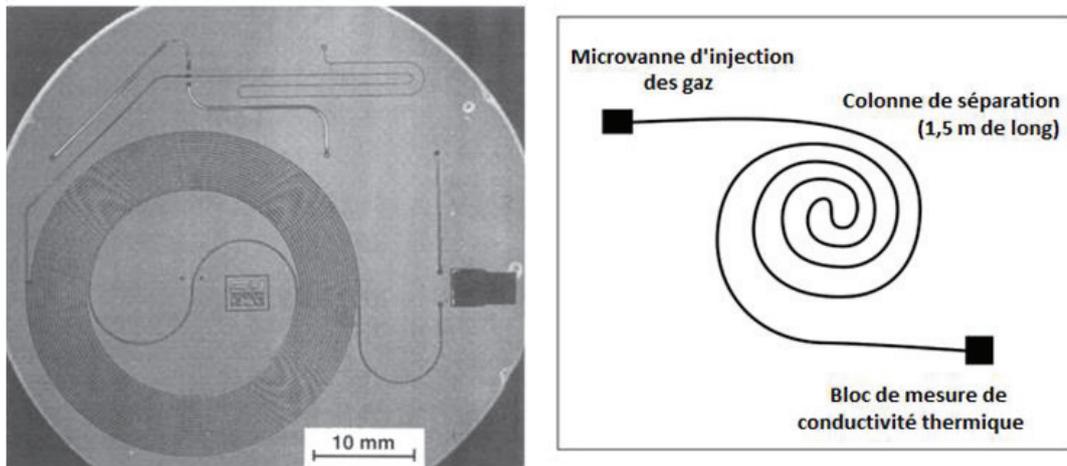


Figure 2: Représentation schématique du premier chromatographe en phase gazeuse miniaturisé, réalisé par Terry en 1975. Adapté de [1].

Quelques années plus tard, l'apparition des tubes capillaires de silice fondue marque une nouvelle ère dans le domaine des sciences séparatives. Si ces tubes souples de très faible diamètre interne (quelques dizaines à quelques centaines de microns) et de très grandes longueurs ont été l'élément clé du développement de la chromatographie en phase gazeuse capillaire « moderne », ils ont également ouvert la voie, plus tardivement, à la miniaturisation des séparations en phase liquide. Compte tenu des difficultés technologiques plus importantes associées à un écoulement de phase mobile par voie hydrodynamique (impliquant un contrôle et une stabilité de nano débits, une étanchéité de la connectique sous pression...) la miniaturisation en phase liquide a débuté par le développement des techniques électrocinétiques avant de s'étendre aux techniques chromatographiques hydrodynamiques.

Les premiers systèmes séparatifs en milieu liquide : les systèmes électrocinétiques

L'arrivée des tubes capillaires de silice fondue a ouvert la voie aux systèmes miniaturisés d'électrophorèse capillaire (EC) qui utilisent désormais une phase mobile liquide (début des années 1980). Les séparations sont réalisées en appliquant une différence de potentiel sur des électrodes placées en regard des extrémités du capillaire [5, 6]. Initialement, cette technique permet de séparer des espèces chargées (ions, molécules biologiques). La charge de surface du verre (liée à l'état d'ionisation des silanols de surface) entraîne, sous l'effet du champ électrique, un déplacement du liquide vers la cathode, c'est le flux électroosmotique. Les molécules chargées vont, en plus du flux électroosmotique, se déplacer vers l'électrode de charge opposée selon un mécanisme d'électromigration.

A l'instar de la micro-GC, des dispositifs au format d'une puce en verre voient également le jour. Une représentation schématique d'une μ chip CE est présentée **Figure 3**. Ce dispositif en croix intègre un canal d'injection, un canal de séparation et une zone dédiée à la détection. Les différentes étapes

d'injection et de séparation sont réalisées de façon électrocinétique, par application d'une différence de potentiel par le biais d'électrodes placées dans chaque puits du système.

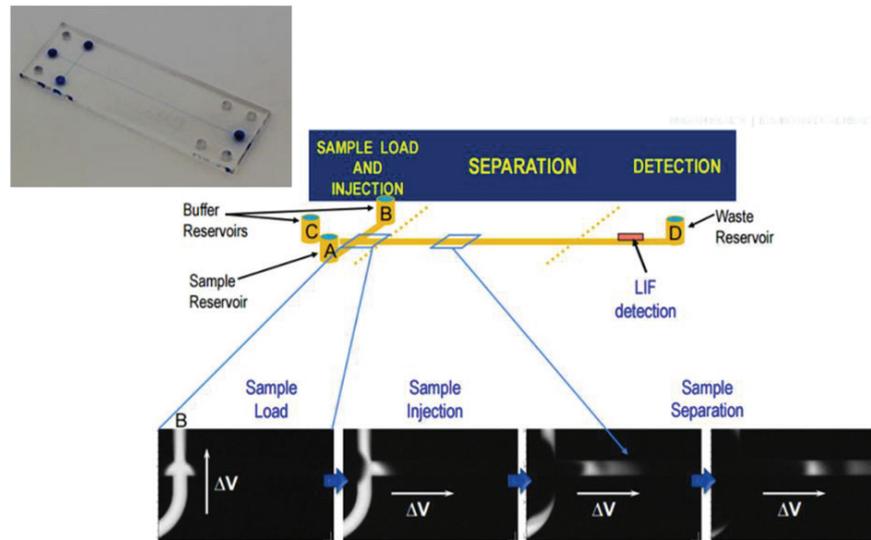


Figure 3: Représentation schématique d'une μ chip CE.

Plus chers et plus compliqués, les μ chip CE offrent, par rapport au format capillaire, la possibilité d'intégrer plusieurs étapes d'analyse sur une même puce, en limitant les sources de dispersion. Cette possibilité de réaliser l'ensemble des étapes (traitement d'échantillon, injection, séparation et détection par exemple) a donné naissance au concept de laboratoire sur puce ou μ TAS (micro Total Analysis System) dans les années 1990 [7]. L'objectif est alors de réaliser l'ensemble du processus d'analyse sur un même système miniaturisé (Figure 4).

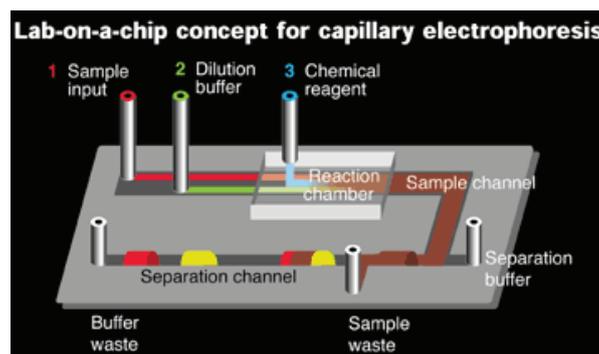


Figure 4: Représentation schématique d'un laboratoire sur puce [8].

Ce format sur puce est ainsi largement utilisé pour développer des systèmes d'analyse miniaturisés. De façon non exhaustive, nous pouvons citer des exemples de couplages d'étapes de préparation/préconcentration d'échantillon avant l'étape de séparation ou bien de systèmes intégrant des réactions de dérivation post-colonne pour permettre ou améliorer la détection. Lichtenberg et al. [9] proposent, par exemple, d'intégrer une étape de préconcentration électrocinétique en amont de

la séparation (**Figure 5.A**). Certaines configurations de canaux permettent également de réaliser des dérivations pré-colonne avec le mélange des réactifs de dérivation dans une chambre de mélange (**Figure 5.B**) [10]. Enfin, le groupe de Phillips propose même d'intégrer une étape de capture par immunoaffinité, directement dans le port d'injection afin d'analyser certaines molécules cibles de l'échantillon [11].

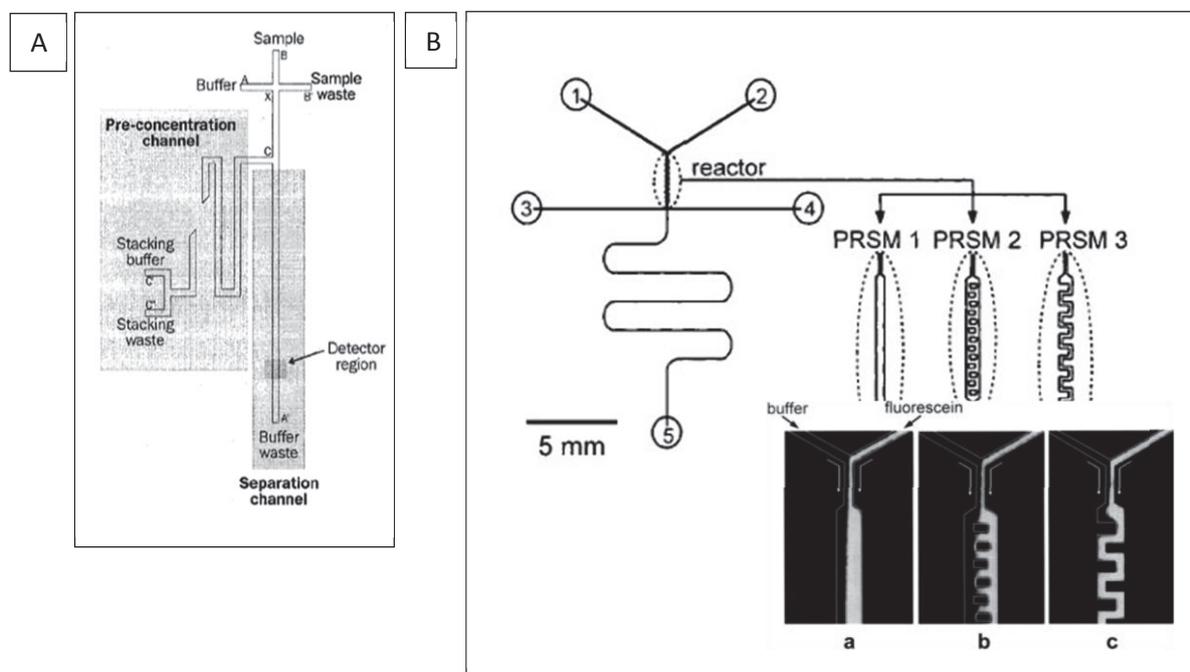


Figure 5: Exemples de μ chip CE intégrant plusieurs étapes d'analyse [9, 10].

L'étape de séparation électrophorétique peut également être accompagnée d'un système de collecte des fractions comme l'illustre la **Figure 6**.

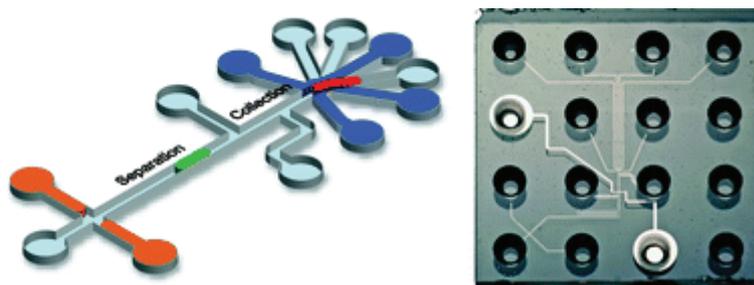


Figure 6: Schéma d'un système de séparation et de collecte sur puce [12].

Ces techniques électrocinétiques en milieu libre sont simples dans leur mise en œuvre mais se limitent à l'analyse de composés ioniques ou ionisables. Pour étendre la gamme de molécules analysables, certaines adaptations ont été envisagées. Hjertén [13] a démontré très rapidement la possibilité de réaliser des séparations en présence d'un gel, permettant la séparation de molécules chargées (protéines, ADN par exemple) en fonction de leur taille (rayon hydrodynamique). Dans le même esprit

de simplicité de mise en œuvre, il a été proposé de réaliser des séparations sous champ électrique, en présence de micelles dans l'électrolyte de séparation. On parle alors de chromatographie électrocinétique micellaire (MEKC)). Les micelles jouent le rôle de « pseudo-phase stationnaire », et l'électroosmose assure l'écoulement de la phase mobile. Comme en chromatographie en phase liquide, les molécules se séparent au cours de leur migration en fonction de leur différence d'affinité avec les micelles, ouvrant la technique à la séparation de molécules neutres.

Compte-tenu des faibles possibilités d'ajustement des sélectivités des systèmes micellaires et des contraintes liées à leur utilisation (ajout de tensioactifs à la phase mobile en mode dynamique), différents supports (phases stationnaires) sont alors développés pour la préparation des colonnes miniaturisées, destinées dans un premier temps aux techniques d'électrochromatographie capillaire (CEC).

L'approche la plus pratique, en termes de réalisation, concerne la préparation des colonnes capillaires en tube ouvert (OTC), dans lesquelles la surface interne du capillaire est recouverte avec une fine couche de phase stationnaire [14]. Cependant, les rapports de phases (volume de phase stationnaire / volume de phase mobile) sont faibles, ce qui limite la rétention dans ce type de configuration. Ces systèmes en tubes ouverts seront, dans la même période (1990), également étudiés en chromatographie en phase liquide comme nous le verrons plus tard.

Par la suite, les premières tentatives de transposition directe du mode de préparation des colonnes classiques de chromatographie en phase liquide au remplissage de colonnes capillaires par « empilement » (packing) sous pression ont permis la réalisation des colonnes capillaires particulières. Ces colonnes présentent des surfaces spécifiques élevées (plusieurs centaines de m^2/g) et donnent accès à toute la variété de supports chromatographiques. Néanmoins, le remplissage homogène et reproductible des colonnes ainsi que l'immobilisation des particules par la formation de frittés représentent un véritable défi technologique. En électrochromatographie, les différences de perméabilité entre les zones de frittés et le lit de particules sont une source d'instabilité du courant électrique et donc de manque de robustesse de ces techniques.

Une alternative aux colonnes particulières et aux contraintes de remplissage, vient de procédés visant à synthétiser/élaborer le support de chromatographie directement dans la colonne de séparation. Un premier modèle de phase stationnaire, les structures micro-fabriquées de type COMOSS (pour Collocated Monolithic Support Structure) ou réseau de piliers, a été développé grâce aux techniques de photolithographie. Ces structures sont représentées par un ensemble de plots ou de piliers ordonnés de façon étroite et dont la taille et la distribution peuvent être choisies et modulées (**Figure 7**). Ces structures parfaitement ordonnées permettent ainsi de limiter la dispersion (élargissement de bande) des solutés [15].

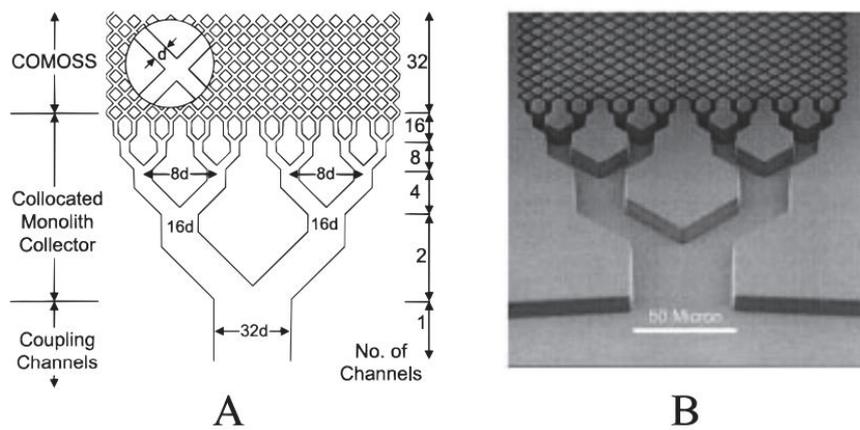
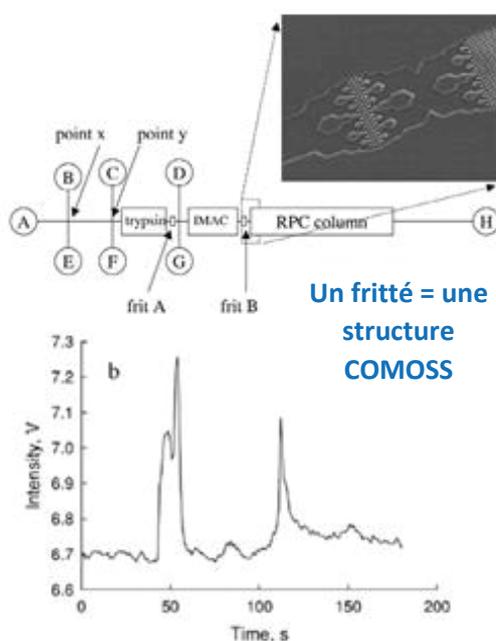


Figure 7: Représentation schématique (A) de l'entrée de la colonne COMOSS formée par un système diviseur de flux et (B) cliché MEB du dispositif microfabriqué [16].

L'introduction d'un support chromatographique a permis de réaliser des séparations complexes de composés chargés et/ou neutres au sein des systèmes miniaturisés. La diversité des supports proposés ouvre désormais la voie à de nouvelles applications avec l'intégration d'étapes de filtration, de dilution, de digestion, de préconcentration et autres. Dans l'exemple présenté **Figure 8**, des protéines sont analysées sur un microsystème intégrant 3 étapes d'analyse réalisées sur différents supports chromatographiques. Une première étape de digestion enzymatique est réalisée sur une phase particulière, suivie d'une étape de préconcentration. La séparation des peptides est ensuite réalisée par électrochromatographie sur une structure COMOSS [17].



1 : **digestion** par de la trypsine immobilisée sur des particules de silice (5 μ m)

2 : **préconcentration** par chromatographie d'affinité sur des particules de silice fonctionnalisées Cu(II) : sélection des peptides contenant de l'histidine

3 : **électrochromatographie** de ces peptides sur une structure COMOSS (phase inverse)

➤ **Application** : albumine de sérum bovin marquée à la FITC

Figure 8: Présentation de la puce proposée par le groupe de Régnier pour la digestion, préconcentration et séparation en ligne de peptides. D'après [17].

Ces structures présentent des avantages non négligeables en termes de miniaturisation en raison notamment de la facilité d'intégration. Ces structures, tout comme les microsystemes en canal ouvert, ont donc naturellement été utilisées en nano-chromatographie.

Les rétentions générées restent néanmoins faibles en raison du faible rapport surface / volume. De plus, la préparation de ces colonnes nécessite une expertise poussée en photolithographie et microtechnologie. Dans les années 2000, un intérêt particulier s'est alors porté vers la mise en œuvre de phases stationnaires monolithiques *en capillaire* dont les propriétés structurales s'avèrent très intéressantes en électrochromatographie. En effet, la structure continue des monolithes, composée d'un squelette mésoporeux et d'un réseau de macropores interconnectés, confère au matériau une grande perméabilité associée à une grande surface spécifique (**Figure 9**).

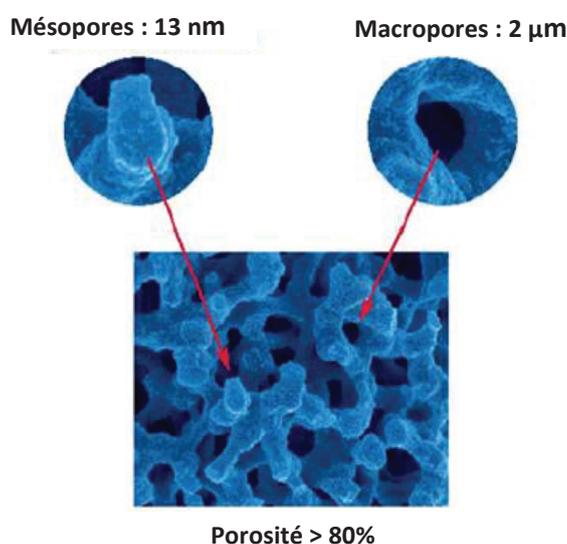


Figure 9: Image MEB d'un monolithe de silice avec un agrandissement du squelette de silice et des macropores.

Les monolithes sont regroupés dans différentes classes selon le type de monomère utilisé. La polymérisation de monomères organiques (monomères acrylate ou styrène par exemple) conduit à l'obtention de monolithes organiques, alors que le procédé sol-gel, à partir de précurseurs de silice (tetraméthoxysilane (TMOS) ou tétraéthoxysilane (TEOS) par exemple), conduit à des monolithes de silice. De façon intermédiaire, l'incorporation de précurseurs de silice porteurs de fonctions organiques permet d'obtenir des monolithes dit hybrides par co-condensation avec un précurseur de silice de type TMOS (synthèse « one-pot »). La **Figure 10** présente un microsysteme en verre dans lequel un monolithe organique a été synthétisé par irradiation UV, de façon à localiser le monolithe dans le canal de séparation [18].

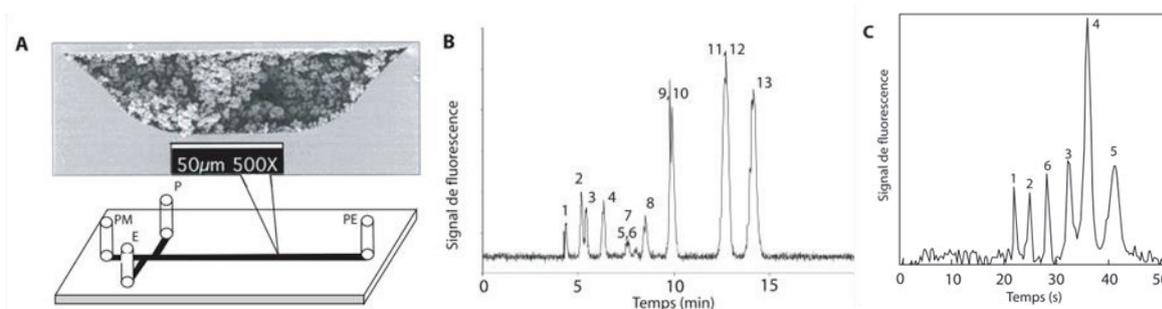


Figure 10: (A) Représentation schématique du microsystème (E, échantillon ; PM, phase mobile ; P, «pouelle») et photographie par microscopie électronique à balayage de la coupe transversale du microsystème et du canal où a été synthétisé un monolithe à base d’acrylate. (B) Electrochromatogramme correspondant à la séparation de 13 hydrocarbures aromatiques polycycliques sur un tel microsystème. 1, naphtalène. 2, acénaphtylène. 3, acénaphène. 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). $L_{sep} = 7$ cm. (C) Electrochromatogramme correspondant à la séparation de 6 peptides dérivés avec le naphtalène2,3-dicarboxaldéhyde sur un tel microsystème. 1, inhibiteur de la papaïne. 2, proctoline. 3, opioïde. 4, Ile-angiotensine III. 5, angiotensine III. 6, GGG. Phase mobile, tampon borate 25 mM – acétonitrile (7/3). Adapté de [18].

La synthèse localisable des monolithes organiques par photopolymérisation, la grande variété de monomères disponibles permettant de couvrir l’ensemble des modes chromatographiques et la stabilité au pH de ces matériaux expliquent leur utilisation en microsystème fluide. Si les monolithes inorganiques sont plus difficilement localisables en microsystème, leur structure chimique de base (silice) ainsi que leur mode de fonctionnalisation identique à celui des phases particulières de silice, rapprochent leur comportement de celui des supports de silice particulières majoritairement utilisés en chromatographie. Ils ne gonflent pas comme certains monolithes organiques en fonction du type de solvant utilisé dans la phase mobile. Ces supports sont généralement utilisés au format capillaire, le procédé sol-gel permettant leur ancrage directement à la paroi en silice du capillaire.

Le **Tableau 1** [15] présente les avantages et les inconvénients des différentes stratégies permettant d’introduire une phase stationnaire dans des microcanaux ou des capillaires de faible diamètre interne.

Tableau 1: Avantages et inconvénients des différentes phases stationnaires utilisées en systèmes miniaturisés [15].

Variant	+	-
Open channel	Can be easily realized and run Low flow resistance Thickness of stationary phase can be tuned Good for fast separations	Very limited loadability, which has repercussions on what kind of detection should be used with this variant
Packed beds	Many different materials available Good batch-to-batch Reproducibility of particles Easy to use right selectivity Different porosities available High loadability	Packing quality strongly dependent on packing skills A frit or other retaining device or design required Often high backpressure for porous particles
Monoliths	Much less backpressure than comparable particulate phases Different base chemistries available No packing and mostly no frits necessary	Batch-to-batch reproducibility still an issue Synthesis procedure (including possible wall coupling) may be dependent on chip material Inherent variations due to organic chemistry approach Limited loadability
Pillar arrays	Potentially better performance than for packed particles (reduced eddy diffusion) Can be made by nanoimprint lithography (mass producibility)	Hard to make porous When porous not necessarily much better than porous particles Can require sophisticated fabrication methods

Les prémices de la chromatographie en phase liquide en système miniaturisé

Le développement de la nanochromatographie en phase liquide a non seulement été lié à celui des colonnes chromatographiques mais également à celui des systèmes de pompage (permettant de générer des débits de l'ordre de quelques dizaines à quelques centaines de nanolitres par minute) et d'une connectique adaptée en termes de pression et de dispersion.

Comme il a été mentionné précédemment, les supports utilisés en électrochromatographie ont, en parallèle, été testés en chromatographie en phase liquide au format miniaturisé. Les premiers systèmes de chromatographie en phase liquide sur puce sont apparus dans les années 90. Manz et al [19] ont décrit un système miniaturisé de séparation chromatographique sur puce en canal vide. Le microsystème présenté **Figure 11** intègre une colonne gravée dans un support de silicium et une détection conductimétrique grâce à des électrodes placées en fin de colonne. Si la théorie concernant la dispersion en colonne capillaire ouverte (OTC) de quelques microns de diamètre interne prédit des colonnes de hautes efficacités pour de faibles pertes de charge par rapport aux colonnes remplies, ces systèmes manquent de capacité de charge [15]. Ces systèmes imposent, en outre, de bien maîtriser l'injection (quelques nanolitres) pour éviter la surcharge et la dispersion mais également d'avoir des détections assez sensibles, compte-tenu des contraintes à l'injection. Par contre, les pertes de charges sont faibles ce qui permet de travailler avec de grandes longueurs de colonnes.

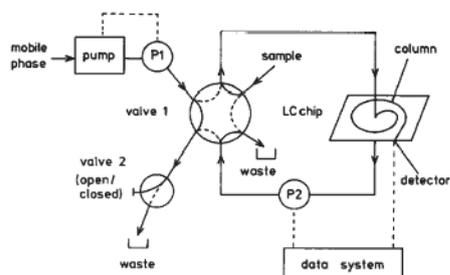
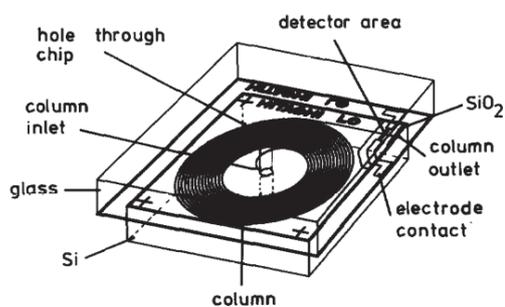


Fig. 3. Schematic diagram of the chromatographic system. Solid line: tubing, dotted line: electrical connection, P1 and P2 are pressure sensors.

Figure 11: Représentation schématique d'une micropuce LC intégrant une colonne de séparation gravée dans un support de silicium et une détection conductimétrique en sortie de colonne et une illustration du montage. Adapté de [19].

Les structures produites par lithographie (réseau de piliers ou COMOSS), comme mentionné précédemment pour l'électrochromatographie, apportent une plus grande surface spécifique d'interaction que les tubes ou canaux ouverts. Mais ces surfaces, même après élaboration de couches poreuses [20-23], restent limitées au regard de celles développées par des matériaux poreux (particulaires ou monolithiques). Néanmoins, leur compatibilité avec les procédés d'élaboration de

puce facilite leur intégration. La **Figure 12** présente une puce fluïdique comprenant un canal de séparation COMOSS et un mélangeur passif post-colonne permettant de réaliser une détection SERS [24].

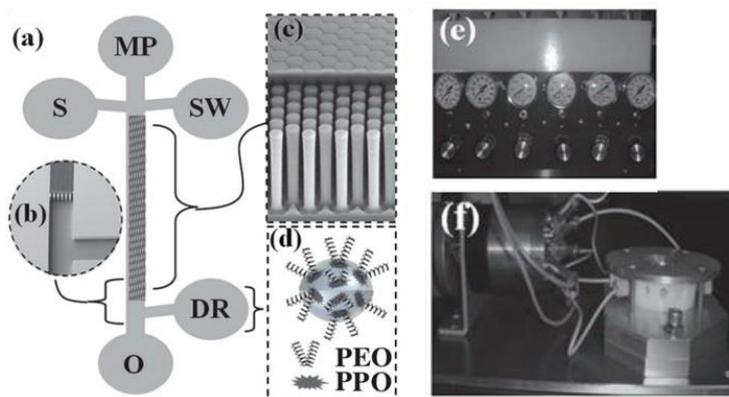


Figure 12: (a) Représentation schématique de la puce proposée par Taylor et al [24], MP (mobile phase), S (sample), SW (sample waste), O (outlet), and DR (detection reagent). Images MEB de b) la zone de dérivation post-colonne et c) la structure COMOSS dans le canal de séparation, (d) : représentation schématique du pluronique modifié avec l'AgNP, (e et f) : Images du système de pompage et de la vanne d'injection multiports.

Dans les séparations chromatographiques miniaturisées mettant en œuvre des phases stationnaires poreuses (particules ou monolithes), le format capillaire devient prédominant lorsque l'écoulement de la phase mobile est assuré en mode hydrodynamique. En effet, la stabilité mécanique des μ systemes (gravés ou moulés) n'est pas compatible avec les pressions à appliquer à l'entrée de canaux de séparation remplis [25]. Par exemple, les microsystemes en matériau organique (cyclic olefin copolymer ou COC) ne supportent pas des pressions supérieures à 20 bars [26], ce qui limite les longueurs de séparation à quelques centimètres dans le cas d'un écoulement hydrodynamique.

Initialement développés pour l'analyse à grande vitesse à une échelle non miniaturisée mais rapidement supplantés dans ce domaine par les particules submicroniques et/ou superficiellement poreuses, les monolithes de silice vont très rapidement prouver leur intérêt majeur dans le domaine de la miniaturisation de la chromatographie en phase liquide. En effet, leur mode d'élaboration (synthèse *in-situ* directement à l'intérieur du capillaire) et leurs propriétés intrinsèques (surfaces spécifiques de plusieurs centaines de m^2/g , perméabilité élevée de l'ordre de 10^{-13} - 10^{-14} m^2 , faible résistance au transfert de masse) en font des outils de choix pour la nano-LC.

Ces propriétés permettent de préparer des colonnes capillaires monolithiques de silice de grandes longueurs (supérieures à un mètre de long) [27], générant de très grandes capacités de pics, pour des pertes de charge acceptables (100 à 200 bars). Ces colonnes permettent, en outre, de réaliser des analyses à partir de très faibles quantités d'échantillon (quelques microgrammes de lysat cellulaire)

[28] et d'identifier, en une seule analyse, plusieurs dizaines de milliers de peptides tryptiques sans avoir recours à des techniques de préfractionnement préalables (« one-shot » analysis). Ces colonnes de grandes longueurs ont par exemple été utilisées pour étudier l'expression de plusieurs lignées cellulaires et permettre de les classer selon le profil protéomique obtenu (cellules souches pluripotentes induites humaines (iPSC) ou fibroblastes) [28] (**Figure 13**).

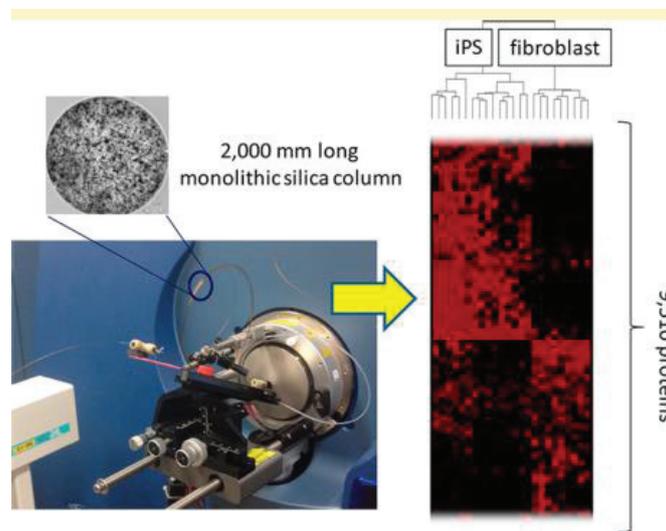


Figure 13: Illustration représentant à gauche le couplage entre une colonne monolithique de silice (longueur : 2m, diamètre interne : 100 μ m) et l'entrée du spectromètre de masse (nanospray) et à droite l'analyse du profil protéomique obtenue pour différents lysats cellulaires et leur classement selon leur origine (fibroblaste ou iPSC) [28].

Outre le nombre de peptides identifiés, la sensibilité de la détection par spectrométrie de masse semble également être améliorée sur ces colonnes. L'effet de suppression d'ion causé par la co-élution des peptides est drastiquement réduit sur ces colonnes de grandes efficacités [27].

La chromatographie en phase liquide multimodale à l'échelle miniaturisée

Les systèmes de pompage permettent désormais de contrôler des nano-débits dans les colonnes et les détecteurs ont été adaptés au format nano. L'écoulement du fluide, contrôlé par pression, permet de s'affranchir des variations du flux électroosmotique souvent dépendant du support et à l'origine d'analyses peu robustes en électrochromatographie. Néanmoins, l'intégration d'étapes dans les systèmes miniaturisés de chromatographie liquide s'avère plus difficile à mettre en place (surtout au format capillaire). Le couplage d'étapes peut être réalisé selon deux approches, « on-line » et « in-line ». Dans l'approche « on-line », le support de préparation d'échantillon (sous forme de pré-colonne) est couplé au système de séparation via une interface. Une première configuration, proposée par plusieurs auteurs [29-31] consiste à installer la pré-colonne sur une vanne 6 ou 10 voies sur laquelle sont connectées une pompe analytique et la colonne de séparation (**Figure 14**). Lorsque la vanne est en position chargement, l'échantillon est percolé à travers la pré-colonne. Les molécules d'intérêt sont

alors piégées et retenues sur le support. L'élution des composés est ensuite assurée en basculant la vanne en position élution. La phase mobile est percolée sur la précolonne pour décrocher les composés qui sont ensuite transférés puis séparés sur la colonne chromatographique.

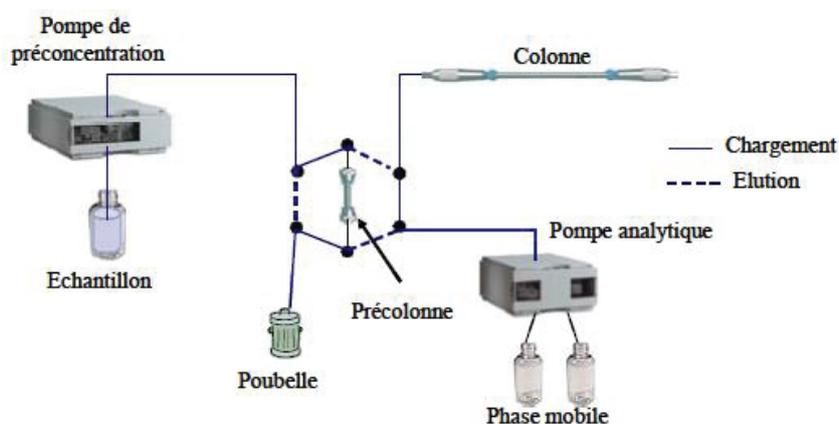


Figure 14: Représentation schématique d'un couplage « on-line ».

Ce système présente l'avantage de pouvoir réaliser des étapes de rinçage sur la précolonne sans que les impuretés ou composés indésirables ne transitent par la colonne de séparation. Néanmoins, le montage requis est particulièrement volumineux et complexe et doit être judicieusement optimisé afin de réduire la dispersion importante lors du transfert des composés de la précolonne à la colonne de séparation.

Le groupe de Liu a également proposé ce type d'approche sur format puce (**Figure 15.A**) pour la préconcentration/séparation de peptides marqués à la fluorescéine [32]. La puce proposée est constituée de deux colonnes monolithiques de géométries différentes. Un système de vannes reliées à la puce permet de contrôler la réalisation des différentes étapes de préconcentration/séparation. Fin des années 2000, les premières μ chip HPLC sont commercialisées. Agilent propose notamment la « Chip Agilent » constituée d'une précolonne de préconcentration, d'une colonne de séparation et d'une nano-aiguille métallisée utilisée comme nano-electrospray (**Figure 15.B**). Les deux colonnes sont remplies de particules maintenues par des restrictions au niveau des extrémités. Ce dispositif a permis la préconcentration de divers analytes (glycopeptides, oligosaccharides, phosphopeptides, anthocyanines...) dans des matrices relativement complexes de type sérum, lait maternel, peaux de raisin [33-35].

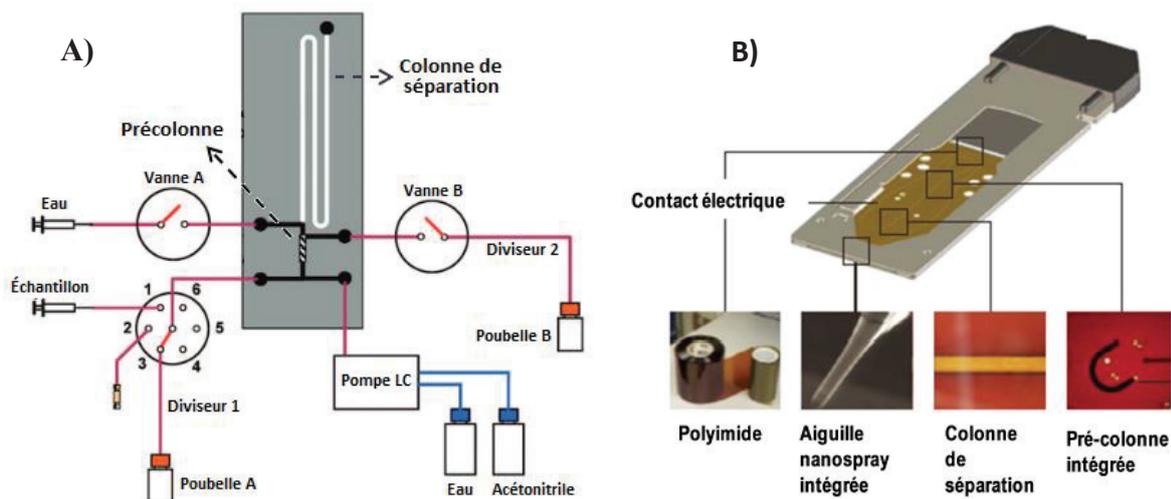


Figure 15: Différents couplages on-line sur puce proposés par A) Liu et al. Adapté de [32], et B) Agilent [36].

La capacité de séparation de ces systèmes reste tout de même limitée par les longueurs réduites des colonnes utilisées.

Dans la deuxième approche dite « in-line », les différentes étapes sont réalisées au sein d'une même colonne « multimodale » (avec différentes zones). L'échantillon est alors transféré directement vers la zone de séparation, ce qui permet de réduire considérablement la dispersion du système. Ce concept amorce l'analyse multidimensionnelle dans les systèmes miniaturisés et offre de nouvelles perspectives dans l'analyse d'échantillons complexes. Le mode MudPit (pour Multidimensional Protein Identification Technology) permet par exemple d'analyser des mélanges complexes de peptides. La colonne de séparation utilisée peut contenir plusieurs zones différentes comme présenté dans les travaux du groupe de Yates [37] (Figure 16). L'échantillon est d'abord chargé sur une première zone de phase inverse permettant de dessaler l'échantillon en milieu aqueux. Cette étape est indispensable pour éliminer les sels qui sont non compatibles avec une détection par spectrométrie de masse. Les peptides sont ensuite élués pour être préconcentrés sur une zone échangeuse d'ions. Enfin, les peptides sont élués par fractions (changement de pH, créneaux de force ionique croissantes) pour être séparés sur une dernière zone en phase inverse. Ce type d'application illustre clairement l'intérêt d'intégrer plusieurs étapes dans un même capillaire.

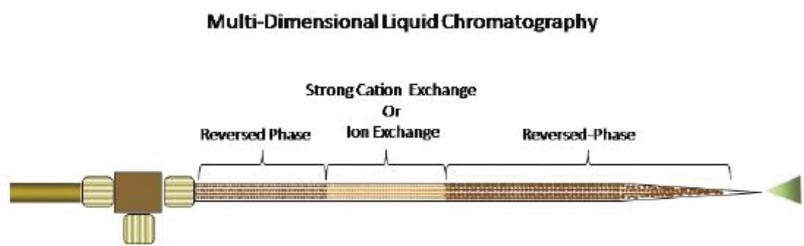


Figure 16: Représentation schématique de la colonne multimodale proposée par le groupe de Yates pour l'analyse de peptides en mode MudPit [37].

Cette intégration d'étapes, mettant en jeu des mécanismes de séparation différents et souvent

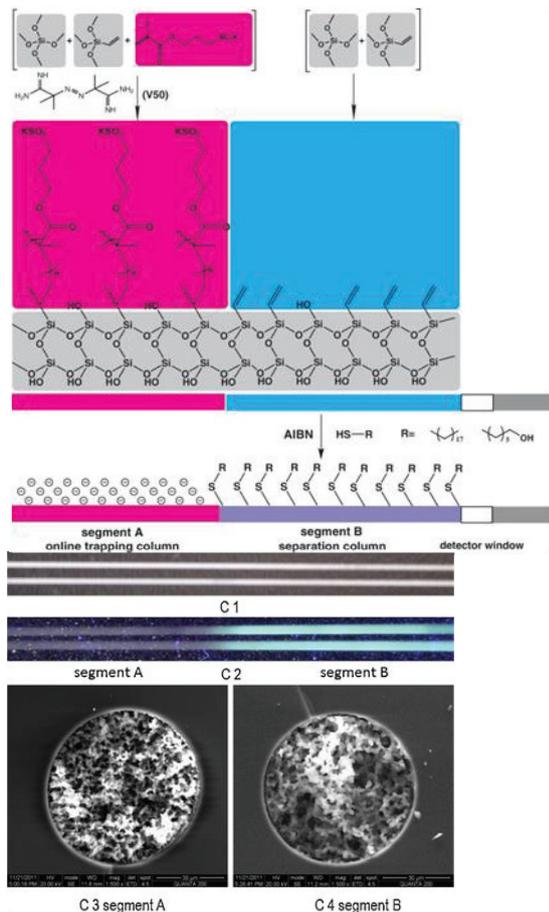


Figure 17: Elaboration d'un capillaire bimodale (segment A, colonne de piégeage et segment B, colonne de séparation) par synthèse localisée de monolithe de silice. Chaque segment est fonctionnalisé de façon différente. Les images de microscopie optique (C1) et de fluorescence (C2) sur une section de capillaire permettent de visualiser les différentes zones. Les images MEB de chaque monolithe (C3 et C4) montrent des différences de morphologie. Adapté de [39].

orthogonaux, nécessite cependant d'être capable de définir, au sein d'une même colonne, des zones présentant des chimies de surface différentes. Une première solution consiste à introduire des phases particulières de fonctionnalités variées dans des zones ciblées de la colonne. Cependant, les difficultés de remplissage déjà évoquées avec les phases particulières, de même que la réalisation souvent laborieuse des frittés semble un frein à cette approche. Une alternative intéressante est alors obtenue avec les phases monolithiques qui peuvent être synthétisées directement dans la colonne. Afin de définir les différentes zones de la colonne multimodale, deux approches ont été proposées. Dans la première approche, plusieurs monolithes présentant des chimies de surface différentes sont synthétisés de façon séquentielle. Le groupe de Hanfa Zou, par exemple, synthétise différents monolithes organiques par photopolymérisation, ce qui permet de localiser différents supports de façon contiguë dans la colonne capillaire [38]. La deuxième approche consiste à localiser physiquement la synthèse des différents monolithes par remplissage partiel de la colonne avec les mélanges de synthèse. Par exemple, Chen et al [39] synthétisent sur une première zone un

monolithe de silice en intégrant un monomère fonctionnel directement dans le mélange de synthèse tandis que la deuxième zone est constituée d'un monolithe de silice qui est ensuite fonctionnalisé thermiquement avec un thiol (**Figure 17**). Ces approches impliquent cependant la réalisation de plusieurs synthèses, ce qui s'accompagne de différences de textures, sources d'inhomogénéité d'écoulement. De plus, une réoptimisation totale des synthèses est nécessaire pour chaque changement de chimie de surface et représente un investissement de temps important.

Perspectives

Au regard de l'évolution des méthodes séparatives vers une miniaturisation et une intégration de plus en plus poussée, il nous semble intéressant de poursuivre les études portant sur le développement de colonnes capillaires multimodales/multiphasiques afin d'ouvrir la voie à des analyses d'échantillons complexes de manière automatisée et donc simplifiée. Le format capillaire est peu onéreux comparativement au format de puce fluide et aussi particulièrement pratique d'utilisation. En effet, il existe maintenant des systèmes de pompage commerciaux robustes et simples d'utilisation (ne nécessitant pas de diviseur de débit par exemple) et une large gamme de connectique « dédiée » pour relier les colonnes miniaturisées à leur environnement (pompe, détecteur, injecteur). Ce point est particulièrement important en chromatographie en phase liquide où les pressions élevées (plusieurs centaines de bars) augmentent les risques de fuites et où chaque volume mort est une source de dégradation de la qualité de séparation. Enfin, ce format est polyvalent, il convient aussi bien pour des utilisations en chromatographie en phase liquide que pour d'autres applications potentielles en électrochromatographie capillaire ou en chromatographie en phase gazeuse.

Si l'utilisation de phases stationnaires monolithiques présente, de notre point de vue, des avantages considérables en miniaturisation (synthèse *in-situ*), l'intégration de différentes fonctions chimiques de surface pour obtenir des supports multiphasiques/multimodaux en capillaire requiert néanmoins le développement de nouvelles approches d'élaboration. L'approche envisagée consiste à synthétiser un seul support monolithique « générique » efficace, afin de s'affranchir des problèmes d'hétérogénéité longitudinale de perméabilité rencontrés lors de la synthèse de supports différents. La fonctionnalisation devra permettre, ensuite, de créer les différentes zones fonctionnelles. La solution envisagée (présentée **Figure 18**) concerne l'utilisation d'une approche photochimique. Cette approche permet de réaliser des réactions localisables, de façon rapide pour éviter les phénomènes de diffusion entre les zones lors du greffage de la surface. Malgré la simplicité apparente de cette approche, peu de travaux ont été réalisés dans ce sens. Notre approche est et reste actuellement originale dans le monde des colonnes monolithiques de silice.

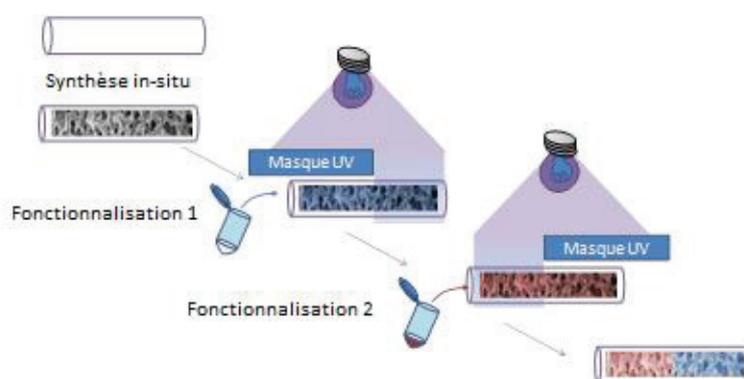


Figure 18: Représentation schématique de l'approche de photofonctionnalisation envisagée dans ce travail de thèse.

L'objectif est d'étudier et de développer des procédés simplifiés pour le développement des colonnes multimodales/multiphasiques. Parmi les différents supports disponibles, notre choix s'est porté sur les monolithes de silice qui présentent de nombreux avantages. En plus d'être synthétisables *in-situ*, ces matériaux poreux possèdent une très grande surface spécifique et une perméabilité élevée (de l'ordre de 10^{-13} m^2) qui permet de travailler avec des colonnes de grandes longueurs et d'accroître l'efficacité et la capacité de pics, sans perte de charge prohibitive. Ce travail de thèse s'appuiera donc sur l'expertise acquise par l'équipe Techsep dans la synthèse des monolithes de silice. A titre d'exemple, la courbe de Van Deemter **Figure 19** présente les performances en termes d'efficacité chromatographique des monolithes de silice synthétisés en capillaire au laboratoire. La parfaite connaissance des caractéristiques physicochimiques et des propriétés des monolithes initiaux (perméabilité, morphologie, efficacité) permettra de relier toute évolution des propriétés chromatographiques aux différentes étapes de fonctionnalisation afin de les optimiser. L'approche choisie est donc de pré-fonctionnaliser la surface de ce monolithe de référence avec des silanes fonctionnels puis d'amorcer la fonctionnalisation photochimique de monomères fonctionnels sur ces supports.

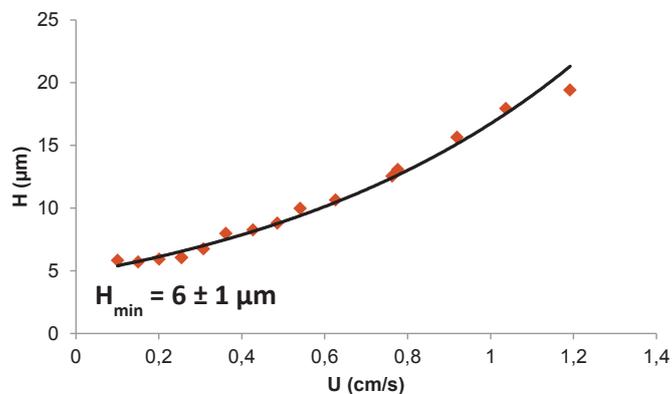


Figure 19: Courbe de Van Deemter réalisée sur une colonne de monolithe de silice $L_t = 39 \text{ cm}$, d.i. = $75 \mu\text{m}$, phase mobile : ACN/eau (95/5 ; v/v), détection UV à 214 nm, soluté injecté : caféine.

Différentes approches photochimiques peuvent être envisagées. Deux procédés de fonctionnalisation rapides et localisables seront exploités. Le premier procédé, basé sur des réactions de photopolymérisation, sera détaillé dans le premier chapitre. Si la polymérisation thermique de différents monomères a d'ores et déjà mis en évidence la possibilité d'obtenir des colonnes de capacité importante grâce à des couches épaisses de polymères synthétisés sur la surface [40], le contrôle de la taille des polymères formés reste à améliorer pour assurer le maintien des performances initiales du matériau. Une deuxième approche de fonctionnalisation par photo « click chemistry » sera

présentée dans le chapitre 2. Ce procédé, basé sur un greffage radicalaire contrôlé (et non plus une polymérisation), devrait permettre un meilleur contrôle du greffage. Après optimisation des conditions de polymérisation/greffage, la polyvalence de ces procédés et leurs potentiels respectifs dans la préparation des colonnes multimodales seront démontrés à travers diverses applications.

Références bibliographiques

- [1]. P. Tabeling, Introduction à la microfluidique, Edition Belin, Paris, 2003.
- [2]. Les enjeux de la médecine personnalisée dans le domaine de la santé publique Regards partagés entre politique, médecine, droit et éthique. in Colloque international France – Canada. 2014.
- [3]. A. Rios, A. Escarpa, B. Simonet, Miniaturization in Analytical Chemistry, John Wiley & Sons, Ltd, 2009, pp 1-38.
- [4]. M.J.E. Golay, Gas Chromatography (Amsterdam Symp.), London, 1958.
- [5]. J.W. Jorgenson, K. DeArman Lukacs, Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries: Preliminary data on performance, J. High. Resolut. Chromatogr. 4 (1981) 230-231.
- [6]. L.K. Jorgenson JW, Free-zone electrophoresis in glass capillaries, Clin. Chem. 27 (1981) 1551-1553.
- [7]. A. Manz, N. Graber, H.M. Widmer, Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing, Sensors Actuators B: Chem. 1 (1990) 244-248.
- [8]. D.J. Harrison, K. Fluri, K. Seiler, Z. Fan, C.S. Effenhauser, A. Manz, Micromachining a miniaturized capillary electrophoresis-based chemical analysis system on a chip [op.36], Science 261 (1993) 895-897.
- [9]. J. Lichtenberg, E. Verpoorte, N.F. de Rooij, Sample pre-concentration by field amplification stacking for microchip-based capillary electrophoresis, Electrophoresis 22 (2001) 258-271.
- [10]. L.K. Ro KW, Kim H, Hahn JH., Poly(dimethylsiloxane) microchip for precolumn reaction and micellar electrokinetic chromatography of biogenic amines, Electrophoresis 23 (2002) 1129-1137.
- [11]. T.M. Phillips, Rapid analysis of inflammatory cytokines in cerebrospinal fluid using chip-based immunoaffinity electrophoresis, Electrophoresis 25 (2004) 1652-1659.
- [12]. D.R. Zalewski, S. Schlautmann, R.B.M. Schasfoort, H.J.G.E. Gardeniers, Electrokinetic sorting and collection of fractions for preparative capillary electrophoresis on a chip, Lab on a Chip 8 (2008) 801-809.
- [13]. S. Hjertén, High-performance electrophoresis: the electrophoretic counterpart of high-performance liquid chromatography, J. Chromatogr. A 270 (1983) 1-6.
- [14]. S.R. Mueller, W. Simon, H.M. Widmer, K. Grolimund, G. Schomburg, P. Kolla, Separation of cations by open-tubular column liquid chromatography, Anal. Chem. 61 (1989) 2747-2750.
- [15]. J.P. Kutter, Liquid phase chromatography on microchips, J. Chromatogr. A 1221 (2012) 72-82.
- [16]. B. He, N. Tait, F. Regnier, Fabrication of Nanocolumns for Liquid Chromatography, Anal. Chem. 70 (1998) 3790-3797.
- [17]. P.N. Slentz BE, Regnier FE., Protein proteolysis and the multi-dimensional electrochromatographic separation of histidine-containing peptide fragments on a chip, J. Chromatogr. A 984 (2003) 97-107.
- [18]. B.M.D.-B.N.R. Jean-Louis, Microsystèmes lab-on-chip et séparations de type chromatographique = Lab-on-chip microsystems and chromatographic kind separations, Spectra analyse 34 (2005) 17-28.
- [19]. Y.M. A. Manz, J. Miura, Y. Watanabe, H. Miyagil and K. Sato, Design of an Open-tubular Column Liquid Chromatography Using Silicon Chip Technology, Sensors and Actuators B (1990) 249-255.
- [20]. W. De Malsche, D. Clicq, V. Verdoold, P. Gzil, G. Desmet, H. Gardeniers, Integration of porous layers in ordered pillar arrays for liquid chromatography, Lab on a Chip 7 (2007) 1705-1711.
- [21]. W.D. Malsche, H. Gardeniers, G. Desmet, Experimental Study of Porous Silicon Shell Pillars under Retentive Conditions, Anal. Chem. 80 (2008) 5391-5400.
- [22]. R.M. Tiggelaar, V. Verdoold, H. Eghbali, G. Desmet, J.G.E. Gardeniers, Characterization of porous silicon integrated in liquid chromatography chips, Lab on a Chip 9 (2009) 456-463.

- [23]. F. Detobel, S. De Bruyne, J. Vangelooven, W. De Malsche, T. Aerts, H. Terry, H. Gardeniers, S. Eeltink, G. Desmet, Fabrication and Chromatographic Performance of Porous-Shell Pillar-Array Columns, *Anal. Chem.* 82 (2010) 7208-7217.
- [24]. L.C. Taylor, T.B. Kirchner, N.V. Lavrik, M.J. Sepaniak, Surface enhanced Raman spectroscopy for microfluidic pillar arrayed separation chips, *Analyst* 137 (2012) 1005-1012.
- [25]. M.-L. Riekkola, Editorial on "Liquid phase chromatography on microchips" by J.P. Kutter, *J. Chromatogr. A* 1221 (2012) 71.
- [26]. Y. Ladner, A. Bruchet, G. Cretier, V. Dugas, J. Randon, K. Faure, New "one-step" method for the simultaneous synthesis and anchoring of organic monolith inside COC microchip channels, *Lab on a Chip* 12 (2012) 1680-1685.
- [27]. M. Iwasaki, N. Sugiyama, N. Tanaka, Y. Ishihama, Human proteome analysis by using reversed phase monolithic silica capillary columns with enhanced sensitivity, *J. Chromatogr. A* 1228 (2012) 292-297.
- [28]. R. Yamana, M. Iwasaki, M. Wakabayashi, M. Nakagawa, S. Yamanaka, Y. Ishihama, Rapid and Deep Profiling of Human Induced Pluripotent Stem Cell Proteome by One-shot NanoLC-MS/MS Analysis with Meter-scale Monolithic Silica Columns, *Journal of Proteome Research* 12 (2013) 214-221.
- [29]. F.W.A. Tempels, W.J.M. Underberg, G.W. Somsen, G.J. de Jong, On-line coupling of SPE and CE-MS for peptide analysis, *Electrophoresis* 28 (2007) 1319-1326.
- [30]. F. Brothier, V. Pichon, Immobilized antibody on a hybrid organic-inorganic monolith: Capillary immunoextraction coupled on-line to nanoLC-UV for the analysis of microcystin-LR, *Anal. Chim. Acta* 792 (2013) 52-58.
- [31]. M. Cichna, P. Markl, D. Knopp, R. Niessner, On-line coupling of sol-gel-generated immunoaffinity columns with high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 919 (2001) 51-58.
- [32]. J. Liu, C.-F. Chen, C.-W. Tsao, C.-C. Chang, C.-C. Chu, D.L. DeVoe, Polymer Microchips Integrating Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography Using Reversed-Phase Polymethacrylate Monoliths, *Anal. Chem.* 81 (2009) 2545-2554.
- [33]. R. Flamini, M. De Rosso, A. Smaniotto, A. Panighel, A.D. Vedova, R. Seraglia, P. Traldi, Fast analysis of isobaric grape anthocyanins by Chip-liquid chromatography/mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23 (2009) 2891-2896.
- [34]. M.R. Niñonuevo, P.D. Perkins, J. Francis, L.M. Lamotte, R.G. LoCascio, S.L. Freeman, D.A. Mills, J.B. German, R. Grimm, C.B. Lebrilla, Daily Variations in Oligosaccharides of Human Milk Determined by Microfluidic Chips and Mass Spectrometry, *J. Agric. Food. Chem.* 56 (2008) 618-626.
- [35]. C.S. Chu, M.R. Niñonuevo, B.H. Clowers, P.D. Perkins, H.J. An, H. Yin, K. Killeen, S. Miyamoto, R. Grimm, C.B. Lebrilla, Profile of native N-linked glycan structures from human serum using high performance liquid chromatography on a microfluidic chip and time-of-flight mass spectrometry, *Proteomics* 9 (2009) 1939-1951.
- [36]. Brochure Agilent: Disponible sur: <http://www.chem.agilent.com/Library/brochures/5990-6221EN.pdf> (consulté en mai 2015)
- [37]. C.M.D.a.J.R.Y. III, *MudPIT: multidimensional protein identification technology*, in *BioTechniques* 2007: Department of Physiological Chemistry, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA.
- [38]. F. Wang, J. Dong, M. Ye, X. Jiang, R.a. Wu, H. Zou, Online Multidimensional Separation with Biphasic Monolithic Capillary Column for Shotgun Proteome Analysis, *Journal of Proteome Research* 7 (2008) 306-310.
- [39]. Y. Chen, K. Wang, H. Yang, Y. Liu, S. Yao, B. Chen, L. Nie, G. Xu, Synthesis of sulfo/vinyl biphasic silica hybrid monolithic capillary column and its application to on-column preconcentration for capillary electrochromatography, *J. Chromatogr. A* 1233 (2012) 91-99.
- [40]. O. Núñez, T. Ikegami, W. Kajiwara, K. Miyamoto, K. Horie, N. Tanaka, Preparation of high efficiency and highly retentive monolithic silica capillary columns for reversed-phase

chromatography by chemical modification by polymerization of octadecyl methacrylate, J. Chromatogr. A 1156 (2007) 35-44.

CHAPITRE 1

**Préparation de colonnes multimodales par
photopolymérisation localisée de monolithes de silice**

-

**Application à la préconcentration/séparation en ligne
de la Met et Leu-enképhaline**

Introduction

Lorsque ces travaux de thèse ont commencé, l'approche innovante et originale de photopolymérisation soulevait plusieurs interrogations. Premièrement, la polymérisation réalisée généralement sur des surfaces planes [1-3] ou dans des formats « batchs » [4-6] était ici envisagée sur des matériaux mésoporeux et en milieu confiné (à l'intérieur d'un capillaire). Bien que la silice soit connue pour être transparente aux UV, il n'était pas certain que l'irradiation, réalisée à travers le matériau, permette de créer des couches homogènes sur l'ensemble d'une section du monolithe. Ce point lié à l'hétérogénéité radiale est critique en chromatographie, de façon à conserver les performances intrinsèques du support chromatographique en termes d'efficacité. Néanmoins, l'initiation photochimique, réalisée sur un capillaire rempli au préalable de monomère, devrait permettre d'obtenir un greffage homogène en longueur, contrairement à certaines réactions de fonctionnalisation (par silanisation par exemple) réalisées en mode dynamique, sous circulation du mélange de greffage. Dans ce type de greffage, les réactifs réagissent au fur et à mesure de leur introduction dans le capillaire, ce qui nécessite parfois de retourner la colonne en cours de réaction pour éviter de créer des gradients de densité de greffage entre le port d'entrée des réactifs et la sortie du capillaire [7]. Dans le cas où, il n'y a pas un renouvellement des réactifs au cours de la réaction, l'approche par photochimie soulève également la question de la quantité de monomères disponibles dans le volume de solution de greffage. En effet, dans un greffage photochimique, la concentration en monomère dans le volume de la zone à greffer (correspondant au volume mort de cette zone) doit être suffisamment importante pour obtenir des densités de greffage intéressantes. Enfin, l'objectif à terme visant à obtenir des chimies de surface variées nécessite de pouvoir greffer une large gamme de monomères dans des conditions compatibles avec les propriétés intrinsèques du monolithe (stabilité, perméabilité, efficacité).

Afin de choisir le procédé de photopolymérisation le plus adapté pour la réalisation des colonnes multimodales par voie photochimique, un état de l'art de la fonctionnalisation de surface par des polymères a d'abord été dressé, indépendamment du mode d'initiation. Une étude plus ciblée sur la photopolymérisation sera ensuite présentée.

I. Partie bibliographique

I.1. Etat de l'art de la fonctionnalisation de surface par des polymères

La fonctionnalisation de surfaces par des films de polymères est utilisée depuis longtemps dans des domaines aussi divers que l'optique, l'automobile, la chimie ou encore pour des applications médicales et dentaires (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Exemples d'applications des films de polymères en surface. D'après [8].

Monomères	Polymères-Tronc	Propriétés	Applications
Monomères à fonction ammonium quaternaire Acrylonitrile, acrylate de cuivre, d'argent Monomères mercuriels covalents Greffons microradioactifs à faible période	Cellulose (viscose, papier, coton)	Bactéricide Sporicide Anticryptogamique Antiseptique	Milieux autostériles (stérilisation d'effluent par filtration à grand débit) Matériaux imputrescibles
Acrylate de calcium Acrylate de baryum	Cellulose (viscose, papier, coton)	Hémostatique Opacité aux RX	Applications médicales et spéciales
Monomères fluorés (perfluorés)	Cellulose (viscose, papier, coton)	Imperméabilisation Perméation Antitaches Inertie chimique Hydrophobie Antisalissure	Textiles divers Protection contre les environnements agressifs Anti-adhérent ou antifriction Revêtement
Monomères ioniques : Acide acrylique, méthacrylique, acrylate de diéthylaminoéthyle quaternisé ou non, dérivés sulfoniques de l'acrylamide, dérivé de la 8-hydroxy quinoléine	Tout support	Echange d'ions faibles et forts séquestrants et complexants spécifiques Propriétés variables selon la nature de l'agent associé	Techniques séparatives diverses pour l'épuration, l'extraction, la purification, la chromatographie, etc. Préconcentration Membranes d'électrodialyse Propriétés barrières

La modification de la surface d'un matériau par une couche de polymère permet généralement d'introduire de nouvelles caractéristiques comme la dispersibilité dans un milieu organique, la protection contre la corrosion, la biocompatibilité... Suivant leur nature chimique, les polymères ont la capacité de modifier les propriétés de surface en réponse à des stimuli environnementaux (e.g. qualité du solvant, température, lumière). En chromatographie, la fonctionnalisation de phases stationnaires par des polymères est utilisée principalement pour obtenir des rapports de phase plus intéressants et/ou des chimies de surface variées [9-12], ou encore pour apporter aux supports des propriétés particulières (exemples des polymères thermosensibles [13-15]). Différentes stratégies sont présentées dans la littérature pour introduire des polymères sur une surface.

I.1.1. Stratégies de greffage des polymères

Le greffage de polymères sur une surface peut se faire soit de manière non-covalente, par physisorption des chaînes de polymère grâce à des interactions faibles (électrostatiques, Van der Waals, liaisons hydrogène), soit de manière covalente en créant une liaison covalente entre les chaînes du polymère et la surface.

I.1.1.1. Greffage non covalent par physisorption

D'une manière générale, la physisorption de polymères sur une surface est réalisée par l'interaction de l'une des extrémités de la chaîne polymérique avec la surface [16](**Figure 20**). Cette physisorption est rendue possible par l'utilisation d'un solvant dit « sélectif » (favorisant l'adsorption) qui permet de contrôler l'adsorption ou la désorption des polymères. Néanmoins, les supports formés sont sensibles aux solvants et les polymères peuvent se désorber (processus réversible). Au vu de la grande diversité des phases mobiles utilisées en chromatographie, cette technique ne peut être envisagée pour la préparation de colonnes chromatographiques. De plus, la physisorption des polymères ne permet pas d'obtenir un greffage localisé sur la surface.

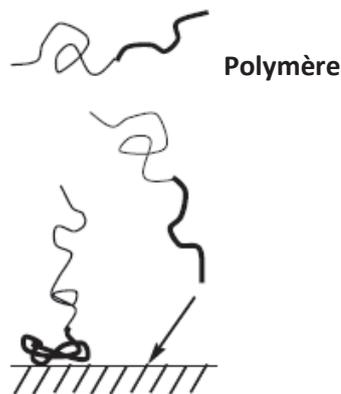


Figure 20: Représentation schématique de la physisorption de polymères en surface.

I.1.1.2. Greffage covalent

Le greffage covalent de polymères en surface reste la technique la plus appropriée pour la préparation des phases stationnaires. Les supports fonctionnalisés sont beaucoup plus résistants et mieux définis. Trois approches sont proposées dans la littérature pour le greffage covalent de polymères: « grafting to », « grafting from » et « grafting through ».

- « **Grafting to** »

Le « grafting to » est une méthode d'immobilisation qui consiste à faire réagir un polymère déjà « préformé » avec des sites appropriés de la surface [17, 18] (**Figure 21**). Une étape de fonctionnalisation préalable de la surface est souvent requise pour assurer l'ancrage du polymère sur la surface. Cette technique offre une grande diversité de combinaisons polymère-support. Cependant, l'inconvénient majeur de cette technique concerne les densités de greffage relativement faibles liées à une augmentation de l'encombrement stérique au fur et à mesure de l'avancement du greffage des « poils » de polymères sur la surface [19, 20]. De plus, la texture mésoporeuse du support monolithique peut être un frein à la diffusion des polymères pré-formés à l'intérieur du réseau poreux, limitant la surface accessible au greffage (risque d'exclusion des polymères).

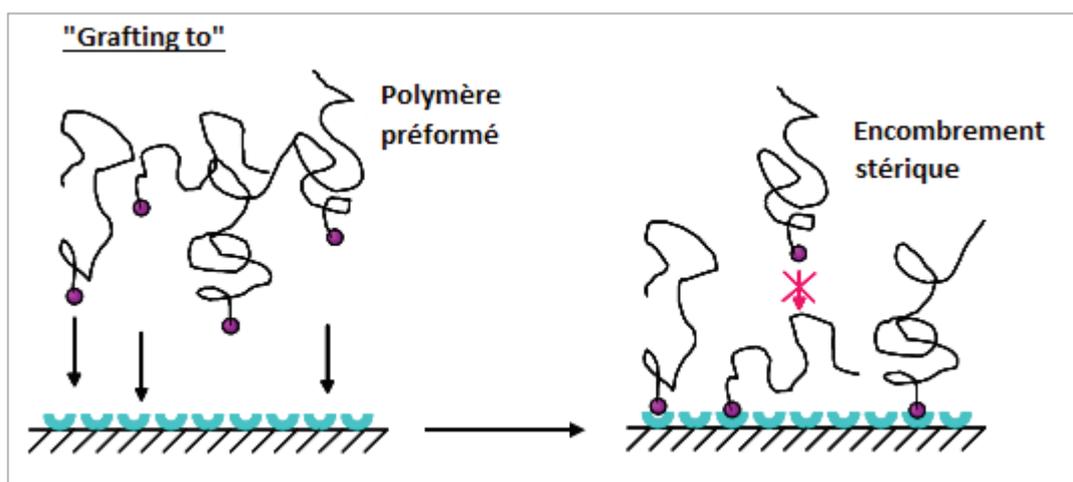


Figure 21: Principe de la fonctionnalisation par « grafting to ».

Une polymérisation à partir de la surface, mettant en œuvre des monomères en solution, semble donc plus appropriée.

- « **Grafting from** »

Cette deuxième approche « grafting from » permet, quant à elle, de faire grandir des chaînes de polymère directement à partir de la surface du monolithe [21, 22]. Un amorceur de polymérisation est préalablement greffé de manière covalente à la surface du matériau, puis activé dans une première étape d'initiation. L'ajout du monomère dans le milieu réactionnel permet ensuite d'amorcer la polymérisation en surface (**Figure 22**). Les monomères réactionnels ne subissent pas de gêne stérique et diffusent facilement vers la surface en expansion pour former des « brosses de polymères ».

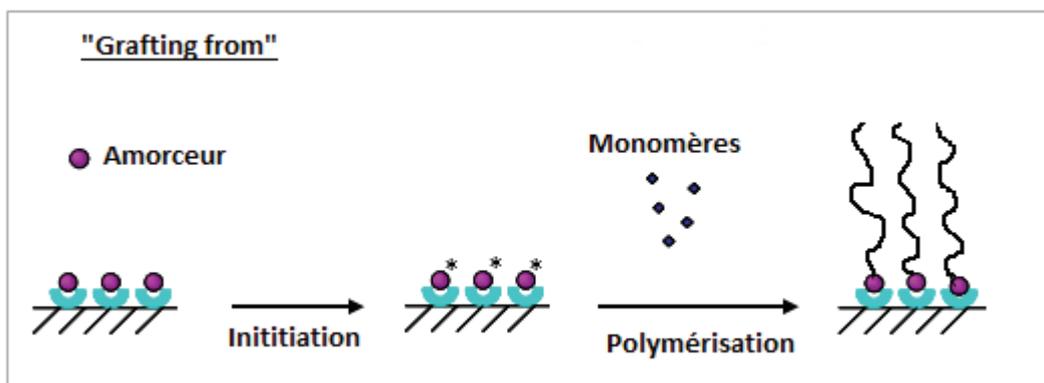


Figure 22: Principe de la fonctionnalisation par « grafting from ».

Cette approche met en jeu des réactions de polymérisation radicalaire initiées à partir de la surface (SIP) qui peuvent être soit libres, soit contrôlées (réactions ATRP (Atom Transfer Radical Polymérisation) et NMP (Nitroxide Mediated Polymerization)) pour une meilleure maîtrise de la taille et de la polydispersité des polymères synthétisés.

Plusieurs auteurs ont déjà rapporté l'efficacité de cette approche pour la fonctionnalisation de colonnes chromatographiques à base de silice [13, 23-26]. Néanmoins, les réactions SIP présentent plusieurs inconvénients pour la préparation de colonnes multimodales. Premièrement, certaines réactions ne peuvent être initiées que thermiquement (cas des réactions NMP) ou sont catalysées par un complexe de métal de transition (cas des réactions ATRP) et ne peuvent donc pas être localisées. De plus, dans le cas des réactions ATRP, l'utilisation d'ions métalliques difficilement éliminables à l'issue de la polymérisation, peut entraîner une pollution du matériau et semble donc peu judicieuse. Enfin, toutes les réactions initiées à partir de la surface impliquent la présence de fonctions spécifiques (par exemple des fonctions nitroxydes, azo ou peroxyde) sur la surface du monolithe, fonctions qui doivent être introduites au préalable par une réaction de silanisation. Or, il s'avère difficile de trouver des silanes commerciaux porteurs de ces fonctions, ce qui impose souvent de préparer l'amorceur via une succession d'étapes [23, 24]. Par exemple, Boven *et al* [27] ont traité des billes de verre par du 3-aminopropyltriéthoxysilane (γ -APS) pour obtenir des groupements amine sur la surface. Les amorceurs azo ont été ensuite immobilisés à travers la formation de liaisons amide entre la surface modifiée par le γ -APS et un amorceur de type azo fonctionnalisé par un chlorure d'acide. Ils ont pu ainsi synthétiser des chaînes de poly (méthacrylate de méthyle). Pour des raisons pratiques, cette méthode de greffage impliquant de multiples étapes ne sera pas envisagée.

- « *Grafting through* »

L'approche « *grafting through* » représente le moyen le plus simple de greffer des polymères en surface [28, 29]. Cette approche impose simplement de pré-fonctionnaliser la surface du monolithe avec un silane porteur d'une double liaison en bout de chaîne (acrylate, méthacrylate, acrylamide...). Le monomère fonctionnel introduit en solution est ensuite polymérisé soit directement à la surface du monolithe soit d'abord en solution puis greffé sur la surface (**Figure 23**).

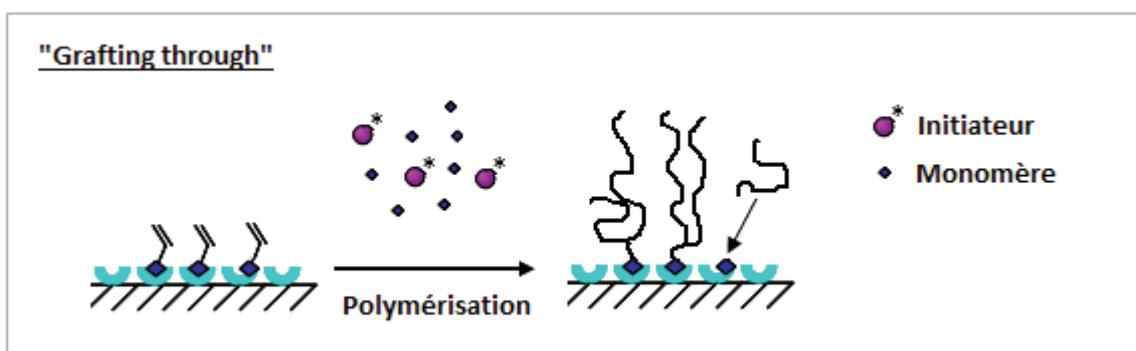


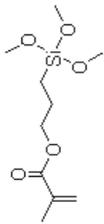
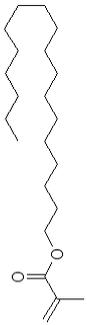
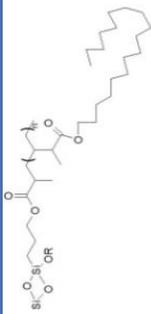
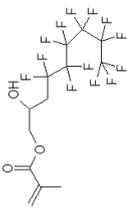
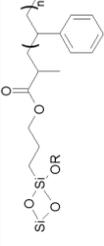
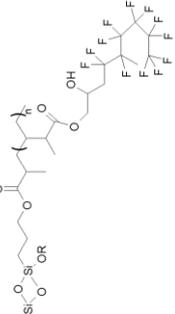
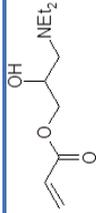
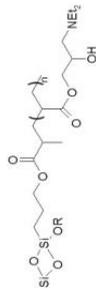
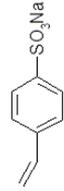
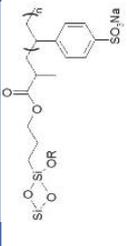
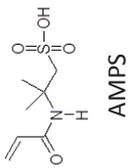
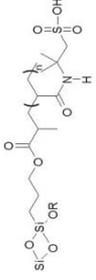
Figure 23: Principe de la fonctionnalisation par « *grafting through* ».

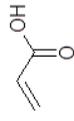
Les différents travaux réalisés selon cette approche, la plus largement utilisée pour la fonctionnalisation in-situ des monolithes compte tenu de sa simplicité et de la grande diversité des monomères polymérisables, sont détaillés dans le paragraphe suivant.

I.1.2. Le « *grafting through* » comme outil de fonctionnalisation des monolithes

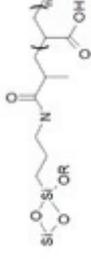
De nombreux travaux rapportent la fonctionnalisation de monolithes de silice par cette approche de « *grafting through* » à partir de monomères variés (**Tableau 3**). Les réactions radicalaires décrites sont exclusivement initiées par voie thermique et nécessitent généralement plusieurs heures. Cependant, ces travaux démontrent la possibilité de couvrir l'ensemble des modes chromatographiques tels que la phase inverse [30-32], l'échange d'ions (anions ou cations) [33-35] ou la chromatographie d'interactions hydrophiles HILIC [33, 36-38].

Tableau 3: Présentation des différents monomères utilisés pour la fonctionnalisation de monolithes de silice par l'approche « grafting through ».

Silane introduit sur la surface	Type de monomère employé	Monolithe après fonctionnalisation par polymérisation	Mode HPLC
 <p>3-methacryloxypropyltriméthoxylosilane</p>	 <p>Octadécyl méthacrylate</p>		Phase inverse [30-32]
<p>propyl</p> <p>triméthoxylosilane</p>	 <p>Styrène</p>  <p>3-perfluorohexyl-2-hydroxypropyl acrylate (PFHPA)</p>	 	Phase inverse [32]
<p>3-Méthacryloxypropyltriéthoxylosilane</p>	 <p>3-diéthylamino-2-hydroxypropyl méthacrylate (DAHMA)</p>		Echange d'anions [35]
<p>3-Méthacryloxypropyltriéthoxylosilane</p>	 <p>Sel de l'acide p-styrènesulfonique (pSSA)</p>		Echange de cations [35]
<p>3-Méthacryloxypropyltriéthoxylosilane</p>	 <p>AMPS</p>		Echangeur de cations [35]

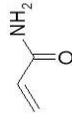


Acide acrylique



HILIC [33, 38]

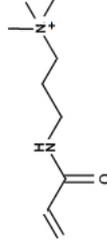
Echange de cations [33]



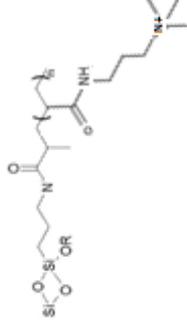
Acrylamide



HILIC [36]

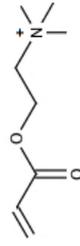


Sel du N,N-Diméthylaminopropylacrylamide méthylchlorure



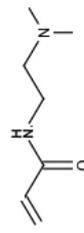
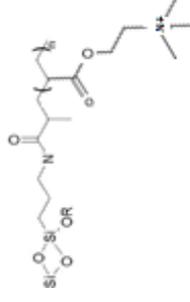
N-(3-triméthoxysilyl

propyl) méthacrylamide

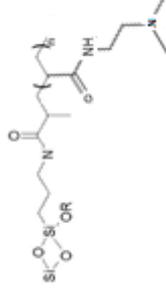


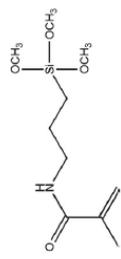
Echange d'anions [34]

Sel du N,N-Diméthylaminoéthylacrylate méthylchlorure

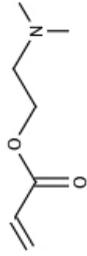


N,N-Diméthylaminopropylacrylamide

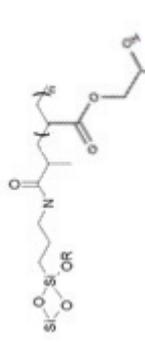




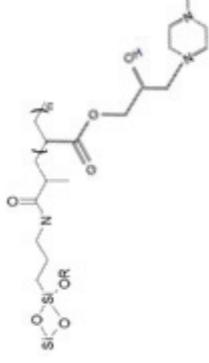
N-(3-triméthoxysilylpropyl) méthacrylamide



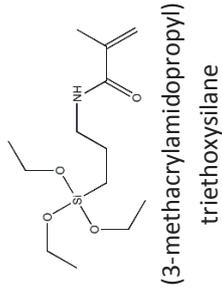
N,N-Diméthylaminoethyl acrylate



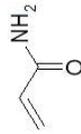
3-N,N-Diéthylamino-2-hydroxypropyl méthacrylate



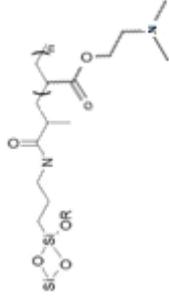
2-Hydroxy-3-(4-méthylpiperazin-1-yl)propyl méthacrylates



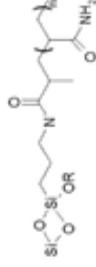
(3-méthacrylamidopropyl) triéthoxysilane



Acrylamide



Echange d'anions [34]



HILIC [37]

Si ces travaux soulignent la polyvalence du processus, peu d'informations sont néanmoins fournies sur l'optimisation des paramètres expérimentaux et les performances comparées des colonnes obtenues par polymérisation et silanisation classique. En effet, parmi les différents travaux rapportés, seul le groupe de Ikegami [30-32] a réalisé une étude comparative entre deux colonnes monolithiques greffées avec des chaînes C18, soit par polymérisation (colonne ODM) soit par fonctionnalisation classique avec un silane monofonctionnel C₁₈ (colonne ODS). Pour la préparation de la colonne ODM, le support monolithique est dans un premier temps activé avec le 3-méthacryloxypropyltriméthoxysilane et le monomère octadécylméthacrylate (C₁₈) est ensuite polymérisé pendant 3 heures à 60°C. Les auteurs ont d'abord étudié l'influence de la concentration en monomère et en initiateur (AIBN) dans le mélange réactionnel sur les colonnes ODM et ont ensuite comparé les propriétés chromatographiques des deux colonnes ODM et ODS.

Le **Tableau 4** ci-dessous présente l'influence de la concentration en monomère sur les caractéristiques chromatographiques des matériaux ODS et ODM, évaluées par le biais du test de Tanaka [39].

Tableau 4: Influence de la concentration du monomère sur les propriétés chromatographiques des colonnes fabriquées (k_{AB} = rétention de l'amylobenzène, $\alpha(\text{CH}_2)$ = sélectivité méthylène, k_T = rétention du triphénylène, $\alpha(\text{T/O})$ = sélectivité triphénylène/o-terphényl, k_C = rétention de la caféine et $\alpha(\text{C/P})$ = sélectivité caféine/phénol) [32].

Paramètre	Colonne ODS	Colonne ODM Concentration du monomère ^c				
		100	150	200	250	300
Phase mobile: MeOH/eau						
k_{AB}^a	1.69 ± 0.08	1.74 ± 0.05	2.30 ± 0.06	2.99 ± 0.01	3.80 ± 0.07	4.23 ± 0.07
$\alpha(\text{CH}_2)^a$	1.47 ± 0.01	1.41 ± 0.01	1.44 ± 0.003	1.47 ± 0.002	1.50 ± 0.005	1.51 ± 0.002
k_T^a	2.18 ± 0.05	4.49 ± 0.23	6.17 ± 0.11	8.30 ± 0.16	11.39 ± 0.42	13.06 ± 0.21
$\alpha_{\text{T/O}}^a$	1.32 ± 0.03	1.94 ± 0.07	2.03 ± 0.01	2.15 ± 0.01	2.38 ± 0.06	2.58 ± 0.02
k_C^b	1.47 ± 0.06	0.93 ± 0.04	0.75 ± 0.02	0.76 ± 0.003	0.72 ± 0.03	0.68 ± 0.01
$\alpha_{\text{C/P}}^b$	0.81 ± 0.03	0.38 ± 0.01	0.31 ± 0.03	0.31 ± 0.003	0.27 ± 0.002	0.26 ± 0.003
Phase mobile: ACN/eau						
k_{AB}^a	0.93 ± 0.05	0.79 ± 0.04	1.02 ± 0.01	1.21 ± 0.01	1.43 ± 0.01	1.47 ± 0.06
$\alpha(\text{CH}_2)^a$	1.39 ± 0.01	1.34 ± 0.002	1.36 ± 0.003	1.40 ± 0.001	1.43 ± 0.004	1.43 ± 0.003
k_T^a	0.92 ± 0.04	1.26 ± 0.01	1.54 ± 0.01	1.89 ± 0.001	2.26 ± 0.04	2.38 ± 0.05
$\alpha_{\text{T/O}}^a$	1.25 ± 0.01	1.64 ± 0.02	1.71 ± 0.005	1.85 ± 0.01	2.08 ± 0.05	2.25 ± 0.02
k_C^b	0.21 ± 0.005	0.21 ± 0.002	0.19 ± 0.001	0.16 ± 0.004	0.12 ± 0.001	0.10 ± 0.01
$\alpha_{\text{C/P}}^b$	0.18 ± 0.003	0.17 ± 0.01	0.13 ± 0.001	0.13 ± 0.002	0.10 ± 0.001	0.10 ± 0.002

^a Phase mobile: solvant organique/eau 80/20

^b Phase mobile: solvant organique/eau 20/80

^c μL de monomère dans un volume total de 500 μL , concentration de l'initiateur = 4,8 mg/mL

La rétention de l'amylobenzène (k_{AB}) et la sélectivité méthylène (α_{CH_2}) augmentent avec la concentration du monomère. Ces augmentations indiquent que la quantité ou la taille des chaînes polymériques augmentent avec la teneur en monomère dans le mélange réactionnel. Les auteurs ont également noté que, quelles que soient les conditions de polymérisation utilisées, les rétentions obtenues sur colonne ODM étaient plus élevées que celles obtenues après un greffage mono-couche par silanisation classique ODS (dans une phase mobile MeOH/eau). Il est également intéressant de noter que le gain

en rétention en milieu ACN/eau est plus faible que celui observé en MeOH/eau. Les auteurs expliquent ce comportement par une meilleure solvataion des chaînes polymériques de la phase stationnaire en milieu ACN/eau.

La sélectivité triphénylène/o-terphényl ($\alpha_{T/O}$) est un facteur qui permet, quant à lui, d'évaluer la sélectivité stérique de la phase stationnaire dans la mesure où les deux solutés possèdent le même caractère hydrophobe mais un encombrement stérique différent [39]. Le greffage par polymérisation conduit à l'obtention de colonnes monolithiques caractérisées par une sélectivité stérique plus élevée que celle des colonnes ODS. Cette sélectivité augmente avec l'augmentation de la teneur en monomère. A contrario, la silanisation des colonnes avec l'ODS conduit à l'obtention de mono-couches denses ne présentant pas de reconnaissance de forme marquée.

Les résultats obtenus sont en accord avec d'autres études réalisées sur des colonnes particulières par polymérisation de l'octadécylméthacrylate [40, 41] démontrant la nature polymérique des couches obtenues.

D'un point de vue cinétique, les auteurs ont remarqué que l'efficacité des colonnes (évaluée par le biais de la hauteur équivalente à un plateau théorique) diminuait de façon significative pour des teneurs en monomère élevées (correspondant à l'ajout de 200 μL de monomère dans le mélange réactionnel) (**Figure 24**).

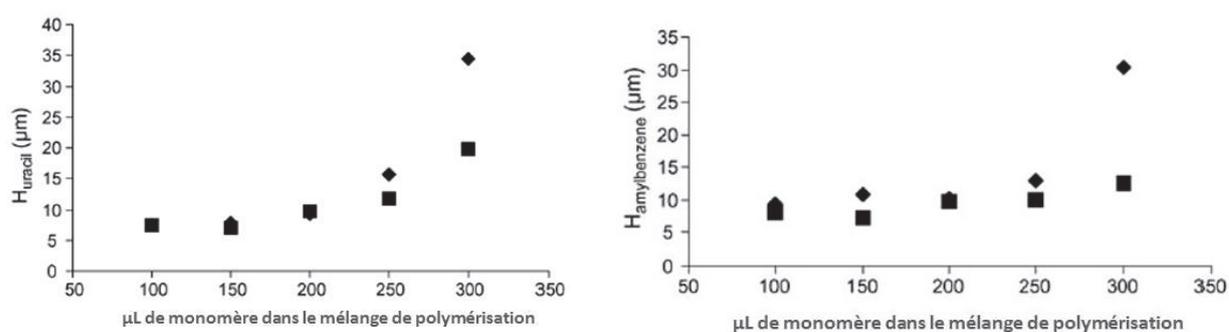


Figure 24: Hauteurs de plateaux théoriques obtenues pour l'uracile et le pentylbenzène en fonction de la quantité de monomère utilisée dans le mélange de polymérisation ([AIBN]fixe = 4,8 mg/mL), \blacklozenge : phase mobile MeOH/eau (80/20, v/v), \blacksquare : phase mobile ACN/eau (80/20, v/v) [32].

Pour de faibles concentrations en monomère, le procédé de polymérisation étudié n'affecte pas les performances intrinsèques du monolithe. L'augmentation de la rétention semble être directement liée à l'augmentation de l'épaisseur des couches polymériques formées. Toutefois, lorsque celles-ci deviennent trop importantes à l'entrée des mésopores, la diffusion moléculaire est restreinte ce qui

conduit à une perte d'efficacité. Par conséquent, il semble important de maîtriser les conditions de polymérisation afin de déterminer le meilleur compromis entre augmentation de la rétention et maintien de l'efficacité.

Les différences de comportement observées entre les phases mobiles à base d'ACN et à base de MeOH sont expliquées par les auteurs par la plus faible viscosité de l'ACN et son plus grand pouvoir de solvataion des chaînes polymériques.

Comme nous venons de le souligner, ces colonnes ODM présentent des sélectivités singulières par rapport aux colonnes ODS. Ces propriétés proviennent de la nature polymérique des couches de surface mais peuvent également être liées à la présence des fonctions ester (dans le bras espaceur) non présentes dans les colonnes ODS [30]. La **Figure 25** ci-dessous illustre l'apport en termes de sélectivité des colonnes ODM par rapport aux colonnes ODS pour la séparation d'un mélange de tocophérols (**Figure 25.1**) et de xylenols (**Figure 25.2**).

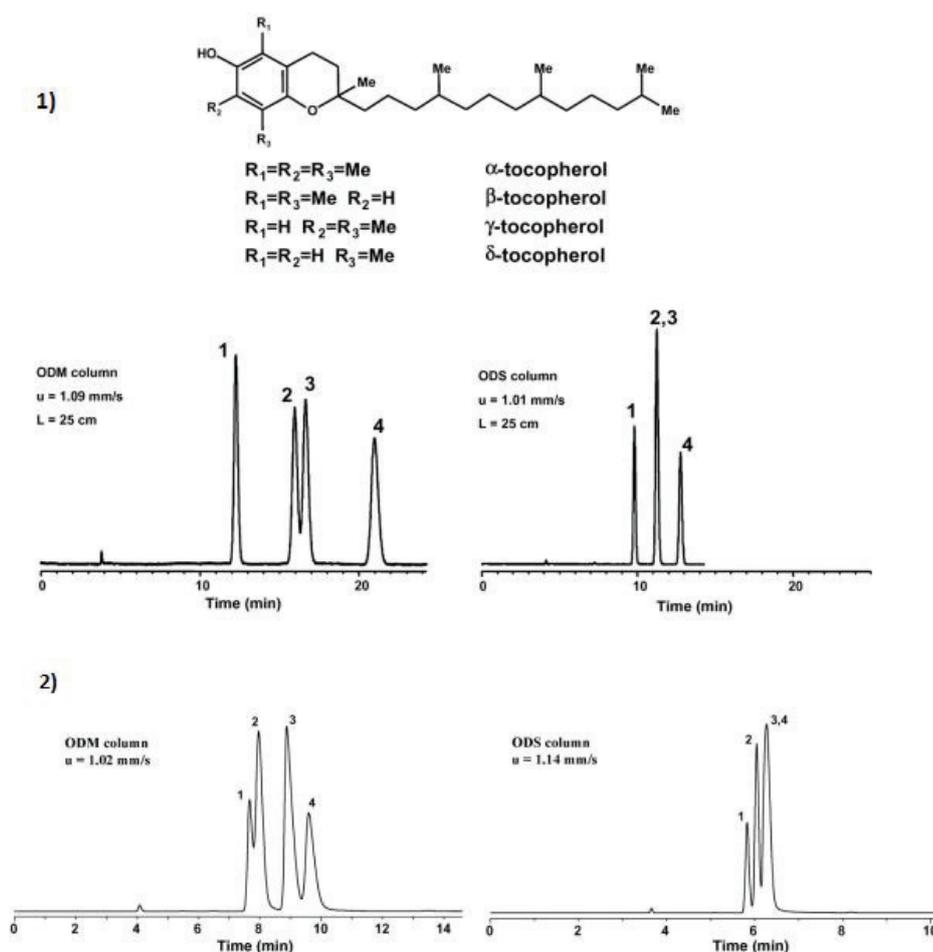


Figure 25: 1) Séparation des tocophérols sur des colonnes ODM et ODS (25 cm x 200 μ m d.i.). Phase mobile : MeOH/eau (95/5 ; v/v). Marqueur de temps mort : thiourée. Détection UV à 295 nm. T = 30°C. Solutés : 1. δ -tocophérol, 2. β -tocophérol, 3. γ -tocophérol, 4. α -tocophérol. 2) Séparation de xylenols sur des colonnes ODM et ODS. Phase mobile : MeOH/eau (60/40 ; v/v). Marqueur de temps mort : Uracil. Détection UV à 254 nm. 1. 3,4-xyleneol, 2. 3,5-xyleneol, 3. 2,4-xyleneol, 4. 2,6-xyleneol [30].

La fonctionnalisation par polymérisation permet de contrôler le rapport de phases (évalué par les valeurs de facteur de rétention des alkylbenzènes) par le biais de la concentration en monomère (pourcentage volumique entre 20 et 60%) dans le mélange de polymérisation [38]. Il est ainsi possible d'obtenir des colonnes plus rétentives que les colonnes greffées par silanisation classique. Cette augmentation du rapport de phases se fait néanmoins, au-delà d'une concentration seuil en monomère, au détriment de l'efficacité de la colonne. Cependant, à teneur en monomère fixée, la perte d'efficacité de la colonne consécutive à la polymérisation peut être limitée en augmentant la concentration de l'initiateur dans le mélange de polymérisation.

Ces résultats obtenus en polymérisation initiée thermiquement ont mis en évidence le potentiel de la polymérisation selon une approche « grafting through » pour la fonctionnalisation des monolithes de silice. Néanmoins les réactions initiées thermiquement sont longues, souvent laborieuses et surtout non localisables. Une approche par photopolymérisation est donc envisagée.

1.2. La photopolymérisation ou « grafting through » photo-initié

L'initiation photochimique est une alternative intéressante à l'initiation thermique car elle permet, par l'irradiation d'une zone ciblée délimitée par des masques de lumière [42-44], de localiser la fonctionnalisation (**Figure 26**).

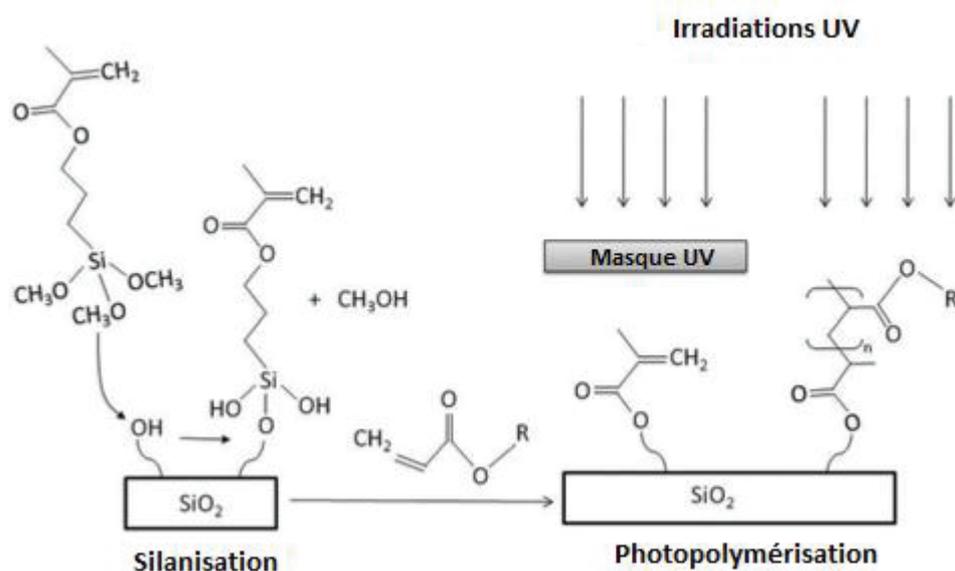


Figure 26: Principe de la fonctionnalisation par photopolymérisation.

Contrairement à la polymérisation thermique qui requiert plusieurs heures, la polymérisation initiée photochimiquement est rapide et ne nécessite que quelques minutes. Une comparaison des caractéristiques de la photopolymérisation et de la polymérisation thermique est donnée **Tableau 5**.

Tableau 5: Caractéristiques de la photopolymérisation / Polymérisation thermique.

Caractéristiques	Photopolymérisation	Polymérisation thermique
Durée de la réaction	Quelques minutes	Quelques heures
Contrôle spatial de la fonctionnalisation	Oui car la polymérisation intervient uniquement dans les zones exposées aux irradiations UV	Impossible à cause de la diffusion
Contrôle temporel	Oui	Oui

I.2.1. Paramètres expérimentaux en photopolymérisation

La **Figure 27** met en évidence les différents facteurs pouvant influencer le greffage par photopolymérisation. L'effet de chacun des facteurs est présenté ci-dessous.

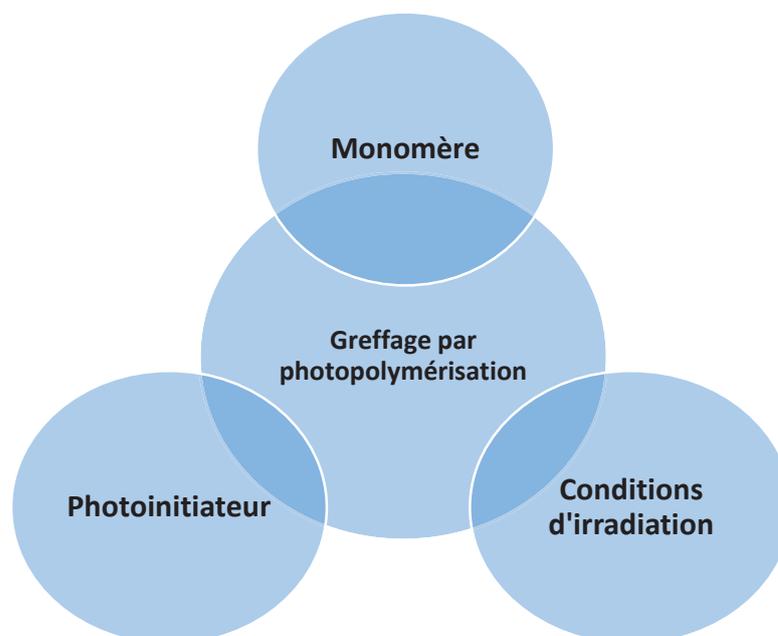


Figure 27: Facteurs influençant le greffage par photopolymérisation.

- **Effet du photoinitiateur**

Le choix du photo-initiateur est dicté par les conditions de longueur d'onde auxquelles il est possible de travailler techniquement (transparence du matériau, disponibilité des lampes) et par sa solubilité dans le solvant de solubilisation des monomères [45, 46] (**Tableau 6**). Une concentration minimale en photoinitiateur est nécessaire pour amorcer la photopolymérisation. L'augmentation de la concentration en photoinitiateur augmente la vitesse de polymérisation ainsi que le nombre de radicaux formés et donc le taux de greffage. Néanmoins, une concentration trop importante en photoinitiateur entraîne également une augmentation des réactions de terminaison.

Tableau 6: Caractéristiques de quelques photoinitiateurs.

<i>Photo-initiateur</i>	Benzophénone	BME	AIBN	AIBA
λ_{max} d'absorption (nm)	254	254	345	365
<i>Solvants adaptés</i>	acétone, méthanol, éthanol, éther, THF	acétone, méthanol, éthanol, THF	chloroforme, acrylonitrile	acétone, dioxane, méthanol, éthanol, DMSO et eau

- **Effet des conditions d'irradiation**

Les conditions d'irradiation peuvent être définies par 3 paramètres : la longueur d'onde d'irradiation, l'intensité lumineuse et le temps d'irradiation. Il faut utiliser une intensité lumineuse et une longueur d'onde d'illumination adaptées pour permettre l'activation du photoinitiateur choisi [47].

La longueur d'onde d'irradiation λ doit correspondre à une longueur d'onde d'absorption du photoinitiateur utilisé afin de générer des radicaux indispensables au processus de polymérisation [48].

Le temps de polymérisation t fixe quant à lui l'énergie W d'irradiation reçue d'après la relation suivante :

$$W = Pt$$

Equation 1

Où P représente la puissance d'irradiation reçue par unité de surface (appelée aussi intensité lumineuse). Il existe un temps d'irradiation minimal nécessaire à la conversion des monomères et donc à leur greffage. Pour une concentration en monomère donnée, l'augmentation du temps d'irradiation résulte en une augmentation du taux de greffage. Il faut néanmoins contrôler ce temps d'irradiation afin de ne pas risquer l'obstruction des pores consécutive à la polymérisation.

- **Effet du monomère**

Il a été démontré que la nature du monomère influence les vitesses de polymérisation. L'importance de la nature du monomère sur le taux de conversion est clairement illustrée sur la **Figure 28** ci-dessous [49]. Les monomères acrylates présentent la plus forte réactivité et le taux de conversion de 100 % est rapidement atteint.

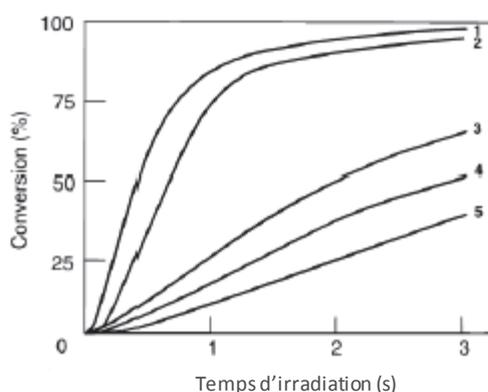


Figure 28: Evolution du taux de conversion en fonction du temps pour différents monomères utilisés, (1) acrylate, (2) vinyléther, (3) cycloepoxide, (4) méthacrylate et (5) glycidyl éther [49].

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.

De plus la concentration du monomère influence la vitesse de photopolymérisation. En effet, un greffage réalisé avec une faible concentration est inefficace, quel que soit le temps d'irradiation. A *contrario*, une forte concentration du monomère induit un greffage efficace même pour un faible temps d'irradiation [42].

- **Autres facteurs**

Le solvant utilisé lors de la fonctionnalisation doit répondre à plusieurs critères. Il doit avoir une faible absorptivité dans le domaine des longueurs d'onde d'irradiation (dans notre cas, dans le domaine des UV). Il doit également solubiliser tous les composants de la solution de polymérisation, *i.e.* le monomère fonctionnel et le photoinitiateur.

En considérant une gamme de température allant de 25°C à 70°C, certains auteurs ont montré que l'efficacité du photografting augmentait avec la température [50]. Cependant, il faut noter qu'appliquer une « forte » température lors de l'irradiation UV nécessite un montage spécifique et est susceptible d'amorcer la polymérisation dans une zone non irradiée.

En conclusion, il a été démontré qu'il était possible de fonctionnaliser des colonnes capillaires remplies de monolithe de silice par photopolymérisation. Cette approche implique tout de même de prendre en compte plusieurs paramètres afin d'optimiser au mieux le greffage et d'obtenir des colonnes chromatographiques efficaces, avec des rétentions élevées.

I.2.2. Etat de l'art de la photopolymérisation sur monolithe de silice

Lorsque ces travaux de thèse ont commencé, seules deux publications, l'une proposée par le groupe de Zajickova en 2012 [51] et la seconde par notre groupe de recherche [52], rapportaient l'utilisation de la photopolymérisation (approche « grafting through ») pour la fonctionnalisation d'un monolithe de silice par voie photochimique.

Dans les travaux de Zajickova [51], le monolithe de silice était d'abord pré-activé par le 3-méthacryloxypropyltriméthoxysilane (γ -MAPS), puis la photopolymérisation était réalisée après remplissage d'un capillaire transparent aux UV (revêtement Teflon) avec un mélange de polymérisation comprenant 5% de benzophénone (photoinitiateur) dans le 2,2,3,3-pentafluoropropyl méthacrylate (PFM) (**Figure 29**). L'étape de fonctionnalisation était conduite sous irradiation UV à 254 nm, pendant 5 minutes.

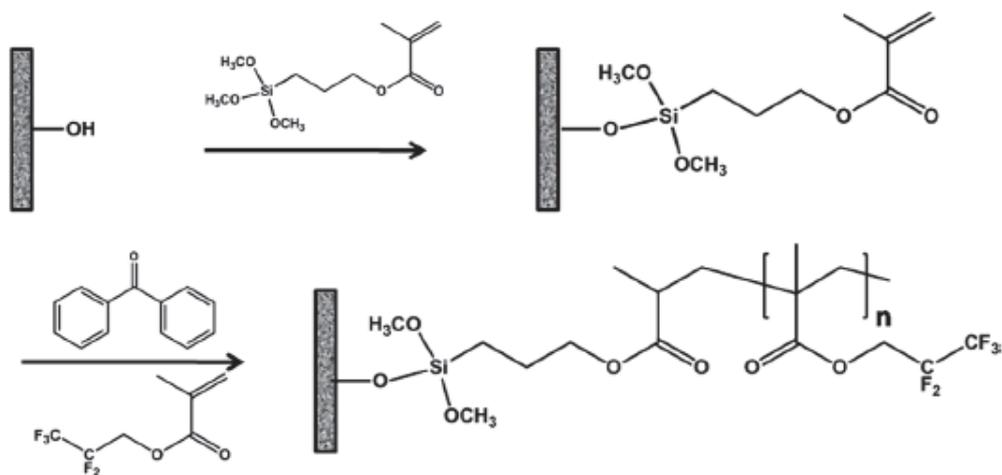


Figure 29: Processus de photopolymérisation du monolithe de silice proposé par le groupe de Zajickova [51].

L'étude menée par ces auteurs a montré que le temps d'irradiation avait une influence importante sur les propriétés de rétention des colonnes photopolymérisées. En effet, comparativement aux procédés initiés par la chaleur pour lesquels il est possible d'ajuster simultanément et indépendamment la température et le temps de la réaction, en photochimie il s'avère plus difficile de maîtriser la puissance

lumineuse d'irradiation. L'effet du temps d'irradiation sur la rétention et l'efficacité de la colonne est illustré sur la **Figure 30** ci-dessous.

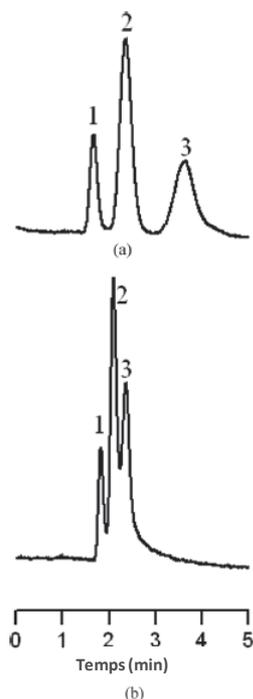


Figure 30: Séparation d'une série d'alkylbenzènes sur la colonne photogreffée avec le PFM pendant (a) : 5 min et (b) 0,5 min. Colonne 25 cm x 100 μ m d.i., phase mobile : ACN/eau (40/60 ; v,v), D = 1 μ L/min, détection à 214 nm. Solutés : (1) thiourée, (2) propylbenzène, (3) hexylbenzène [51].

Bien que la réaction soit beaucoup plus rapide qu'en initiation thermique (5 minutes contre 3 heures en thermique à 60°C), le procédé, dans l'état, conduit à une perte d'efficacité des colonnes.

Le second article [52] repose sur des travaux de thèse effectués antérieurement au laboratoire et décrit l'optimisation des conditions expérimentales pour la photopolymérisation d'un monolithe de silice par des monomères laurylacrylate. L'influence de plusieurs paramètres de la photopolymérisation a été évaluée pour la préparation de colonnes monolithiques photogreffées avec des chaînes C12. Le monolithe de silice pré-fonctionnalisé avec du γ -methacryloyloxy)propyl triméthoxysilane, a été photopolymérisé avec du lauryl acrylate dans les différentes conditions présentées **Tableau 7**.

Tableau 7: Facteurs de rétention de l'amylobenzène obtenus avec différentes conditions de photopolymérisation du lauryl acrylate. D'après [52].

Initiator (0.2% w/v)	Monomer content (%)	Irradiation time (min)	k_{AB} ^{a)}
AIBN	37	20	0.61
BME	37	20	1.16
		20 + 20 ^{b)}	1.48
	60	1.27	
	55	10	1.1
	72	20	ND ^{c)}
	72	10	1.45

- a) Facteurs de rétention obtenus avec une phase mobile 80/20 ACN/eau (v/v)
- b) Deux photogreffages successifs
- c) Colonne bouchée au cours de la photopolymérisation

L'influence de chaque paramètre a été évaluée en suivant la rétention de l'amylobenzène en phase inverse (k_{AB}). Les valeurs des facteurs de rétention obtenues, ont conduit à plusieurs conclusions. Premièrement, l'utilisation de la BME comme initiateur permet d'avoir une initiation plus efficace qu'avec l'AIBN et conduit ainsi à des rétentions plus importantes. Deuxièmement, une augmentation de la concentration en monomère dans le mélange réactionnel entraîne une augmentation de la rétention consécutive à une polymérisation plus importante. Cependant, une polymérisation trop poussée, consécutive à l'augmentation simultanée de la teneur en monomère à 55% et de la durée d'irradiation à 20 minutes, entraîne une obstruction des macropores et conduit au bouchage de la colonne. Enfin, le temps d'irradiation ne semble pas être un facteur limitant puisque 10 minutes d'irradiation avec un pourcentage en monomère de 72% conduisent à une rétention maximale. Il est intéressant de noter que deux irradiations successives (avec renouvellement de la solution de greffage) avec un pourcentage en monomère de 37% conduisent à des rétentions similaires à celles obtenues avec une seule irradiation et un pourcentage en monomère de 72%. Cet aspect est intéressant surtout dans le cas de réactifs qu'il n'est pas possible de solubiliser à des teneurs aussi élevées.

Une étude comparative a ensuite été réalisée entre deux colonnes monolithiques greffées C12 par polymérisation thermique (3h 80°C) et par photopolymérisation (10 min sous UV). La rétention de l'amylobenzène sur ces deux colonnes est comparable ce qui prouve que la photopolymérisation réalisée en quelques minutes est aussi efficace qu'une polymérisation thermique de plusieurs heures.

La répétabilité et la stabilité du greffage par photopolymérisation ont également été étudiées. Un RSD <6% a été obtenu sur les facteurs de rétention et la stabilité du greffage a été démontrée en milieu organique et aqueux après percolation d'un volume équivalent à 100 fois le volume du capillaire. Des essais supplémentaires ont également montré que la photopolymérisation n'altérerait pas les propriétés intrinsèques du monolithe (efficacité, perméabilité).

La polyvalence de ce mode de fonctionnalisation a été démontrée à travers le greffage de différents monomères. Des séparations en phase inverse et en échange d'ions ont été réalisées (**Figure 31**).

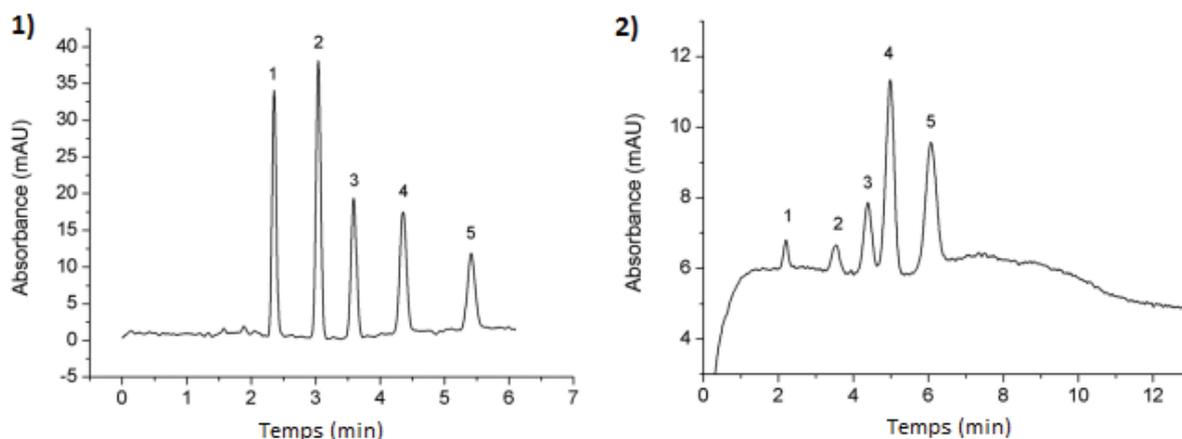


Figure 31: 1) Séparation de 5 alkylbenzènes sur une colonne monolithique photopolymérisée avec des chaînes C12 : $d_i=75\mu\text{m}$, $l_{\text{injection-détection}}=8,5\text{ cm}$, $L=10\text{cm}$, Phase mobile 80/20 ACN/eau (v/v), débit = 250 nL/min, détection à 254 nm, [soluté] = 10 mg/mL, 1 : propylbenzène, 2 : pentylbenzène, 3 : hexylbenzène, 4 : heptylbenzène, 5 : octylbenzène. **2)** Séparation de 5 anions inorganiques sur une colonne monolithique photogreffée avec du [2-(methacryloyloxy)ethyl]triméthylammonium chloride : $d_i=75\mu\text{m}$, $l_{\text{injection-détection}}=8,5\text{ cm}$, $L=10\text{cm}$, Phase mobile : sodium perchlorate 10 mM, détection à 200 nm, 1 : odate (400 mg/L), 2 : bromate (600 mg/L), 3 : Nitrite (200 mg/L), 4 : bromide (600 mg/L), 5 : Nitrate (200 mg/L). D'après [52].

Enfin, le greffage d'un monomère fluorescent sur une zone ciblée du capillaire a mis en évidence l'aspect localisable de ce mode de fonctionnalisation avec l'utilisation d'un masque de lumière (**Figure 32**).

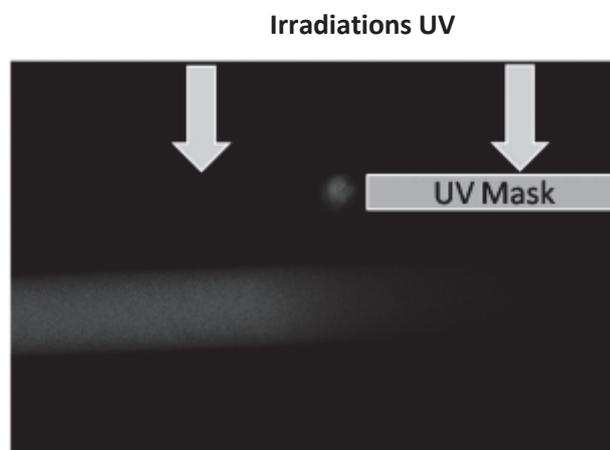


Figure 32: Image de microscopie en fluorescence d'un monolithe de silice photopolymérisé avec du 2-naphthyl acrylate pendant 5 min. D'après [52].

Références bibliographiques

- [1]. Y. Tsujii, K. Ohno, S. Yamamoto, A. Goto, T. Fukuda, *Structure and Properties of High-Density Polymer Brushes Prepared by Surface-Initiated Living Radical Polymerization*, Springer Berlin Heidelberg, 2006, pp 1-45.
- [2]. D.M. Jones, A.A. Brown, W.T. Huck, *Surface-initiated polymerizations in aqueous media: effect of initiator density*, *Langmuir* 18 (2002) 1265-1269.
- [3]. R.E. Behling, B.A. Williams, B.L. Staade, L.M. Wolf, E.W. Cochran, *Influence of graft density on kinetics of surface-initiated ATRP of polystyrene from montmorillonite*, *Macromolecules* 42 (2009) 1867-1872.
- [4]. T. von Werne, T.E. Patten, *Atom Transfer Radical Polymerization from Nanoparticles: A Tool for the Preparation of Well-Defined Hybrid Nanostructures and for Understanding the Chemistry of Controlled/"Living" Radical Polymerizations from Surfaces*, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 7497-7505.
- [5]. K. Ohno, K.-m. Koh, Y. Tsujii, T. Fukuda, *Synthesis of Gold Nanoparticles Coated with Well-Defined, High-Density Polymer Brushes by Surface-Initiated Living Radical Polymerization*, *Macromolecules* 35 (2002) 8989-8993.
- [6]. K. Ohno, T. Morinaga, K. Koh, Y. Tsujii, T. Fukuda, *Synthesis of Monodisperse Silica Particles Coated with Well-Defined, High-Density Polymer Brushes by Surface-Initiated Atom Transfer Radical Polymerization*, *Macromolecules* 38 (2005) 2137-2142.
- [7]. A. Soliven, G.R. Dennis, G. Guiochon, E.F. Hilder, P.R. Haddad, R.A. Shalliker, *Cyano bonded silica monolith—Development of an in situ modification method for analytical scale columns*, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 6085-6091.
- [8]. E.M. Jean-Pierre Mercier, *Chimie des polymères (Traité des matériaux, vol 13)*, Presses polytechniques et universitaires romandes, Lausanne, 1996.
- [9]. M.D. Miller, G.L. Baker, M.L. Bruening, *Polymer-brush stationary phases for open-tubular capillary electrochromatography*, *J. Chromatogr. A* 1044 (2004) 323-330.
- [10]. Q. Zhong, X. Han, L. He, T.E. Beesley, W.S. Trahanovsky, D.W. Armstrong, *Chromatographic evaluation of poly (trans-1,2-cyclohexanediyl-bis acrylamide) as a chiral stationary phase for HPLC*, *J. Chromatogr. A* 1066 (2005) 55-70.
- [11]. W. Jiang, G. Fischer, Y. Girmay, K. Irgum, *Zwitterionic stationary phase with covalently bonded phosphorylcholine type polymer grafts and its applicability to separation of peptides in the hydrophilic interaction liquid chromatography mode*, *J. Chromatogr. A* 1127 (2006) 82-91.
- [12]. J. Persson, P. Hemström, K. Irgum, *Preparation of a sorbitol methacrylate grafted silica as stationary phase for hydrophilic interaction chromatography*, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1504-1510.
- [13]. K. Nagase, J. Kobayashi, A. Kikuchi, Y. Akiyama, H. Kanazawa, T. Okano, *Thermoresponsive hydrophobic copolymer brushes modified porous monolithic silica for high-resolution bioseparation*, *RSC Advances* 5 (2015) 66155-66167.
- [14]. H. Kanazawa, M. Nishikawa, A. Mizutani, C. Sakamoto, Y. Morita-Murase, Y. Nagata, A. Kikuchi, T. Okano, *Aqueous chromatographic system for separation of biomolecules using thermoresponsive polymer modified stationary phase*, *J. Chromatogr. A* 1191 (2008) 157-161.
- [15]. E. Ayano, Y. Okada, C. Sakamoto, H. Kanazawa, A. Kikuchi, T. Okano, *Study of temperature-responsibility on the surfaces of a thermo-responsive polymer modified stationary phase*, *J. Chromatogr. A* 1119 (2006) 51-57.
- [16]. M.L. Hair, C.P. Tripp, *Adsorption of block polymers on well-defined silica surfaces*, Steinkopff, 1996, pp 51-57.

- [17]. A. Papra, N. Gadegaard, N.B. Larsen, Characterization of Ultrathin Poly(ethylene glycol) Monolayers on Silicon Substrates, *Langmuir* 17 (2001) 1457-1460.
- [18]. Y. Tran, P. Auroy, Synthesis of Poly(styrene sulfonate) Brushes, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 3644-3654.
- [19]. A.C. Balazs, C. Singh, E. Zhulina, S.-S. Chern, Y. Lyatskaya, G. Pickett, Theory of polymer chains tethered at interfaces, *Prog. Surf. Sci.* 55 (1997) 181-269.
- [20]. J. R uhe, W. Knoll, Functional polymer brushes, *Journal of Macromolecular Science, Part C* 42 (2002) 91-138.
- [21]. G.K. Jennings, E.L. Brantley, Physicochemical Properties of Surface-Initiated Polymer Films in the Modification and Processing of Materials, *Adv. Mater.* 16 (2004) 1983-1994.
- [22]. R.C. Advincula, Surface Initiated Polymerization from Nanoparticle Surfaces, *J. Dispersion Sci. Technol.* 24 (2003) 343-361.
- [23]. G. Huang, Z. Xiong, H. Qin, J. Zhu, Z. Sun, Y. Zhang, X. Peng, J. ou, H. Zou, Synthesis of zwitterionic polymer brushes hybrid silica nanoparticles via controlled polymerization for highly efficient enrichment of glycopeptides, *Anal. Chim. Acta* 809 (2014) 61-68.
- [24]. F. Ali, Y.S. Kim, J.W. Lee, W.J. Cheong, Catalyst assisted synthesis of initiator attached silica monolith particles via isocyanate-hydroxyl reaction for production of polystyrene bound chromatographic stationary phase of excellent separation efficiency, *J. Chromatogr. A* 1324 (2014) 115-120.
- [25]. F. Ali, W.J. Cheong, Z.A. Allothman, A.M. Almajid, Polystyrene bound stationary phase of excellent separation efficiency based on partially sub-2 μm silica monolith particles, *J. Chromatogr. A* 1303 (2013) 9-17.
- [26]. A.K. Mallik, M.M. Rahman, M. Czaun, M. Takafuji, H. Ihara, Facile synthesis of high-density poly(octadecyl acrylate)-grafted silica for reversed-phase high-performance liquid chromatography by surface-initiated atom transfer radical polymerization, *J. Chromatogr. A* 1187 (2008) 119-127.
- [27]. G. Boven, M.L.C.M. Oosterling, G. Challa, A. Jan Schouten, Grafting kinetics of poly(methyl methacrylate) on microparticulate silica, *Polymer* 31 (1990) 2377-2383.
- [28]. A. Muehlebach, F. Rime, Synthesis of well-defined macromonomers and comb copolymers from polymers made by atom transfer radical polymerization, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 41 (2003) 3425-3439.
- [29]. M. Henze, D. Madge, O. Prucker, J. R uhe, "Grafting Through": Mechanistic Aspects of Radical Polymerization Reactions with Surface-Attached Monomers, *Macromolecules* 47 (2014) 2929-2937.
- [30]. O. N unez, T. Ikegami, K. Miyamoto, N. Tanaka, Study of a monolithic silica capillary column coated with poly(octadecyl methacrylate) for the reversed-phase liquid chromatographic separation of some polar and non-polar compounds, *J. Chromatogr. A* 1175 (2007) 7-15.
- [31]. W. Soonthorntantikul, N. Leepipatpiboon, T. Ikegami, N. Tanaka, T. Nhujak, Selectivity comparisons of monolithic silica capillary columns modified with poly(octadecyl methacrylate) and octadecyl moieties for halogenated compounds in reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5868-5874.
- [32]. O. N unez, T. Ikegami, W. Kajiwara, K. Miyamoto, K. Horie, N. Tanaka, Preparation of high efficiency and highly retentive monolithic silica capillary columns for reversed-phase chromatography by chemical modification by polymerization of octadecyl methacrylate, *J. Chromatogr. A* 1156 (2007) 35-44.
- [33]. T. Ikegami, K. Horie, J. Jaafar, K. Hosoya, N. Tanaka, Preparation of highly efficient monolithic silica capillary columns for the separations in weak cation-exchange and HILIC modes, *J. Biochem. Bioph. Methods* 70 (2007) 31-37.
- [34]. Y. Watanabe, T. Ikegami, K. Horie, T. Hara, J. Jaafar, N. Tanaka, Improvement of separation efficiencies of anion-exchange chromatography using monolithic silica capillary columns modified with polyacrylates and polymethacrylates containing tertiary amino or quaternary ammonium groups, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7394-7401.

- [35]. T. Ikegami, J. Ichimaru, W. Kajiwara, N. Nagasawa, K. Hosoya, N. Tanaka, Anion- and Cation-Exchange MicroHPLC Utilizing Poly(methacrylates)-coated Monolithic Silica Capillary Columns, *Anal. Sci.* 23 (2007) 109-113.
- [36]. T. Ikegami, H. Fujita, K. Horie, K. Hosoya, N. Tanaka, HILIC mode separation of polar compounds by monolithic silica capillary columns coated with polyacrylamide, *Anal Bioanal Chem* 386 (2006) 578-585.
- [37]. T. Ikegami, K. Horie, N. Saad, K. Hosoya, O. Fiehn, N. Tanaka, Highly efficient analysis of underivatized carbohydrates using monolithic-silica-based capillary hydrophilic interaction (HILIC) HPLC, *Anal Bioanal Chem* 391 (2008) 2533-2542.
- [38]. K. Horie, T. Ikegami, K. Hosoya, N. Saad, O. Fiehn, N. Tanaka, Highly efficient monolithic silica capillary columns modified with poly(acrylic acid) for hydrophilic interaction chromatography, *J. Chromatogr. A* 1164 (2007) 198-205.
- [39]. K. Kimata, K. Iwaguchi, S. Onishi, K. Jinno, R. Eksteen, K. Hosoya, M. Araki, N. Tanaka, Chromatographic characterization of silica C18 packing materials. Correlation between a preparation method and retention behavior of stationary phase, *J. Chromatogr. Sci.* 27 (1989) 721-728.
- [40]. A. Shundo, R. Nakashima, M. Fukui, M. Takafuji, S. Nagaoka, H. Ihara, Enhancement of molecular-shape selectivity in high-performance liquid chromatography through multi-anchoring of comb-shaped polymer on silica, *J. Chromatogr. A* 1119 (2006) 115-119.
- [41]. M.A.J. Chowdhury, H. Ihara, T. Sagawa, C. Hirayama, Retention versatility of silica-supported comb-shaped crystalline and non-crystalline phases in high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 877 (2000) 71-85.
- [42]. T.B. Stachowiak, F. Svec, J.M.J. Fréchet, Patternable Protein Resistant Surfaces for Multifunctional Microfluidic Devices via Surface Hydrophilization of Porous Polymer Monoliths Using Photografting, *Chem. Mater.* 18 (2006) 5950-5957.
- [43]. T. Rohr, E.F. Hilder, J.J. Donovan, F. Svec, J.M. Frechet, Photografting and the control of surface chemistry in three-dimensional porous polymer monoliths, *Macromolecules* 36 (2003) 1677-1684.
- [44]. S. Currvan, D. Connolly, E. Gillespie, B. Paull, Fabrication and characterisation of capillary polymeric monoliths incorporating continuous stationary phase gradients, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 484-492.
- [45]. A.E. Muftuoglu, M.A. Tasdelen, Y. Yagci, *Photografting of Polymeric Materials*, John Wiley & Sons, Inc., 2010, pp 509-539.
- [46]. J.P. Fouassier, X. Allonas, J. Lalevée, C. Dietlin, *Photoinitiators for Free Radical Polymerization Reactions*, John Wiley & Sons, Inc., 2010, pp 351-419.
- [47]. T. Scherzer, U. Decker, Kinetic investigations on the UV-induced photopolymerization of a diacrylate by time-resolved FTIR spectroscopy: the influence of photoinitiator concentration, light intensity and temperature, *Radiat. Phys. Chem.* 55 (1999) 615-619.
- [48]. G. Odian, *Principles of polymerization*, Ed. John Wiley & Sons, New Jersey, USA, 2004.
- [49]. C. Decker, The use of UV irradiation in polymerization, *Polym. Int.* 45 (1998) 133-141.
- [50]. W. Yang, B. Ranby, Bulk surface photografting process and its applications. II. Principal factors affecting surface photografting, *Journal of Applied Polymer Science* 62 (1996) 545-555.
- [51]. Z. Zajickova, J. Luna, F. Svec, Surface modification of silica-based monolith with poly(pentafluoropropyl methacrylate) using single step photografting, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 33 (2010) 1640-1648.
- [52]. R. El-Debs, V. Dugas, C. Demesmay, Photografting as a versatile, localizable, and single-step surface functionalization of silica-based monoliths dedicated to microscale separation techniques, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 993-1001.

II. Résultats et discussion

II.1. « Photopolymerization of acrylamide as a new fonctionnalization way of silica monoliths for hydrophilic interaction chromatography and coated silica capillaries for capillary electrophoresis »

Les premiers travaux expérimentaux font suite et complètent l'étude sur la photopolymérisation initiée au laboratoire dans le cadre des travaux de R. El Debs [1].

Comme présenté précédemment, la polymérisation de différents monomères a permis de couvrir les modes chromatographiques de phase inverse et d'échange d'ions. Cependant, le mode HILIC qui représente une alternative intéressante aux modes de chromatographie en phase normale et inverse n'avait pas encore été exploité. Ainsi, la photopolymérisation de monomères acrylamide a été réalisée et a fait l'objet d'un premier article intitulé « Photopolymerization of acrylamide as a new fonctionnalization way of silica monoliths for hydrophilic interaction chromatography and coated silica capillaries for capillary electrophoresis », présenté dans la deuxième partie de ce chapitre. Les principaux paramètres (concentration en monomère et temps d'irradiation) ont été optimisés en suivant l'évolution des propriétés chromatographiques (rétention/sélectivité et efficacité) à partir de la séparation de nucléosides en mode HILIC. Le revêtement acrylamide a ensuite été utilisé en électrophorèse capillaire pour la suppression du flux électroosmotique et la réduction des phénomènes d'adsorption. La stabilité du greffage a également été démontrée en milieu acide et basique.



Photopolymerization of acrylamide as a new functionalization way of silica monoliths for hydrophilic interaction chromatography and coated silica capillaries for capillary electrophoresis



R. El-Debs¹, A. Marechal¹, V. Dugas, C. Demesmay*

Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Institut des Sciences Analytiques, UMR CNRS 5280, 5, rue de la DOUA, 69100 Villeurbanne, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 September 2013

Received in revised form 9 December 2013

Accepted 10 December 2013

Available online 24 December 2013

Keywords:

Monolith

Photopolymerization

Surface functionalization

Acrylamide

HILIC

μSPE

ABSTRACT

A simple, rapid and localizable photochemical process for the preparation of hydrophilic coated capillary and silica-based monolithic capillary columns is described. The process involves the free radical polymerization of acrylamide monomers onto acrylate pre-activated silica surface triggered by UV photoinitiation. The experimental conditions (monomer content, time of irradiation) were optimized on silica monolithic columns by monitoring the evolution of the chromatographic properties (retention, permeability, efficiency) in HILIC mode using a set of nucleosides as test solutes. Compared to thermal polymerization process, the photoinitiation allows the preparation of highly retentive and efficient HILIC monolithic columns in less than 10 min of irradiation. This process was then successfully applied to the surface coating of fused silica capillary walls. In addition to its relative high stability and ability to reduce the electroosmotic flow, this polyacrylamide coating is localizable. Benefits of this localizable photochemical process are highlighted through the conception of an in-line integrated bimodal microseparation tool combining a SPE preconcentration step on a photografted silica monolith and an electrokinetic separation step in a polyacrylamide photopolymerized capillary section. Two neuropeptides are used as model solutes to illustrate the suitability of this approach.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The miniaturization of separation systems is a major advance in the field of analytical chemistry. Indeed, it brings solutions to different issues such as small sample volume handling, reduction of solvent consumption and/or expensive reagents while allowing direct integration of successive steps (sample preparation, separation, labeling and detection) for automation. In the toolbox of analytical scientists, a wide variety of tools rely on the use of solid stationary phases. Integration of solid phases inside miniaturized devices is thus challenging. One of the most convenient ways to insert solid stationary phases into miniaturized columns (capillary tube, microfluidic channels) relies on the in situ synthesis of porous materials such as organic or inorganic monoliths. If photopolymerized organic monoliths are easily in situ synthesized from a large variety of monomers covering a wide range of interaction mechanisms, they present some specific drawbacks. Compared to their inorganic counterparts (silica monoliths) their permeability is lower as well as their efficiency when used in hydrodynamic mode [1–3] and their mass transfer kinetics is slower. Moreover,

organic monoliths are very sensitive to organic solvents effects and particularly in highly aqueous and methanolic solvent in which their performances deteriorate [2]. Although their synthesis may not be localized as for their organic counterparts, inorganic monoliths like silica monoliths, may also be in situ synthesized according to a sol-gel process and do not present these specific drawbacks. However, at the end of their more time-consuming synthesis that leads generally to bare silica monoliths, their surface chemistry has to be subsequently modified. Such surface modifications can be realized in different ways as reported by Tanaka and colleagues [4]. The classical way to functionalize silica monoliths, silanization [5–8], is time consuming. Besides this classical approach, some authors [9] have proposed less-conventional surface functionalization methods of silica or hybrid silica monoliths such as thermal polymerization or hydrosilylation of hybrid allyl silica monoliths [10,11], thermally initiated free radical polymerization [12], nucleophilic substitution of amino-modified monoliths [13], oxidation of mercapto moieties into sulfonic acid groups [14]. However, all these functionalizations are thermal and time-consuming processes. Moreover, if the integration of several steps with different surface chemistries in a miniaturized system is required, these approaches are not adapted due to the inability to localize the grafted area. Thus, photopolymerization, a localizable functionalization process, is particularly suited to meet this

* Corresponding author. Tel.: +33 0437423552.

¹ These authors contributed equally to this work.

objective. Moreover, the versatility of photopolymerization as a functionalization process for silica monoliths has already been demonstrated in our previous work [15], with the elaboration of highly efficient monolithic columns for reversed phase and anion exchange modes. The two-step process involves, in a first step, the derivatization of the overall silica surface (unlocalized) with [γ -(methacryloyloxy)propyl]trimethoxysilane (γ -MAPS) to create a layer of acrylate photoreactive groups. Appropriate surface functionalities are then introduced in a second step, through localized surface initiated photopolymerization. In this work, we demonstrate the efficiency of photopolymerization through the functionalization of different silica supports (monoliths and fused silica capillaries) with acrylamide, as stationary phase for the HILIC mode and as covalent coating in order to reduce electroosmotic flow and prevent adsorption in capillary electrophoresis. In fact, the HILIC separation mode is currently drawing a lot of interest due to the possibility to separate small polar compounds on polar stationary phases. Compounds are shared between a water-enriched layer partially immobilized on the hydrophilic stationary phase and the less polar mobile phase. The elution order is so inverted compared to RPLC. Moreover, the HILIC mode allows solving many previously difficult separation problems, such as the separation of small organic acids, basic drugs, and other neutral and charged substances. It has been successfully applied to the analysis of carbohydrates, peptides, sugars and polar pharmaceuticals [16–24]. Due to its polar amide functions, acrylamide is particularly adapted for HILIC mode. In fact, this polymer has been already grafted on different silica supports such as silica particles (commercial column [25]) or silica monoliths [26] and has been recently introduced for the preparation of an organic-silica hybrid monolithic column [27]. However, the grafting is always performed according to a thermal process and is time consuming.

Here, we propose the photopolymerization as a versatile, localizable and one-step surface functionalization to graft polyacrylamide (PA) on pre-functionalized silica monolith in a few minutes. Photopolymerization has been first optimized and prepared HILIC monolithic columns have been compared to other HILIC columns grafted with acrylamide in order to evaluate the potential of photopolymerization. Thereafter, photopolymerization of acrylamide has been implemented for the covalent coating of fused silica capillaries. The acrylamide coating was first introduced by S. Hjertén in 1985 to eliminate electroendosmosis and adsorption of solutes [28] responsible for zone distortion loss in resolution. Electroosmotic mobility values as low as 10^{-5} cm²/Vs (at pH 10) were obtained with this coating [29] or with similar ones: dimethylacrylamide coating [30] or cross-linked polyacrylamide [31]. Although this coating has found various applications in capillary electrophoresis for the separation of several classes of compounds [30,32–37], its synthesis according a classical thermal polymerization requires numerous hours depending on conditions [30,32,33]. Moreover, the acrylamide coating is hung on the entire surface of the capillary and cannot be localized in a defined zone if necessary. In this work, we propose the use of photopolymerization to locally coat the surface of fused silica capillaries with acrylamide in only 10 min. The repeatability, reproducibility and stability of the coating are here demonstrated. At last, the interest of localized photopolymerization is here demonstrated with the on-line coupling of a preconcentration step (implemented on a silica monolith photografted with C12 alkyl chains) and an electrokinetic separation step (implemented in an empty section of a fused silica capillary photografted with acrylamide for the analysis of two neuropeptides): Met-enkephalin and LEU-enkephalin. Indeed, the development of in-line SPE preconcentration strategies coupled with electrokinetic separations has attracted an increased interest in the last few years [38] to automate the analysis of small sample volumes, at low concentrations and with less handling. One of the

key features to success in this development is to be able to control the surface chemistries of both preconcentration and separation zones in order to be able to optimize both steps independently. In the chosen example, the combination of a C12 monolithic stationary phase will allow the preconcentration of the peptides in the reversed mode, whereas the acrylamide one will suppress the electroosmotic flow to increase resolution in capillary zone electrophoresis as will be demonstrated.

2. Experimental

2.1. Reagents and chemicals

All the reagents used were of analytical grade. Tetramethoxysilane (TMOS), methyltrimethoxysilane (MTMS), urea, PEG (Mn=10,000), lauryl acrylate, benzoin methyl ether (BME), triethylamine (TEA), methanol (HPLC grade), peptides MET-enkephalin and LEU-enkephalin, thiourea, naphthalene and all the nucleosides were purchased from Sigma-Aldrich (France). Acetonitrile (ACN) (HPLC grade) was purchased from VWR. Acetic acid was from Riedel-de Haënn (Germany). [γ -(methacryloyloxy)propyl]trimethoxysilane (γ -MAPS) and acrylamide were purchased from Acros (France). Tetrahydrofuran (THF) was from Rathburn (UK). Propylbenzene, pentylbenzene, phenylheptane, and octylbenzene were purchased from Fluka (Switzerland). Hexylbenzene was from Alfa-Aesar (France). Phosphate buffer 20 mM and 10 mM were prepared using the adequate proportions of KH₂PO₄ and K₂HPO₄ in water (all reagents were from Sigma-Aldrich, France). All aqueous solutions were prepared using >18 MDI water (Millipore, Molsheim, France). PTFE-coated fused-silica capillaries (TSU 75 μ m i.d.) were purchased from Polymicro Technologies (USA).

2.2. Preparation of methacrylate pre-functionalized silica supports

2.2.1. Synthesis of silica monolith

The preparation conditions of silica monolithic columns were similar to those reported by Hara et al. [39]. Monolithic silica capillary columns were prepared from a mixture of TMOS/MTMS (85:15, v/v). A total of 18 mL of this mixture was added to 40 mL acetic acid (0.01 M) containing 1.9 g PEG and 4.05 g urea and stirred at 0 °C for 30 min. Then the temperature was raised up to 40 °C and the mixture was stirred for 10 min before it was charged into fused-silica capillaries. Filling steps of capillary columns were carried under nitrogen (N₂) pressure using a Nanobaume system (CIL-Cluzeau Info Labo SA). After that, the filled and blocked capillaries were kept at 40 °C overnight for gelification and aging. Then, the temperature was raised slowly up to 120 °C and maintained at this temperature for 4 additional hours to form mesopores with the ammonia generated by the hydrolysis of urea. The monolithic silica columns were then cooled and washed with methanol. Morphological characterization of the monoliths was done using a JEOL nanoscope JCM 5000 (Japan) scanning electron microscope after a gold coating of the samples. The hydrodynamic permeability was determined using Darcy's law and naphthalene as t₀ marker (nonretained solute) in 95/5 acetonitrile/water mobile phase.

2.2.2. Methacrylate pre-functionalization

Prior to surface photopolymerization, silica monoliths or fused silica capillary surfaces were derivatized with a methacrylate functionalized silane (γ -MAPS) to anchor acrylamide coating on the surface by covalent bonding. The silanization solution was composed of the γ -MAPS silanizing agent (5%, v/v), a catalyst (triethylamine) (2.5%, v/v), and a solvent (95/5, v/v, MeOH/Water). Silanization was performed at 80 °C during 3 h under hydrodynamic

Table 1

Optimization of photopolymerization of acrylamide on methacrylate pre-functionalized silica monoliths (capillary length = 10 cm, length from injection to detection = 8.5 cm, i.d. = 75 μm). Mobile phase 90/10, v/v, ACN/Water, $\Delta P = 12$ bar (~ 180 nL/min). Detection at 214 nm (n.d. = not determined). Column-to-column reproducibility less than 8% for retention factor and 15% for H_{min} values ($n \geq 3$).

Acrylamide (w/v%)	Irradiation time		Uracile	Uridine	Adenosine	Cytosine	Cytidine	Guanosine	Permeability
(Bare silica)	×	k	n.d.	0.25	0.9	1.5	1	0.8	$(4.6 \pm 1.1) \times 10^{-14} \text{ m}^2$
		H_{min}	n.d.	7	7	8	6	6	
5%	5 min	k	0.34	0.68	1.08	1.43	1.73	2.2	$(3.5 \pm 1.2) \times 10^{-14} \text{ m}^2$
		H_{min}	9	7	8	8	9	8	
	10 min	k	0.47	0.80	1.1	1.35	1.81	2.4	$(3.8 \pm 0.8) \times 10^{-14} \text{ m}^2$
		H_{min}	9	7	7	8	7	8	
10%	5 min	k	0.57	0.46	1.7	2.19	3.15	4.57	$(4 \pm 1.1) \times 10^{-14} \text{ m}^2$
		H_{min}	32	25	36	21	25	30	
	10 min	k	0.56	1.37	1.7	2.2	3.2	4.5	$(3.7 \pm 1.4) \times 10^{-14} \text{ m}^2$
		H_{min}	25	20	25	16	17	25	

flow. After silanization, monoliths or fused silica capillaries were thoroughly rinsed with MeOH.

2.3. Photopolymerization protocol of acrylamide

The pre-functionalized silica support was filled with a mixture containing 100 mg of acrylamide and 6 mg of BME in 2 mL of 50/50, v/v, MeOH/Water (0.3%, w/v). The capillary was then irradiated for 10 min at 365 nm and washed with methanol.

2.4. Instrumentation

CE experiments were carried out with an Agilent HP3D CE system (Waldbronn, Germany) equipped with a diode array detector and an external pressure device allowing to work up to 12 bar. The control of the electrophoresis system and the data acquisition were carried out by the Chemstation system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). The illumination system used for photopolymerization reactions was a BioLink cross linker (VWR International, Strasbourg, France) equipped with five 8 W UV tubes emitting at 365 nm. An LC pump (Shimadzu LC 10AD, Tokyo, Japan) was used to rinse the capillaries after their fabrication. A Nanobaume system (CIL-Cluzeau Info Labo SA) was used to rinse and charge capillary column under nitrogen pressure.

3. Results and discussion

3.1. Photopolymerization of acrylamide on different silica supports

3.1.1. Silica monolithic supports

Firstly, the influence of different parameters (time of irradiation, concentration of acrylamide in the reaction mixture) has been evaluated in order to optimize the photopolymerization of acrylamide on methacrylate activated silica monoliths. Benzoin methyl ether (BME) was chosen as photoinitiator [15] for its high efficiency as free radical generator under illumination [40]. Its concentration was set at a fixed value (6 mg in 2 mL of polymerization mixture, i.e. 0.3%, w/v) that has been demonstrated to be an adequate concentration for the photopolymerization of various monomers on silica monoliths [15]. The irradiation intensity is not a tunable parameter with the UV-cross-linker used throughout this study (a commonly-used one): the power of illumination (irradiance) of the cross-linker is fixed (2.96 mW/cm² at 365 nm) and only the duration of the irradiation is adjustable.

For this set of experiments, a unique long monolithic column was synthesized and cut into several pieces (of about 12 cm), to allow direct comparison of the grafted columns among themselves and with the bare one, depending on the grafting parameters (amount of acrylamide and irradiation duration).

The obtained PA photografted columns have been characterized by nano-LC in HILIC mode for the separation of a set of nucleosides. Retention factors of six nucleosides used as test solutes, efficiency (expressed as minimal theoretical plate height H_{min} at the optimal velocity of the mobile phase) as well as permeability have been measured in each experimental condition and are given in Table 1.

Retention factor values can be used to compare the “amount of poly(acrylamide) of stationary phase” which is supposed to directly correlate with retention factors, while shifts (losses) in efficiency may give information about the ability of the polymerization process to keep the initial efficiency of the monolith.

Starting monolithic bare silica columns (skeleton size $\sim 1 \mu\text{m}$ and macropores $\sim 2 \mu\text{m}$) exhibit high efficiency, with minimal plate heights of about $6 \pm 1 \mu\text{m}$ and relatively high permeability values ($4.6 \pm 1.1 \times 10^{-14} \text{ m}^2$).

First, it is worth noticing that, whatever the grafting conditions, i.e. acrylamide amount or irradiation duration, the permeability of the monolithic columns is not significantly altered, thus leading to the conclusion that the photopolymerization process does not lead to any obstruction nor to a significant decrease in the diameter of macropores, i.e. that the polymer thickness remains negligible in front of the macropore size ($2 \mu\text{m}$).

For all test solutes, an increase in the retention factors is obtained when the amount of acrylamide is increased in the polymerization mixture: as an example, doubling the amount of acrylamide (from 5% to 10%) results in a twofold increase in the retention factor of the most retained solute guanosine. However, as illustrated by the minimum height plate values measured at the optimal linear velocity (H_{min}), this increase in retention factors is obtained at the expense of efficiencies which decrease after grafting by a more than a twofold factor for all solutes.

The comparison of the efficiency measured for two solutes with similar retention factors ($k = 2.4$), cytosine on the (10%, 10 min) column and guanosine on the (5%, 10 min) column, allows to affirm that the loss of efficiency consecutive to the increase of the acrylamide content in the polymerization mixture is not due to the increase in retention but may be attributed to the larger amount of acrylamide incorporated to the monolith i.e. to a larger thickness of the acrylamide coating. As no variation in permeability is observed, the structure of the monolith (at the micrometric scale) is not significantly modified and the dispersion related to flow anisotropy (A term of the Van Deemter equation) is not affected as well as the B term, related to longitudinal diffusion. As a consequence, a variation in efficiency after the grafting step may only result from a modification of mass transfer kinetics (C term of the Van Deemter equation).

It can be supposed that a thicker acrylamide layer impairs the accessibility of solutes into mesopores that are partially clogged or whose entrance is partially restricted, which results in hindered

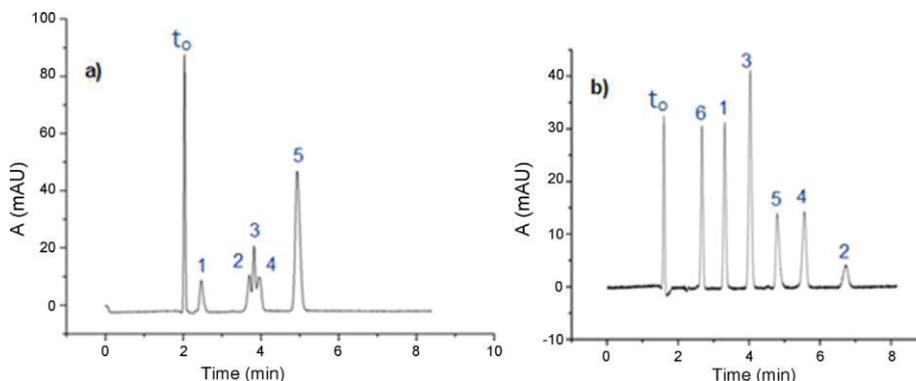


Fig. 1. Separation of six nucleosides on (a) bare silica monolith and (b) PA photografted silica monolith. Dead time t_0 , measured with naphthalene, (1) uridine, (2) guanosine, (3) adenosine, (4) cytosine, (5) cytosine, (6) uracil. Capillary length = 10 cm, length from injection to detection = 8.5 cm, $d_i = 75 \mu\text{m}$. Mobile phase 90/10, v/v, ACN/Water, $\Delta P = 12 \text{ bar}$ ($\sim 180 \text{ nL/min}$). Detection at 214 nm. Temperature: 25°C .

diffusion [41] and accounts for deterioration of the column efficiency. This effect has been already observed by Z. Zajickova et al. [42] who have shown that according to the density of photografted functional groups, the efficiency can drop dramatically. Whatever the amount of acrylamide in the polymerization mixture (5% or 10%), the retention factor of all nucleosides, as well as the efficiencies do not vary significantly with the irradiation time (in the range of 5–10 min). This result indicates that the irradiation duration is not the limiting factor in the photopolymerization process. Short irradiation times (of about 5–10 min) are enough for providing high retentivity compared to that shown in previous report [26] while keeping the intrinsic efficiency of the bare silica monolith. The fact that the efficiency is kept after the grafting clearly demonstrates that the grafting is homogenous across the section of the capillary: a radial heterogeneity consecutive to a bad UV light transmission through the monolith would have altered the efficiencies.

According to this set of experiments, best photopolymerization experimental conditions are 5% acrylamide with a 10 min irradiation duration.

The separation of six nucleosides was compared on all supports: bare silica monolith, γ -MAPS prefunctionalized monolith and acrylamide photografted monoliths. Whereas no retention

was obtained for the six solutes on the γ -MAPS prefunctionalized monolith (results not shown), bare silica monoliths and acrylamide ones both exhibit retention but with quite different selectivities (Fig. 1).

On the silica monolith, nucleosides are unsuccessfully separated and present retention factors ranging from 0.25 for uridine to 1.25 for cytosine. After photopolymerization, the chromatogram (Fig. 1b) shows a baseline separation of the 6 nucleosides. The comparison of the order of elution on both stationary phases highlights a great difference in selectivity and thus well demonstrates the effectiveness of the photopolymerization process. Such a difference in selectivities between bare silica and acrylamide modified silica has already been observed [43]. Finally, the elution order as well as the retention factors of the 6 nucleosides were compared with those obtained with other silica supports grafted with acrylamide including the commercial TSK gel amide column (see Table 2).

Compared to other grafting processes, the retention factors measured on the PA photografted monolith are equal or surpass those obtained with other grafted monoliths already reported [26,27]. The commercial TSK gel amide column is used as a reference. The retentions are much larger (up to a fivefold factor) than the ones obtained on monolithic columns. This is a general

Table 2

Comparison of retention factors of u: uridine, a: adenosine, c: cytosine and g: guanosine obtained with different silica supports grafted with acrylamide. Mobile phase 90/10, v/v, ACN/Water at $\Delta P = 12 \text{ bar}$ ($\sim 180 \text{ nL/min}$). Detection at 214 nm. Temperature 25°C .

Column	Spacer	k_u	k_a	k_c	k_g	$H (\mu\text{m})$
TSK gel amide (commercial column) [26]		3.21	3.6	8.8	10.8	21
Silica monolith grafted with polyacrylamide [26]		0.5	0.58	1.67	2.33	16
One-pot synthesis of hybrid monolith with functional monomer acrylamide [27]		0.47	1.34	1.92	1.92	-
PA photografted silica monolith (this work)		0.89	1.20	1.97	2.67	8

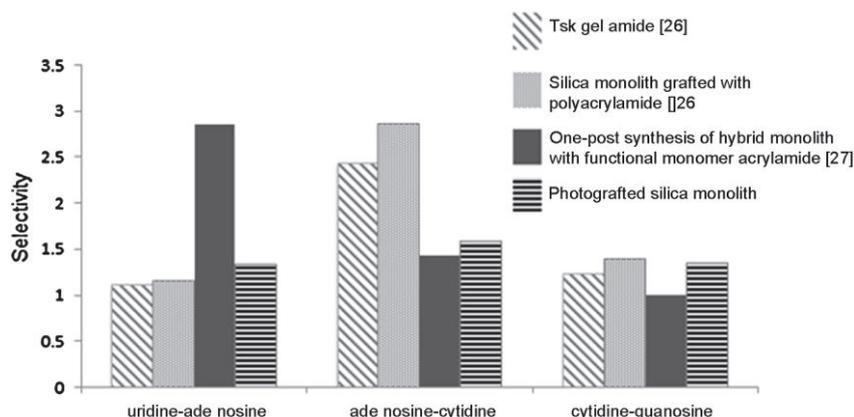


Fig. 2. Comparison of selectivities between four nucleosides obtained on different silica supports grafted with acrylamide. Mobile phase 90/10, v/v, ACN/Water at $\Delta P = 12$ bar (~ 180 nL/min). Detection at 214 nm. Temperature 25 °C.

trend: columns filled with porous silica particles exhibit a larger phase ratio than monolithic materials owing to their lower porosity (about 70% of total porosity for porous particles against 90–95% for monoliths) and similar surface areas. The selectivities between each pair of nucleosides (peaks side to side) have been calculated and reported in Fig. 2. The elution order of nucleotides is similar for all acrylamide columns but some significant differences in selectivities are highlighted according to the grafted silica support. These different behaviors may be attributed to the spacer that links the acrylamide moieties to the silica support (assuming that the underlying monolith structure and composition have minor impact on the final selectivity as can be supported by Fig. 1). In fact, the silica monolith grafted with polyacrylamide [26] and the PA photografted silica monolith only differs by the spacer. The substitution of one atom of oxygen by a nitrogen one on the spacer leads to the dramatic modification of the selectivity between adenosine and cytosine (1.6 vs 2.9). Similarly, the selectivity between uridine and adenosine obtained with the hybrid acrylamide monolith [27] is singular and may result from the presence of the sulfur atom in the spacer.

3.1.2. Covalent coating in fused silica capillaries

A fused silica capillary has been photografted with acrylamide according to the optimized protocol described previously. The efficiency of the PA photopolymerization has been evaluated by the determination of the electroosmotic flow at pH 8.3 (Tris–borate buffer, 44.5 mM) using acetone as a dead time marker and according to Vigh's procedure as reduced EOFs were expected with such a coating [44]. The repeatability and reproducibility of electroosmotic flow measurements were obtained for three different synthesis batches.

Fused silica capillaries exhibit high electroosmotic mobilities at pH 8.3 (up to 4×10^{-4} cm²/V s). The PA photopolymerization process, after only an irradiation duration of 10 min, drastically reduces the electroosmotic mobility down to $(2.9 \pm 1.1) \times 10^{-6}$ cm²/V s (mean value and standard deviation obtained for the measurement of three repetitions on three different batches of functionalization). As the electroosmotic flow is usually considered as negligible when the electroosmotic mobility is less than 2×10^{-5} cm²/V s, the efficiency of the photografting is highly satisfactory (the EOF mobility value measured lies in the domain of uncertainty of the measurement). To demonstrate the interest of the PA photopolymerization process for open tubular applications, the stability of the photografted capillaries was evaluated in acidic (pH 3.6) as well as in basic conditions (pH 8.3). PA photografted capillaries were exposed

to phosphate buffers (20 mM) at these two pH values. The EOF was measured every 5 h according to Vigh's procedure at pH 8.3. Stability measurements are presented in Fig. 3.

All the electroosmotic mobilities were measured at pH 8.3, thus allowing a direct comparison of the results. Each measurement was carried out in triplicate allowing to estimate a RSD value of about 10%. The EOF values increase slightly to reach 2×10^{-5} cm²/V s after 90 h in basic buffer/110 h in acidic buffer. This threshold value of 2×10^{-5} cm²/V s is often used to discard capillaries when a low EOF is required [45]. The stability of the EOF demonstrates the stability of PA photografted coating. The photopolymerization process gives similar results to the initial procedure of Hjertén but the UV-irradiation opens new perspectives for the grafting in defined areas inside capillary.

3.2. Application and interest of localized photopolymerization

A straightforward application of the localized functionalization is presented and concerns the on-line coupling of preconcentration and separation steps in capillary. This tool was used to preconcentrate diluted solutions of two model neuropeptides, Met-enkephalin and LEU-enkephalin, prior to their elution and separation by capillary zone electrophoresis (CZE). Fig. 4 illustrates the experimental set-up in a fused silica capillary that integrates two defined areas. At the inlet end, a 2-cm length silica monolith photografted with lauryl acrylate (C12) serves as solid phase microextraction support. This hydrophobic support was elaborated

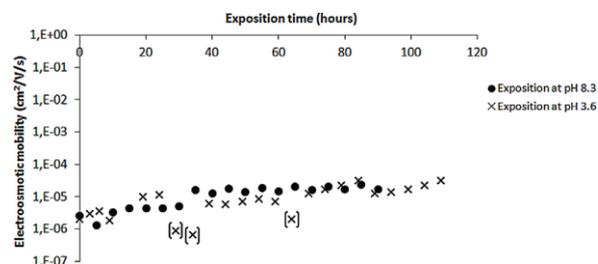


Fig. 3. Evolution of electroosmotic mobility after exposure of PA photografted capillaries to acidic or basic buffers. EOF measured with acetone according to Vigh's procedure in Tris–borate buffer 44.5 mM pH 8.3. Exposure to basic medium (phosphate buffer 20 mM pH 8.3) and to acidic medium in phosphate buffer 20 mM pH 3.6. Capillary length = 33 cm, length from injection to detection = 24.5 cm, i.d. = 75 μ m. Detection at 280 nm; the three values between brackets are outliers that can be discarded owing to the general trend.

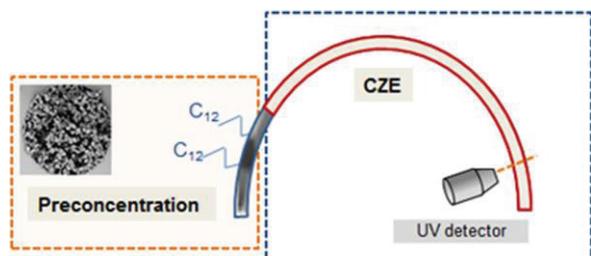


Fig. 4. Scheme of the capillary developed for the on-line coupling of the preconcentration and separation of neuropeptides. Capillary length = 33 cm, length from injection to detection = 8.5 cm, i.d. = 75 μm .

according to the procedure described in a previous work [15]. The rest of the capillary column (open tube) is used to separate the preconcentrated peptides by CZE. In addition to being automated, the on-line coupling at microscale allows to handle low volumes of dilute samples.

Some experimental set-ups integrating a solid phase extraction at the inlet of capillary column and their interest have been previously reported [38,46] and rely either on home-made particulates SPE microcartridges connected upstream the empty capillary, trapping of magnetic particle or on monoliths in situ synthesized.

The proposed methodology herein is a simple and rapid alternative to some cumbersome approaches allowing to prepare different areas inside a capillary without any connection and with the full control of all the surfaces chemistries involved in the whole analytical process.

Two neuropeptides, Met and Leu enkephalin were used as test solutes. The preconcentration and elution of these solutes have already been successfully reported using SPE-CE-MS method (with LOD as low as 1 ng mL^{-1}) [47,48] and this separation model was considered herein to demonstrate the interest of the photopolymerization process with UV detection although it does not claim to be challenging to MS detection systems.

The relatively high permeability of the silica monolith allows to percolate large sample volumes (up to few microliters) compared to the volume of the monolithic stationary phase (about a hundred nanoliters) in a few minutes. The elution of the peptides is achieved by injecting hydrodynamically a plug of methanol/phosphate buffer pH 2.2 (75/25, v/v) of approx. 50 nL. The elution plug is then moved out of the monolith to about 2 cm inside the open tube capillary before the application of the separation voltage. The optimized electrophoretic separation of preconcentrated peptides without any further modification of the capillary wall of the empty section is given in Fig. 5a. The preconcentration/elution/separation process only leads to a partial separation of the two peptides.

The low resolution between the two solutes may be attributed to two different phenomena. The presence of a monolithic segment inside an empty capillary is known to affect the “apparent” electroosmotic flow inside the empty segment of the capillary and to deteriorate the efficiency by modifying the flow profile [49]. As demonstrated by Rathore [49] when a packed and open segments (segments of different porosities and/or different zeta potentials) are connected in series, the mass conservation law requires that the volumetric flow rate of the mobile phase has to be the same in the two segments. The pressure at the interface of the packed and open segments becomes different from that at the inlet and outlet of the monolithic segment (ambient pressure). This “flow equalizing intersegmental pressure”, provides a mechanism to alter the velocities, in order to satisfy the conservation of volumetric flow rate but leads to the creation of hydrodynamic flow.

This hydrodynamic flow participates in peak broadening and may thus lead to a loss of resolution as already reported by Byrne

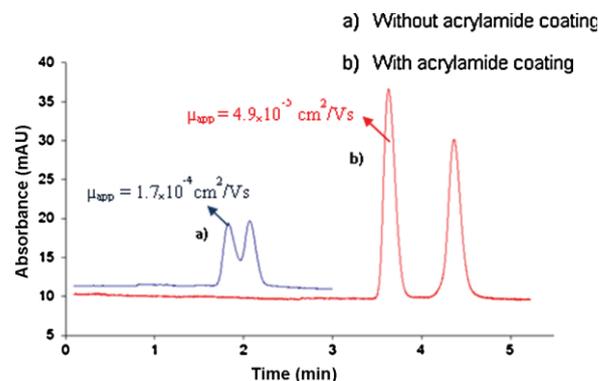


Fig. 5. Separation of Met and Leu-enkephalin by CZE after preconcentration on C12-photopolymerized silica monolith (a) without acrylamide coating and (b) with acrylamide coating. Capillary total length = 33 cm, length from injection to detection = 8.5 cm, i.d. = 75 μm . Phosphate buffer 10 mM pH 3.6. $U =$ (a) 10 kV (b) 20 kV. Solution of Met and Leu-enkephalin at 10 $\mu\text{g/mL}$. Percolated volume of (a) 200 nL (b) 1 μL . Length of monolith: (a) 1 cm^* (b) 1.5 cm^* . Elution with 50 nL of MeOH/phosphate buffer pH 2.2 (75/25). *The length of the monolith is different between the two experiments because of the constraints of the capillary cartridge dimensions that forced us, in the second case, to keep 1.5 cm of monolith so that the entire length of the capillary fitted with the minimum length for the entire column.

et al. who has demonstrated that segmented column can sometimes have a deleterious effect on separation [50]. Secondly, the lack of resolution may result from the high apparent mobility of the cationic solutes that can be lowered by decreasing the co-directional electroosmotic mobility. In order to overcome both these issues, the capillary wall was photografted with acrylamide according to the photopolymerization procedure. This procedure largely reduces the EOF with two positive impacts on the separation step. In the absence of EOF, the hydrodynamic flow is eliminated thus avoiding a potential band broadening effect and the apparent mobility is significantly reduced.

The electropherogram after percolation/elution/separation on PA photografted capillary is given Fig. 5b. The two solutes migrate more slowly due to the elimination of the EOF and are fully separated in less than 5 min. The photopolymerization of PA in the separation tube greatly improves the resolution. The short difference in length of the monolith cannot be responsible for the separation improvement: it should be the opposite as it decreases the remaining length of the capillary (before the detection window) available for the electrokinetic separation. The length of the monolith has only an impact on its preconcentration capacity.

4. Conclusion

Control of the physico-chemical properties at the microscale is a prerequisite to the development of miniaturized devices. Silica is widely implemented as chromatographic solid support as well as microfluidic system. With the increasing need of integrated and miniaturized analytical tools, the design of flexible, localizable and simple surface functionalization of silica is challenging. A simple and convenient strategy which involves photopolymerization of acrylamide to prepare hydrophilic coating on fused silica and monolithic column by UV irradiation is reported. Short irradiation time, less than 10 min in the presence of acrylamide (5%, w/v) and photoinitiator (0.1%, w/v) leads to highly retentive HILIC column without affecting the intrinsic chromatographic properties of the silica monolith (H_{min} of $6 \pm 1 \mu\text{m}$ and permeability of $(4.6 \pm 1.1) \times 10^{-14} \text{ m}^2$). 6 nucleosides were thus successfully separated by nano-LC analysis. Direct transfer of the optimized protocol was then used to prepare PA coated fused silica capillaries.

The obtained layers have a similar behavior compared to the PA coating used as reference according to Hertjén's protocol. The photopolymerization is moreover rapid, simple and localizable. The photochemical process investigated was then used to improve the preconcentration and separation of two neuropeptides. The analytical device is composed by the in-line coupling of a 2 cm length monolithic segment (SPE column) at the entrance of an electrophoresis capillary column. Preconcentration of model solutes was realized according to a reversed phase mechanism on a C12 photografted silica monolithic segment whereas the separation of the eluted peptides was successfully realized by capillary electrophoresis inside a PA photopolymerized capillary. This example highlights the importance of the control of the physico-chemical properties inside miniaturized devices.

References

- [1] M.-P. Barrioulet, N. Delaunay-Bertoncini, C. Demesmay, J.-L. Rocca, *Electrophoresis* 26 (2005) 4104.
- [2] Y. Ladner, G. Crétier, K. Faure, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 8001.
- [3] Y. Huo, P.J. Schoenmakers, W.T. Kok, *J. Chromatogr. A* 1175 (2007) 81.
- [4] O. Núñez, K. Nakanishi, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A* 1191 (2008) 231.
- [5] J. Courtois, M. Szumski, E. Byström, A. Iwasiewicz, A. Shchukarev, K. Irgum, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 14.
- [6] N.J. Munro, A.F.R. Hühmer, J.P. Landers, *Anal. Chem.* 73 (2001) 1784.
- [7] C.M. Halliwell, A.E.G. Cass, *Anal. Chem.* 73 (2001) 2476.
- [8] V. Dugas, Y. Chevolut, C. Demesmay, E. Souteyrand, *Organosilanes: Properties, Performance and Applications*, Nova Science Publishers, Hauppauge, NY, 2010.
- [9] M. Wu, R.a. Wu, Z. Zhang, H. Zou, *Electrophoresis* 32 (2011) 105.
- [10] N.W. Li, W.H. Binder, *J. Mater. Chem.* 21 (2011) 16717.
- [11] H. Colon, X. Zhang, J.K. Murphy, J.G. Rivera, L.A. Colon, *Chem. Commun.* (2005) 2826.
- [12] M. Wu, R.a. Wu, R. Li, H. Qin, J. Dong, Z. Zhang, H. Zou, *Anal. Chem.* 82 (2010) 5447.
- [13] M. Wu, Y. Chen, R.a. Wu, R. Li, H. Zou, B. Chen, S. Yao, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 4389.
- [14] L. Xu, H.K. Lee, *J. Chromatogr. A* 1195 (2008) 78.
- [15] R. El-Debs, V. Dugas, C. Demesmay, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 993.
- [16] S.C. Churms, *J. Chromatogr. A* 720 (1996) 151.
- [17] R. Li, J. Huang, *J. Chromatogr. A* 1041 (2004) 163.
- [18] Z. Hao, C.-Y. Lu, B. Xiao, N. Weng, B. Parker, M. Knapp, C.-T. Ho, *J. Chromatogr. A* 1147 (2007) 165.
- [19] M.A. Strege, S. Stevenson, S.M. Lawrence, *Anal. Chem.* 72 (2000) 4629.
- [20] P. Hemström, K. Irgum, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1784.
- [21] M.A. Strege, *Anal. Chem.* 70 (1998) 2439.
- [22] Y. Hsieh, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 14811.
- [23] B. Buszewski, S. Noga, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 231.
- [24] T. Yoshida, *J. Biochem. Biophys. Methods* 60 (2004) 265.
- [25] T. Yoshida, *Anal. Chem.* 69 (1997) 3038.
- [26] T. Ikegami, H. Fujita, K. Horie, K. Hosoya, N. Tanaka, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 578.
- [27] M.L. Chen, J. Zhang, Z. Zhang, B.F. Yuan, Q.W. Yu, Y.Q. Feng, *J. Chromatogr. A* 1284 (2013) 118.
- [28] S. Hjerten, *J. Chromatogr.* 347 (1985) 191.
- [29] H. Engelhardt, M.A. Cuñat-Walter, *J. Chromatogr. A* 716 (1995) 27.
- [30] H. Wan, M. Öhman, L.G. Blomberg, *J. Chromatogr. A* 924 (2001) 59.
- [31] L. Gao, S. Liu, *Anal. Chem.* 76 (2004) 7179.
- [32] A. Cifuentes, P. Canalejas, J.C. Díez-Masa, *J. Chromatogr. A* 830 (1999) 423.
- [33] K. Srinivasan, C. Pohl, N. Avdalovic, *Anal. Chem.* 69 (1997) 2798.
- [34] A. Cifuentes, J.C. Díez-Masa, J. Fritz, D. Anselmetti, A.E. Bruno, *Anal. Chem.* 70 (1998) 3458.
- [35] K. Kubo, *Anal. Biochem.* 241 (1996) 42.
- [36] K. Kubo, *J. Chromatogr. B* 697 (1997) 217.
- [37] E. Carrilho, M.C. Ruiz-Martinez, J. Berka, I. Smirnov, W. Goetzinger, A.W. Miller, D. Brady, B.L. Karger, *Anal. Chem.* 68 (1996) 3305.
- [38] R. Ramautar, G.W. Somsen, G.J. de Jong, *Electrophoresis* 31 (2010) 44.
- [39] T. Hara, S. Makino, Y. Watanabe, T. Ikegami, K. Cabrera, B. Smarsly, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 89.
- [40] Y. Ladner, A. Bruchet, G. Crétier, V. Dugas, J. Randon, K. Faure, *Lab Chip* 12 (2012) 1680.
- [41] R.E.B.J.S. Schultz, *Science* 170 (1970) 1302.
- [42] Z. Zajickova, J. Luna, F. Svec, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 33 (2010) 1640.
- [43] Y. Guo, S. Gai, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 5920.
- [44] B.A. Williams, G. Vigh, *Anal. Chem.* 68 (1996) 1174.
- [45] P. Anres, N. Delaunay, J. Vial, P. Gareil, *Electrophoresis* 33 (2012) 1169.
- [46] N.A. Guzman, T. Blanc, T.M. Phillips, *Electrophoresis* 29 (2008) 3259.
- [47] E. Hernández, F. Benavente, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa, *Electrophoresis* 28 (2007) 3957.
- [48] R. Ramautar, C.K. Ratnayake, G.W. Somsen, G.J. de Jong, *Talanta* 78 (2009) 638.
- [49] A.S. Rathore, *Electrophoresis* 23 (2002) 3827.
- [50] C.D. Byrne, N.W. Smith, H.S. Dearie, F. Moffatt, S.A.C. Wren, K.P. Evans, *J. Chromatogr. A* 927 (2001) 169.

II.2. Colonnes multimodales modifiées par photopolymérisation pour l'analyse d'enképhalines par couplage « in-line » μ -SPE/dérivation sur support/CZE/LIF

L'objectif de la troisième partie de ce chapitre est de démontrer l'intérêt de la localisation du greffage pour la réalisation de colonnes multimodales. L'application retenue pour illustrer le potentiel de ces colonnes multimodales est l'analyse de neuropeptides (Met-enképhaline et Leu-enképhaline) incluant, « in-line », une étape de préparation d'échantillon par micro-extraction sur phase solide (μ SPE sur silice photopolymérisée C12), de dérivation sur support, puis de séparation par électrophorèse capillaire (CZE sur capillaire sans FEO, photopolymérisé acrylamide) avant une détection par spectrométrie de fluorescence induite par laser (LIF). Une étude bibliographique sur l'analyse de ces peptides recense tout d'abord les principales méthodes utilisées à l'heure actuelle pour réaliser cette analyse et dresse un cahier des charges de la méthode à développer. Une étude de faisabilité d'un système d'analyse en ligne pour la préconcentration/séparation de la Met et Leu-enképhaline est ensuite présentée. La dérivation sur support est ensuite étudiée de façon « off-line » afin d'optimiser les différents paramètres de dérivation. Bien que le couplage de l'ensemble des étapes ne soit pas totalement achevé, les résultats sont tout de même présentés dans cette troisième partie.

II.2.1. Etude bibliographique

De par leur forte implication dans des mécanismes de réponses immunitaires [2], la détection des peptides de type opioïdes représente aujourd'hui un enjeu de taille dans l'industrie pharmaceutique et le domaine du biomédical. On distingue parmi ce groupe de neurotransmetteurs la catégorie des enképhalines avec, entre autres, la Met-enképhaline et Leu-enképhaline qui présentent des propriétés analgésiques semblables à la morphine et permettent ainsi d'atténuer ou même de supprimer les sensations de douleur [3]. Du fait de leur capacité à diminuer la vitesse de renouvellement de la noradrénaline et à augmenter celle de la dopamine, ces molécules se retrouvent indirectement impliquées dans les pathologies neurologiques telles que la maladie de Parkinson, d'Alzheimer, la schizophrénie ou encore la dépression [4, 5]. La présence de ces composés à des faibles concentrations (0,1 à 0,01 ng/mL) et dans des matrices biologiques complexes et disponibles en faibles quantités, nécessite l'utilisation de systèmes séparatifs miniaturisés adaptés. L'électrophorèse capillaire représente actuellement une technique de choix dans l'analyse de composés bioactifs, par son pouvoir de séparation élevé, la rapidité des analyses, le faible volume d'échantillon nécessaire ou encore son faible coût d'exploitation [6-8]. Cependant, du fait des faibles quantités analysées, la sensibilité de cette technique reste parfois limitée. Ainsi, afin d'améliorer les limites de détection, plusieurs approches sont proposées dans la littérature. Bien que les techniques de préconcentration électrophorétique telles que la focalisation isoélectrique (IEF) ou encore le « Large Volume Sample Stacking » (LVSS) permettent d'obtenir des facteurs de préconcentration très élevés, elles ne permettent pas de purifier l'échantillon et les conditions d'injection doivent satisfaire certains critères parfois contraignants en termes de conductivité de l'échantillon, de pH...[9]. L'intégration d'une étape préalable de purification/préconcentration chromatographique par extraction sur phase solide (sur pré-colonne), en amont de la séparation est actuellement l'alternative la plus robuste et la plus adaptée à l'analyse d'échantillons complexes. Le couplage de cette pré-colonne avec l'étape de séparation peut se faire de façon « in-line » ou « on-line » comme présenté dans la partie « Contexte ». Le **Tableau 8** ci-dessous énumère les différentes stratégies proposées dans la littérature pour l'analyse de la Met et de la Leu-enképhaline.

Tableau 8 : Présentation des différentes stratégies rapportées dans la littérature pour l'analyse de la Met et Leu enképhalines.

Peptides analysés (Volume d'échantillon percolé)	Type de couplage	Mode de préconcentration	Type de colonne pour la préconcentration	Dimensions de la colonne de préconcentration	Type de séparation	Détection	Limite de détection	Réf
Préconcentration sur pré-colonne monolithique								
Leu-Enk (50µL)	On-line	RP-SPE	Particules C18 de 5 µm piégées dans un monolithe	5mm×320µm (di) ou 5mm×530µm (di)	RPLC	UV	0,87 ng/µL	[10]
Met et Leu-Enk (10µL)	On-line	RP-SPE	Monolithe poly-(styrene-divinylbenzene)	10mm×0,2mm (di)	RPLC	UV	< 0,1 ng/µL	[11]
Met-Enk (3,2µL)	In-line	RP-SPE	Monolithe	5mm *50µm	CE	MS	1 ng/mL	[12]
Met-Enk (75µL)	On-line	RP-SPE	Monolithe de silice avec pores de 0,3 à 5 µm (couches de monolithe sur les parois)	7mm *250 µm di	CE	UV	0,5 à 1 µg/mL	[13]
Préconcentration sur pré-colonne particulaire								
Met et Leu-Enk (50µL)	On-line	RP-SPE	Particules C18 de 5 µm	4mm×3mm (di)	CE	UV	1,5 µg/mL	[14]
Met et Leu-Enk (10µL)	On-line	RP-SPE	Particules C18 de 5 µm	4mm×3mm (di)	CE	UV	1,5 µg/mL	[15]
Met-Enk (20µL)	On-line	RP-SPE	Particules C18 de 5 µm	5 mm×0,5 mm (di)	RPLC	UV	100 ng/mL	[16]

Met-Enk (100µL)	On-line	RP-SPE	Particules C18	5mm*0,5mm (di)	CE	MS	1 ng/mL	[17]
Met et Leu-Enk (250µL)	On-line	RP-SPE	Particules C18 de 5 µm	5mm*0,5mm (di)	CE	UV	5ng/mL	[18]
Met et Leu-Enk (250µL)	On-line	RP-SPE	Particules C18 de 5 µm	5mm*0,5mm (di)	CE	UV	5-10ng/mL	[19]
Met-Enk (33µL)	On-line	RP-SPE	Particules C18	7mm*250 µm di*360 µm od	CE	MS	1 ng/mL	[20]
Met-Enk (8µL)	In-line	RP-SPE	Particules C18 de 55-105 µm	4mm*150µm id*365 µm od	CE	MS	2 pg/mL	[21]
Préconcentration par LVSS								
Leu-Enk (758 nL)	In-line	LVSS	-	-	CE	LIF	1,5 pg/mL	[22]
Sans préconcentration								
Met et Leu-Enk (11,1 nL)	-	-	-	-	CE	UV	0,426 µg/mL (Leu) et 0,873 µg/mL (Met)	[23]
Met et Leu-Enk (13,9 nL)	-	-	-	-	MEKC	LIF	~ 0,3 ng/mL	[24]
Met et Leu-Enk (qq's nL)	-	-	-	-	CE	UV	0,82 µg/mL (Leu) et 0,34 µg/mL (Met)	[25]

La quantification des peptides dans le liquide céphalorachidien implique de pouvoir atteindre des limites de détection inférieures au ng/mL. D'après les différents travaux rapportés dans le **Tableau 8**, de telles limites de détection peuvent être obtenues en combinant une étape de préconcentration avec une détection ultra-sensible de type spectrométrie de masse (MS) ou fluorescence induite par laser (LIF). Bien moins onéreuse, la détection LIF nécessite cependant une étape préalable de dérivation afin d'apporter au peptide un groupement fluorophore. Plusieurs systèmes de dérivation ont été envisagés dans la littérature, mettant en jeu différents couples d'agents fluorogènes et nucléophiles. Largement utilisé pour la stabilité des dérivés formés et la rapidité de la réaction de dérivation [26], le système naphthalene-2,3-dicarboxaldéhyde/cyanure (NDA/CN⁻) reste aujourd'hui le plus utilisé dans l'analyse de peptides [27-31], d'acides aminés [32, 33] ou encore de lipides [34]. Cette réaction de dérivation met en jeu une molécule de NDA qui réagit sur l'amine primaire du composé à dériver en présence d'ions nucléophiles CN⁻. Marlène Lacroix et al. ont également rapporté l'utilisation de la NDA comme agent fluorogène mais avec le N,N-diméthylaminoethanethiol comme nucléophile [35] pour la dérivation d'enképhalines. Cependant, les composés dérivés formés avec ce type de nucléophile présentent des fluorescences nettement moins importantes. D'autres systèmes, toujours à base de NDA mais avec des nucléophiles tels que le 2-mercaptoethanol ou l'éthane thiol, conduisent à des temps de dérivation intéressants de quelques secondes et des rendements de dérivation encore plus importants [36-38]. Néanmoins, les produits de dérivation sont particulièrement instables et l'intensité de fluorescence de la solution diminue considérablement au bout de quelques minutes [36]. Enfin, bien d'autres systèmes tels que les systèmes 3-(p-carboxybenzoyl) quinoline-2-carboxaldéhyde (CBQ)/CN⁻, 3-(2-furoyl) quinoline-2-carboxaldéhyde (FQ) /CN⁻ ou encore avec la fluorescéine isothiocyanate (FITC) ont également été utilisés dans la dérivation de peptides [39], d'acides aminés [40] et de protéines [41] mais les temps de réaction de dérivation souvent longs représentent un frein majeur dans le cas d'une analyse en ligne. De plus, les prix des composés CBQ et FQ restent excessifs.

La dérivation en système miniaturisé peut être réalisée selon plusieurs approches différentes [42]. La dérivation *pré-colonne* consiste à dériver préalablement les composés en solution, avant de les injecter dans le capillaire de séparation [28, 29, 33]. Bien que cette approche soit la plus simple à mettre en œuvre, une dilution de l'échantillon dans la solution de dérivation est nécessaire et rend délicate l'analyse d'échantillons déjà très dilués. De plus, dans le cas de la préconcentration par LVSS présentée par Siri et al [22], la dérivation des peptides est réalisée de façon off-line sur des volumes d'échantillons de 500 µL. Cette approche n'est donc pas très adaptée à l'analyse de faibles volumes d'échantillon. Enfin, certains composés dérivés n'étant pas très stables, une dégradation partielle avant l'injection peut entraîner des variations dans la quantification des pics d'intérêt. Dans l'approche dite *in-colonne*, le composé à dériver ainsi que les agents de dérivation sont injectés dans un ordre approprié permettant, à partir de leurs vitesses et sens d'électromigration relatifs, leur mélange

directement dans le capillaire [43]. Bien qu'il soit possible, dans cette approche, d'analyser des faibles volumes d'échantillon, les conditions de dérivation doivent être compatibles avec les conditions de séparation en électrophorèse capillaire et certains produits de dérivation ainsi que ceux de dégradation sont également analysés dans le capillaire, ce qui peut altérer les séparations. Les proportions du composé à dériver et des agents de dérivation doivent être également judicieusement choisies afin d'éviter des dérivations multiples dans le cas de composés disposant de plusieurs sites de dérivation. Une troisième approche dite *post-colonne* consiste à séparer au préalable les composés non dérivés. Les réactifs de dérivation sont ensuite injectés en continu en sortie de colonne et la réaction de dérivation a lieu dans un réacteur [37, 38]. La conception de la cellule de dérivation reste un challenge important dans ce type d'approche et un équipement assez complexe est requis (**Figure 33**). De plus, du fait de l'injection en continu des agents de dérivation dans le détecteur, le bruit de fond est souvent important au cours de l'analyse et la dispersion des pics est augmentée dans la cellule de dérivation.

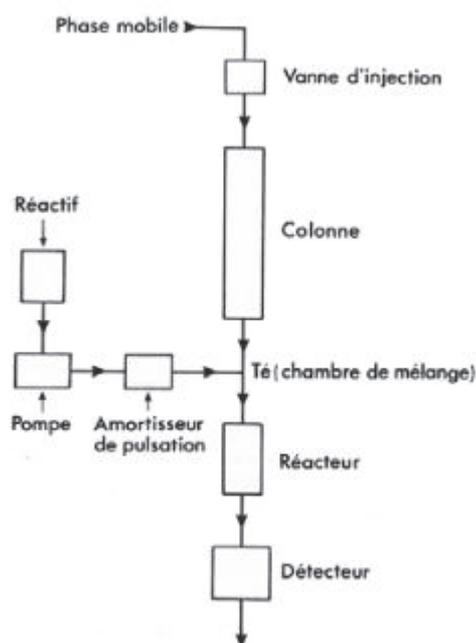


Figure 33: Schéma de principe d'un dispositif de dérivation post-colonne.

Une dernière approche peut également être envisagée et consiste à réaliser la dérivation, en ligne, directement sur un support solide intégré en amont de la zone de séparation. Le principe consiste à fixer préalablement l'un des deux réactifs sur ce support (soit le composé à dériver soit l'agent fluorogène) et à injecter le reste des réactifs dans une deuxième étape. Une étape de lavage permet ensuite l'élimination de tous les composés non retenus ou non consommés sur le support. Enfin, une étape d'élution permet d'éluer les composés dérivés, pour les séparer dans la deuxième zone. Le protocole de dérivation étant réalisé en un temps très court et immédiatement avant la séparation, il

ne devrait pas y avoir de dégradation des composés dérivés ni de produits de dégradation interférents sur le chromatogramme ou l'électrophérogramme. De plus avec une telle configuration, il est possible d'intégrer sur un seul et unique support, la purification, la préconcentration et la dérivation de l'échantillon ce qui est particulièrement intéressant dans le cas des analyses de traces.

Actuellement, seuls quelques groupes ont proposé la dérivation sur support, avec par exemple le groupe de Tao [41] pour la dérivation de protéines sur cartouche SPE ou encore le groupe de Felhofer [44] pour la dérivation d'amines primaires sur particules de silice fonctionnalisées. Cependant, l'étape de dérivation n'est pas directement couplée à la zone de séparation.

La première partie de ce travail sera consacrée à l'étude de faisabilité d'un système d'analyse en ligne pour la préconcentration/séparation de la Met et Leu-enképhaline. La colonne multimodale utilisée présente deux zones avec, en tête de colonne, une partie monolithe de silice de 2 cm photofonctionnée C12 (par photopolymérisation) qui permettra la préconcentration des peptides. Le reste du capillaire vide, photofonctionné en surface par de l'acrylamide (toujours par photopolymérisation), constituera la zone de séparation des peptides en CZE. Ces travaux ont été brièvement décrits dans la publication « Photopolymerization of acrylamide as a new functionalization way of silica monoliths for hydrophilic interaction chromatography and coated silica capillaries for capillary electrophoresis » présentée dans la deuxième partie de ce chapitre. Une description plus détaillée du protocole d'analyse est ici proposée. Dans la deuxième partie, l'objectif est de développer un système d'analyse pour la préconcentration/dérivation et séparation en ligne de la Met et la Leu-enképhaline. Ce système devrait permettre de gagner en sensibilité grâce à la détection par fluorescence. Pour des raisons de praticité, la dérivation sur support a d'abord été optimisée en « off-line ». Bien que les résultats de préconcentration /dérivation sur support aient été concluants avec cette approche « off-line », les essais de couplage « en-ligne » de l'intégralité des étapes ont soulevé de nombreuses difficultés. La préconcentration/dérivation/séparation en ligne de la Met et la Leu-enképhaline n'est actuellement pas achevée mais les résultats obtenus en « off-line » seront tout de même présentés dans cette troisième partie. En effet, un couplage avec la spectrométrie de masse (CZE-ESI-TOF-MS) a été récemment installé au sein du laboratoire et devrait permettre d'identifier les composés et de comprendre leur migration au sein du capillaire. De même, la dérivation de peptides pourrait éventuellement présenter un intérêt pour leur détection en spectrométrie de masse. Les travaux de Marlène Lacroix rapportent une étude sur la dérivation de peptides en amont d'une détection par spectrométrie de masse mais l'efficacité de cette approche en termes d'efficacité (gain en sensibilité et/ou spécificité) n'a pas été clairement démontré [30].

Enfin, la dérivation en « off-line » pourrait être utilisée, à terme, par exemple pour la dérivation sur des embouts de micropipettes remplis de monolithe.

II.2.2. Partie expérimentale

II.2.2.1 Etude de faisabilité d'un système d'analyse en ligne pour la préconcentration/séparation de la Met et Leu-enképhaline

- Protocole de percolation/élution des peptides sur capillaire C12/Acrylamide

La préconcentration/ séparation en ligne de la Met et Leu-enképhaline est réalisée dans un capillaire composé d'une courte section (2 cm) de monolithe de silice photopolymérisé C12, permettant la préconcentration des peptides, et d'une section de capillaire vide d'environ 30 cm, photogreffée acrylamide, pour leur séparation en électrophorèse capillaire. Les conditions détaillées pour la préparation de la colonne sont données dans la publication « Photopolymerization of acrylamide as a new functionalization way of silica monoliths for hydrophilic interaction chromatography and coated silica capillaries for capillary electrophoresis ». Le protocole de percolation/élution des peptides est présenté **Figure 34**.

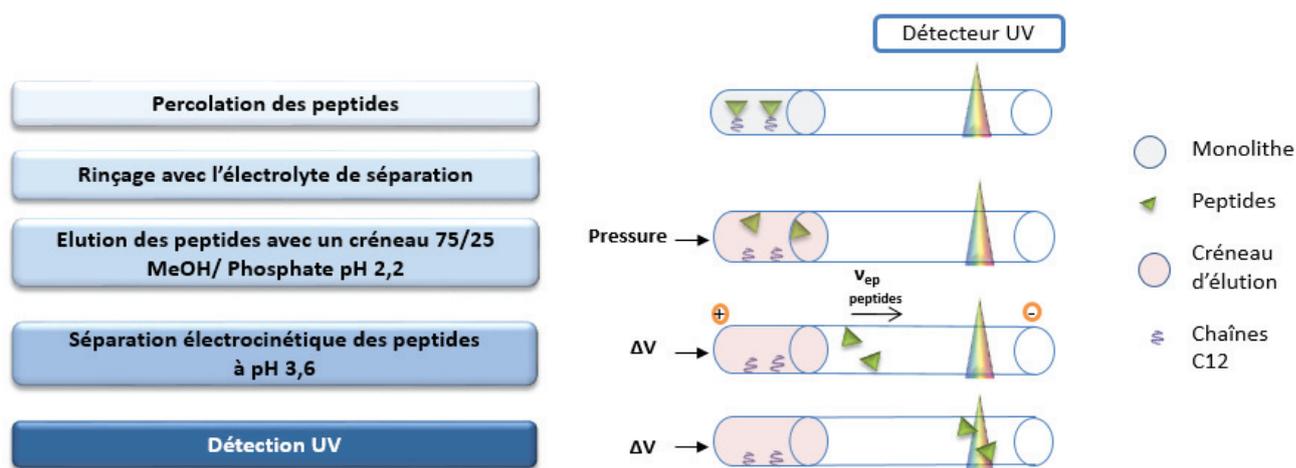


Figure 34: Protocole de percolation/élution des peptides dans un capillaire C12/Acrylamide.

Les peptides sont, dans un premier temps, percolés dans de l'eau pour permettre une préconcentration en phase inverse. Le capillaire est ensuite rincé avec l'électrolyte de séparation pour préconditionner le capillaire avec l'électrolyte avant l'étape de séparation. Afin d'optimiser la séparation des deux peptides, un tampon phosphate de 10 mM à un pH de 3,6 proche du pka des peptides est choisi comme électrolyte de séparation pour maximiser l'écart de mobilité entre les deux peptides (**Figure 35**).

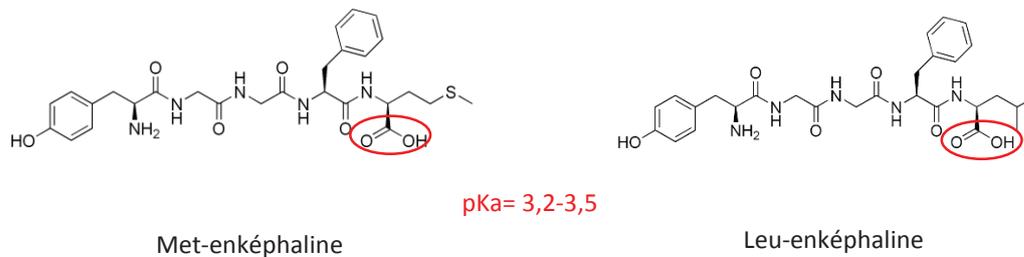


Figure 35 : Molécules de Met et Leu-enképhaline.

Un créneau d'élution de 2 cm (environ 100 nL), contenant 75% de MeOH et 25% de tampon phosphate à pH 2,2 est ensuite injecté sur le monolithe afin d'éluer les peptides (étape d'élution). Le pH de 2,2 est important car il assure l'ionisation des peptides dans le créneau d'élution. En effet, la mobilité électrophorétique des peptides étant liée à leur état de charge, il est important de maximiser leur charge dans le créneau d'élution, afin de leur permettre de « sortir » du créneau d'élution par électromigration lors de la mise sous tension. L'étape de séparation est réalisée par électrophorèse capillaire en appliquant une tension positive de +20 kV aux bornes du capillaire. Les peptides portant une charge nette positive, migrent en direction de la cathode sous l'effet de l'électromigration et du flux électroosmotique résiduel.

- **Influence du revêtement acrylamide dans la zone de séparation des peptides**

Les premiers essais de préconcentration des deux peptides ont été réalisés sur une colonne capillaire contenant une partie monolithe de silice de 2 cm photopolymérisée C12 et une partie vide du capillaire sans revêtement acrylamide (avec uniquement des fonctions acrylates résultant de la préfonctionnalisation en surface). L'électrophorégramme obtenu lors de l'injection de 200 nL d'une solution à 10 µg/L de chacun des deux peptides (**Figure 37-a**) met en évidence une résolution insuffisante. La relation reliant la résolution aux différents paramètres expérimentaux et grandeurs électrophorétiques (dans le cas où la diffusion est la seule source de dispersion) est présentée **Figure 36**.

$$R_s = \sqrt{\frac{l \times V}{32 \times L \times D_m}} \times \frac{\Delta \mu}{\sqrt{\bar{\mu}}}$$

Figure 36: Formule de la résolution en chromatographie avec R_s : résolution, V : tension, $\Delta \mu$ = différence de mobilité électrophorétique, $\bar{\mu}$ = moyenne des mobilités apparentes, l : longueur jusqu'à la détection, L : longueur totale du capillaire et D_m : coefficient de diffusion.

D'après cette relation, une amélioration de la résolution peut être obtenue par :

- **Une augmentation de la différence de mobilité électrophorétique $\Delta\mu_{ep}$.** Le pH de 3,6 (proche du pKa des peptides) retenu pour la séparation est le pH optimum permettant de maximiser la valeur de $\Delta\mu_{ep}$ [45,46].
- **Une augmentation de la tension aux bornes du capillaire V .** Des essais réalisés avec des tensions variant de +10kV à +30kV n'ont pas permis de mettre en évidence une différence significative sur la qualité de séparation des peptides. Une tension de +20 kV a été maintenue pour la suite des essais.
- **Une diminution de la mobilité électroosmotique dans le capillaire μ_{eo} (réduction de μ).** Une diminution voire suppression du flux électroosmotique dans la partie vide du capillaire (zone de séparation) devrait permettre l'amélioration de la séparation.

Un revêtement acrylamide, connu pour ses propriétés de suppression de flux électroosmotique et de revêtement anti-adsorption a été photopolymérisé dans la partie vide du capillaire. La valeur du flux électroosmotique mesurée à environ 10^{-6} cm²/V/s (contre 10^{-4} cm²/V/s) à pH 8,3 montre l'efficacité du revêtement. L'électrophorégramme obtenu après préconcentration (1μL de solution à 10 μg/mL), élution et séparation des peptides est présenté **Figure 37-b**. Il met en évidence une nette amélioration de la résolution suite à la suppression du flux électroosmotique.

La comparaison des mobilités apparentes pour le 1^{er} peptide élué (Met) avec et sans suppression de flux illustre clairement l'intérêt du revêtement acrylamide.

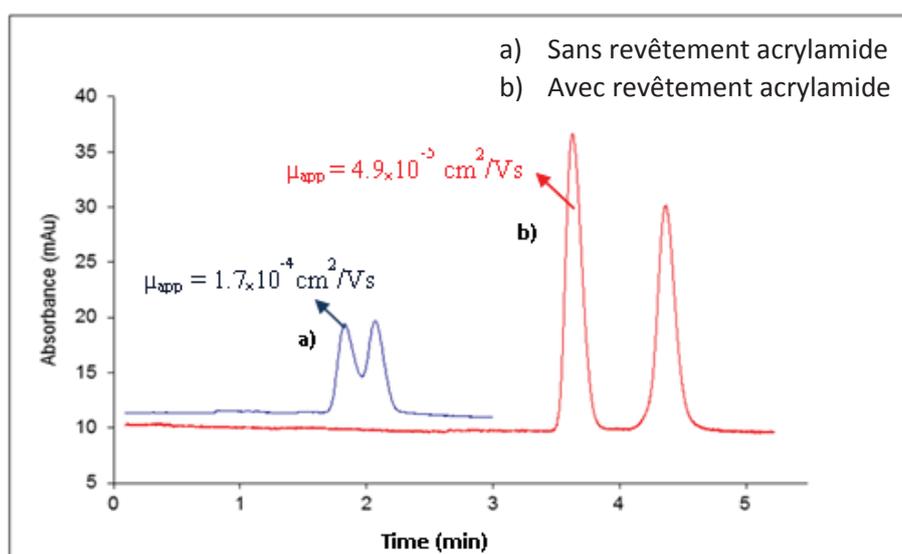


Figure 37: Séparation de la Met et Leu-enképhaline par électrophorèse capillaire après préconcentration sur monolithe C12 a) sans revêtement acrylamide et b) avec revêtement acrylamide. Longueur totale de capillaire = 33 cm, longueur injection-détection = 8,5 cm, di = 75 μm. Tampon phosphate 10 mM pH 3,6. Tension = a) 10kV b) 20kV. Solution de Met et Leu-enk à 10 μg/mL. Volume percolé de a) 200 nL b) 1μL. Elution avec 50 nL de MeOH/tampon phosphate pH 2,2 (75/25).

- **Evaluation de la limite de détection atteignable avec ce système**

Au cours de la percolation des peptides dans le capillaire, ces derniers sont retenus sur le monolithe photopolymérisé C12 selon un mécanisme de partage en phase inverse. Cependant, la rétention des peptides sur support C12 n'étant pas infinie, il est intéressant d'évaluer le volume maximal théorique de percolation pour éviter toute perte de peptide liée à son déplacement sur le monolithe au cours de la percolation. Une estimation de ce volume est obtenue à partir des équations des modèles de rétention des peptides sur monolithe C12 (L= 10 cm) qui permettent de calculer la vitesse du peptide sur le monolithe selon l'équation : **Vitesse du peptide (cm/min) = $\frac{\text{Vitesse de la phase mobile (cm/min)}}{k+1}$** .

La valeur de k est obtenue en extrapolant la rétention dans 100% d'eau (milieu de percolation des peptides lors de la préconcentration en ligne).

Pour la Met-enk : $\ln k = -0,142 \% \text{ MeOH} + 5,121$

Pour la Leu-enk : $\ln k = -0,142 \% \text{ MeOH} + 5,728$

Le volume maximal théorique de percolation a été estimé à une vingtaine de microlitres (valeur calculée pour la Leu-enk). Un premier essai a été réalisé en percolant 10 μL d'une solution de Met et Leu-enk à 40 ng/mL. L'électrophorégramme obtenu est présenté **Figure 38**.

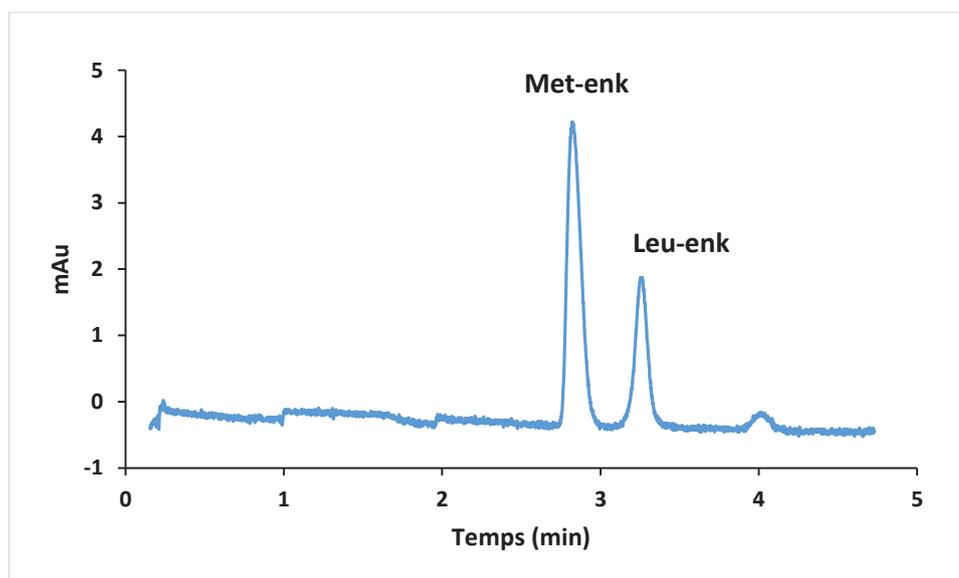


Figure 38: Electrophorégramme obtenu en percolant 10 μL d'une solution de Met et Leu-enk à 40 ng/mL. Détection à 214 nm.

Pour évaluer la limite de détection atteignable avec ce système, un deuxième essai a été réalisé en percolant une solution de Leu-enk quatre fois plus diluée (10 ng/mL). Un rapport signal/bruit de 6 a

été obtenu dans ces conditions (**Figure 39**). Ces résultats mettent en évidence la limitation de notre système pour détecter des faibles concentrations. Il n'est pas envisageable, même en percolant un volume trois fois plus important, d'atteindre les limites de détection souhaitées (< ng/mL).

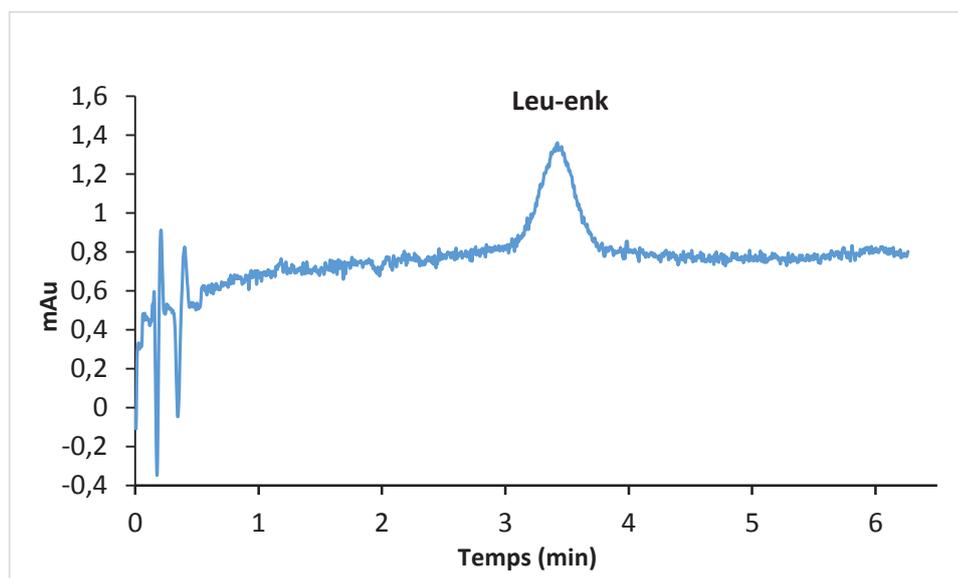


Figure 39: Electrophorogramme obtenu en percolant 7,5 µL d'une solution de Leu-enk à 10 ng/mL. Détection à 214 nm.

- **Conclusions et perspectives**

Ces premiers travaux ont permis de démontrer la faisabilité des couplages en ligne réalisés au sein de colonnes multimodales. Cependant, dans le système présenté précédemment, la détection UV ne permet pas d'atteindre notre objectif de détecter les enképhalines à des teneurs inférieures au ng/mL. Pour atteindre les limites de détection souhaitées, la détection UV a été remplacée par une détection en fluorescence induite par laser (LIF), beaucoup plus sensible. La détection des peptides par fluorescence implique néanmoins une étape de dérivation qui devra être intégrée au système d'analyse.

II.2.2.2 Elaboration d'un protocole d'analyse en ligne pour la préconcentration/dérivation/séparation de la Met et Leu-enképhaline

La colonne multimodale utilisée pour la préconcentration/dérivation/séparation en ligne de la Met et Leu-enk est la même que celle présentée précédemment. Elle se compose d'une première zone de 2 cm remplie de monolithe et photopolymérisée C12 et d'une zone vide photopolymérisée avec de l'acrylamide pour la séparation électrocinétique des deux composés. Pour la dérivation de la Met et Leu-enk, le système NDA/CN⁻ a été choisi pour son efficacité et la stabilité des composés formés. La réaction de dérivation est présentée **Figure 40**.

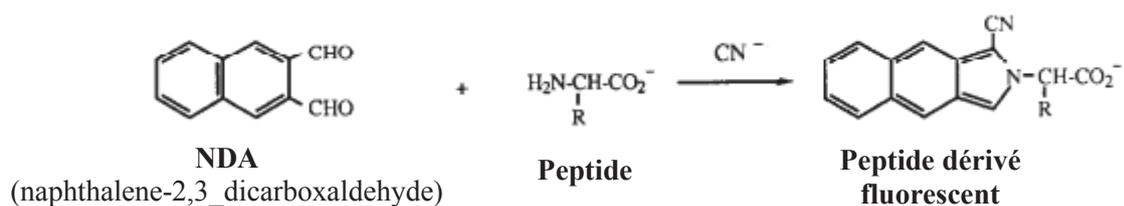


Figure 40: Réaction de dérivation des peptides avec le système NDA/CN⁻.

Le protocole de dérivation en ligne proposé est présenté **Figure 41**. La première étape consiste à percoler la NDA sur le monolithe. Celle-ci sera fixée selon un mécanisme de rétention en phase inverse. La NDA étant plus hydrophobe que les peptides, il s'avère plus judicieux de percoler la NDA avant les peptides pour éviter que ces derniers ne soient élués au moment de la percolation de la NDA. Afin d'éliminer l'excès de NDA qui n'aurait pas été fixé au support, un rinçage de la colonne avec de l'eau est ensuite réalisé. La deuxième étape du protocole consiste à percoler les peptides dans une solution aqueuse à pH 7 (pH de dérivation) contenant des ions CN⁻ nécessaires à la dérivation. Les peptides devraient ainsi réagir avec la NDA fixée sur le support. Une étape de rinçage est ensuite envisagée avec une solution pH 7, contenant uniquement des ions CN⁻ (sans peptide). Le capillaire est ensuite rempli avec l'électrolyte de séparation. La composition de cet électrolyte devra être judicieusement choisie pour éviter l'éluion des peptides dérivés pendant cette phase de conditionnement avec l'électrolyte de séparation. Enfin, les peptides dérivés seront élués en percolant un créneau de méthanol (du volume du monolithe) puis la séparation des peptides sera réalisée électrocinétiquement.

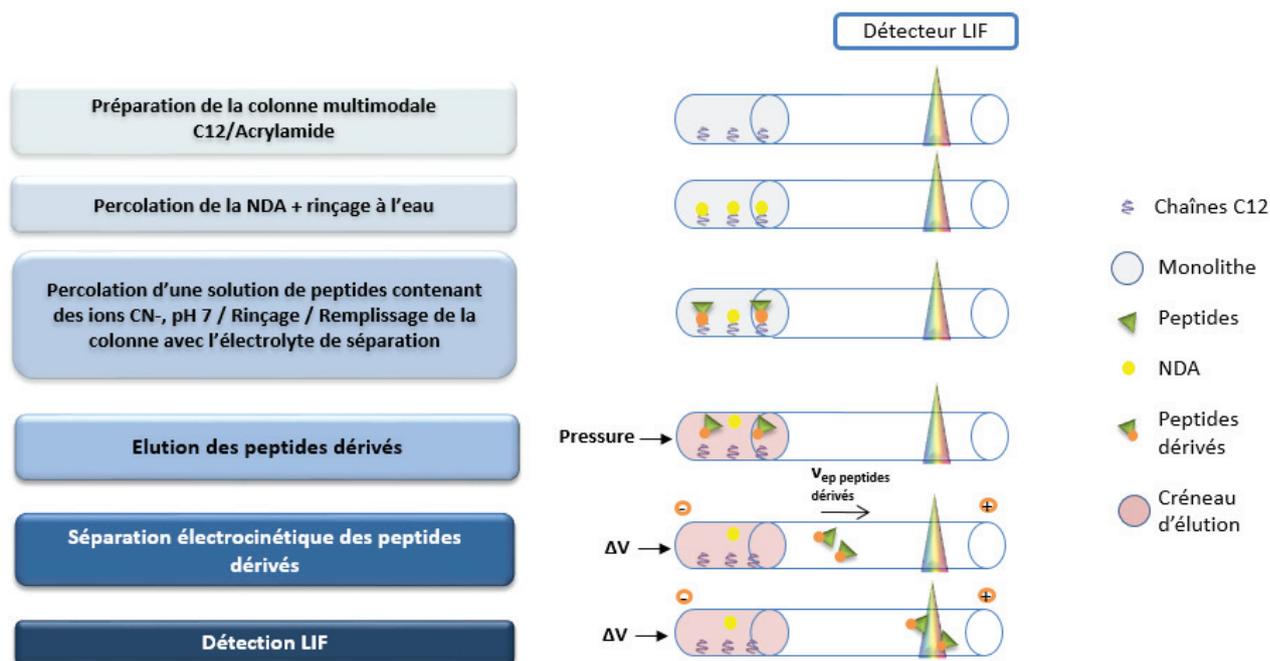


Figure 41: Protocole proposé pour la préconcentration/dérivation/séparation en ligne de la Met et Leu-Enk.

Avant d'optimiser les conditions de dérivation sur support il est nécessaire de vérifier que les peptides dérivés se séparent dans un capillaire vide photopolymérisé acrylamide (conditions de photopolymérisation présentées dans la publication « Photopolymerization of acrylamide as a new functionalization way of silica monoliths for hydrophilic interaction chromatography and coated silica capillaries for capillary electrophoresis »). Après dérivation, ils ne présentent plus de fonction amine primaire ionisée positivement et ne pourront migrer que sous tension négative compte tenu de leur charge partielle négative, liée à l'ionisation partielle de leur fonction acide carboxylique.

II.2.2.2.1. Séparation de la Met et Leu-enképhaline dérivées à la NDA en tube vide acrylamide

- **Choix de l'électrolyte de séparation**

Afin d'optimiser les conditions de séparation des peptides dérivés dans un capillaire acrylamide, une solution de peptides dérivés à 5 nM (dérivation en solution selon le protocole présenté dans l'**Annexe 1**) est injectée en CZE dans des électrolytes de séparation de pH différents. Pour éviter l'adsorption des peptides dérivés sur le revêtement acrylamide, 10% d'ACN sont ajoutés dans chaque électrolyte. Les électrophorégrammes présentés **Figure 42** mettent en évidence une séparation optimale des peptides dérivés à pH 3,6.

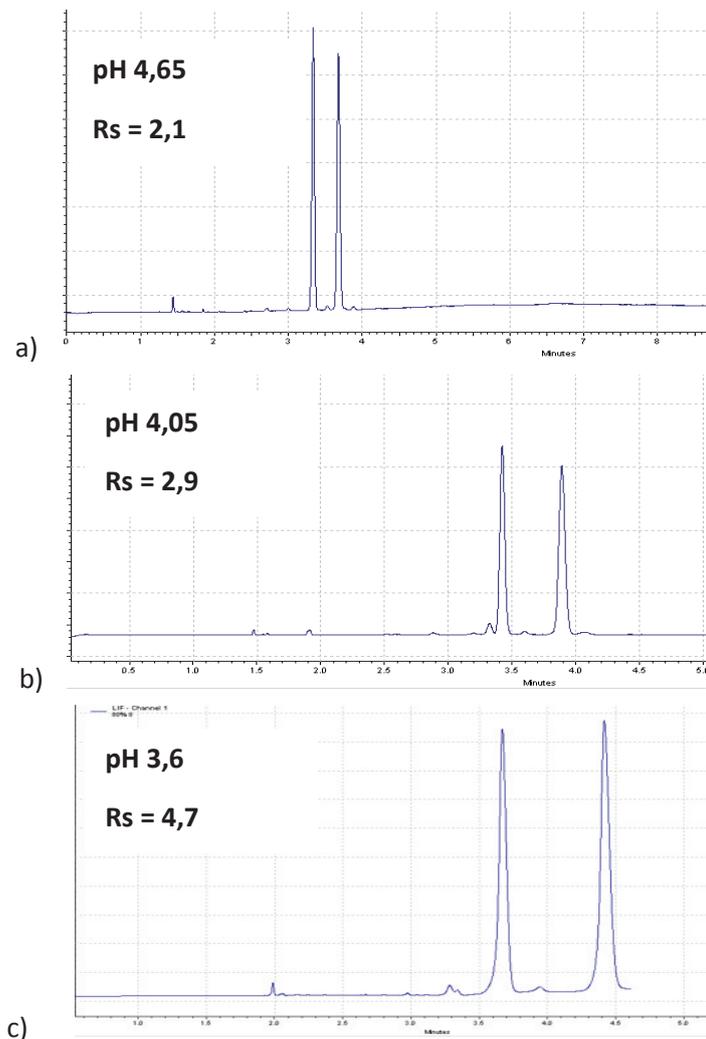


Figure 42: Séparation des peptides dérivés en capillaire vide photopolymérisé acrylamide. Tampon 90/10 Phosphate 10 mM/ACN a) pH 4,65 b) pH 4,05 et c) pH 3,6. Injection 20 nL, Tension -30 kV, $l=10$ cm, $L=30$ cm, Détection LIF ($\lambda_{ex} = 410$ nm).

- **Créneau d'élution**

Afin de simuler les conditions d'élution dans le cas du couplage en ligne C12/Acrylamide, des créneaux d'injection de 1,5 cm (proche de la taille du monolithe) de différentes compositions sont injectés dans le capillaire vide photogreffé acrylamide. Un pourcentage élevé en solvant organique permettra d'éluer les peptides dérivés (retenus selon un mécanisme de phase inverse) mais l'injection d'un long créneau de faible conductivité est susceptible d'entraîner des ruptures de courant dans le système, voire un échauffement local lié au champ électrique élevé dans les zones de faible conductivité. Le pH du créneau d'élution est fixé à 7 avec un tampon phosphate afin de maximiser l'ionisation de la fonction acide carboxylique des peptides dérivés pendant cette étape. En effet, lors de la mise sous tension pour l'étape de séparation, une ionisation maximale permettra l'électromigration rapide des peptides dérivés hors du créneau d'élution. Ainsi, pour chaque composition d'élution, l'analyse CZE est répétée 5 fois pour vérifier la stabilité du courant au fil des analyses. L'injection d'un créneau de 1,5

cm composé de 90/10 ACN/Phosphate 10 mM pH 7 entraîne une difficulté à stabiliser le courant au cours de l'analyse et, à l'issue de quelques injections, l'efficacité des pics semble complètement détériorée (**Figure 43**). Cela pourrait éventuellement s'expliquer par un échauffement dans le capillaire, lié à la résistance électrique élevée du créneau, qui détériorerait le revêtement acrylamide et l'efficacité des pics. Ce phénomène semble irréversible.

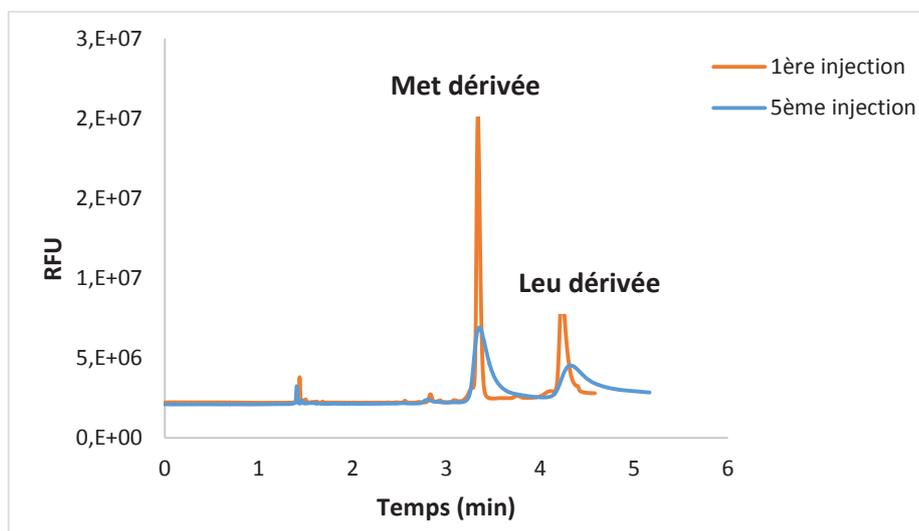


Figure 43: Injection d'un créneau de 1,5 cm d'une solution de Met et Leu dérivés dans 90/10 ACN/Phosphate 10 mM pH 7. Electrolyte : 90/10 Phosphate 10 mM pH 3,6/ACN, Tension -30 kV, l=10 cm, L=30 cm, Détection LIF ($\lambda_{ex} = 410 \text{ nm}$).

Dans le cas de créneaux d'élution 85/15 ACN/pH 7 10 mM et 80/20 ACN/pH 7 10 mM, la stabilité du courant est améliorée et ce sur plusieurs injections successives. La qualité des pics reste constante au fur et à mesure des injections. Pour la suite des essais, un créneau d'élution composé de 85/15 ACN/Phosphate 10 mM pH 7 sera choisi.

- **Récapitulatif des conditions optimales de séparation des peptides dérivés en capillaire acrylamide**

Les conditions de séparation des peptides dérivés en capillaire photopolymérisé acrylamide précédemment optimisées sont résumées **Tableau 9**.

Tableau 9: Récapitulatif des conditions optimales de séparation des peptides dérivés dans un capillaire photopolymérisé acrylamide (L=30 cm, l=10 cm).

Electrolyte de séparation	90/10 Phosphate 10 mM pH 3,6 / ACN
Tension	- 30 kV
Composition du créneau d'élution	85/15 ACN/ Phosphate 10 mM pH 7

Afin de s'affranchir d'éventuels problèmes liés à l'analyse en ligne, la dérivation sur support a d'abord été optimisée (concentration des réactifs, ordre d'injection, temps de contact etc...) de façon off-line.

II.2.2.2.2 Mise au point de la dérivation en off-line

Le principe de l'étude de la dérivation off-line est présenté **Figure 44**. Ce procédé implique la réalisation de deux étapes successives. Dans une première étape, la dérivation du peptide est optimisée sur une colonne monolithique photopolymérisée C12 de 10 cm. Le peptide dérivé sur le monolithe est ensuite élué en continu et récupéré dans un volume connu de solvant, puis analysé par CZE dans un tube vide de silice vierge, avec détection par fluorescence. Pour des raisons de simplification, seule la dérivation avec la Met-enk a été étudiée.

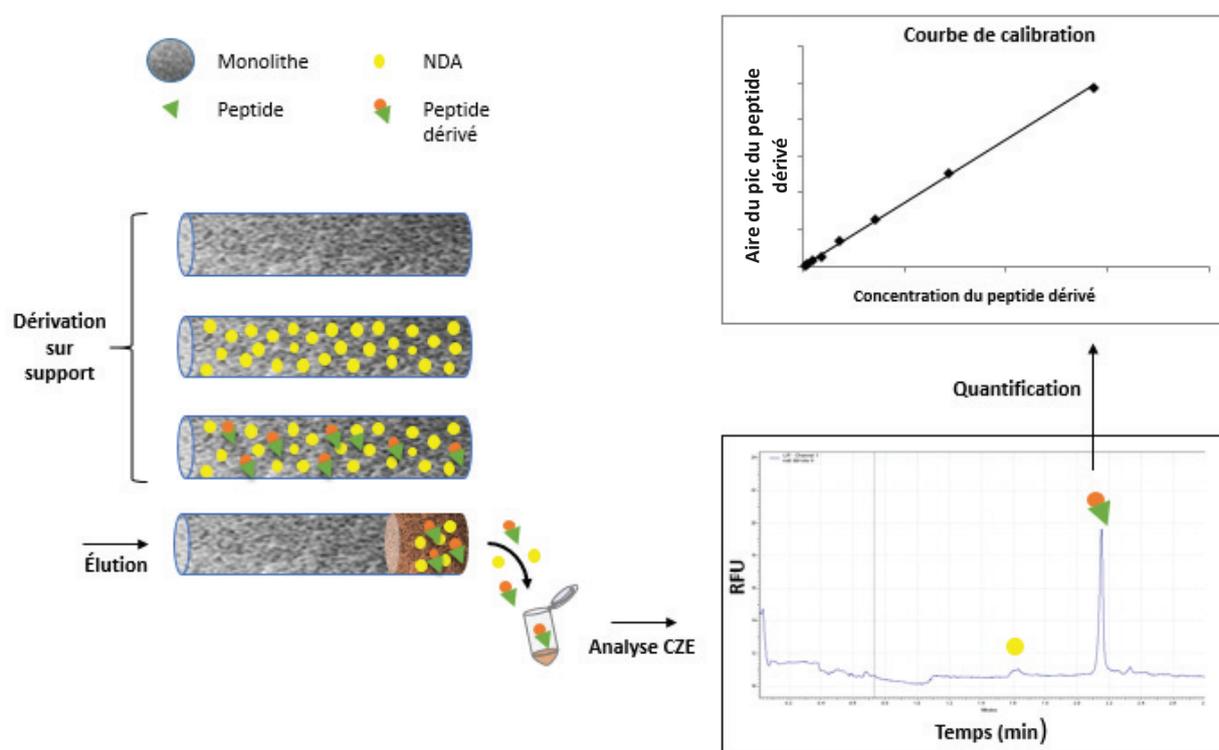


Figure 44: Principe de la dérivation off-line.

Pour permettre une interprétation correcte des résultats, plusieurs paramètres de l'analyse CZE ont d'abord été vérifiés : linéarité et répétabilité de l'analyse CZE-LIF des peptides dérivés en solution, détermination du volume maximal injectable en injection en hydrodynamique, choix de l'électrolyte. Les résultats sont présentés dans l'**Annexe 2** et les conditions optimales choisies sont reportées **Tableau 10**. Ces conditions seront fixées pour toute la partie « Optimisation de la dérivation sur support ».

Tableau 10: Conditions optimales pour l'analyse CZE des peptides récupérés après dérivation sur support. L = 30 cm, l = 20 cm.

<i>Electrolyte de séparation</i>	Phosphate sodium 22,5 mM pH 7 avec 10% d'ACN
<i>Tension</i>	-15 kV
<i>Injection</i>	0,1 psi 15 secondes

a) Optimisation de la dérivation sur support

- **Protocole de dérivation sur support**

La dérivation sur support est réalisée dans un capillaire de 10 cm entièrement rempli de monolithe photopolymérisé C12. La première étape du protocole consiste à percoler une solution de NDA à 2,9 mM. Cette étape est suivie d'un rinçage à l'eau de la colonne pour éliminer la NDA non fixée sur le support. Le peptide est à son tour percolé dans une solution à pH 7 contenant les ions CN⁻ à 21,5 mM. Une étape de rinçage est ensuite réalisée avec une solution pH 7 contenant uniquement des ions CN⁻ (sans peptide) pour éliminer la fraction éventuelle de peptides qui n'aurait pas réagi. Enfin les peptides dérivés, sont élués en percolant environ 2µL de méthanol (quatre fois le volume du capillaire) et l'éluât est récupéré dans 150 µL d'une solution eau/MeOH (50/50, v/v) pour assurer la solubilité des dérivés.

- **Optimisation des conditions de percolation de la NDA**

Un des paramètres clés dans l'optimisation de la dérivation sur support concerne la quantité de NDA fixée au préalable sur le monolithe. En effet, il est important de vérifier que cette quantité ne représente pas un facteur limitant pour la dérivation des peptides. Cette quantité de NDA fixée sur le support peut être calculée à partir des traces UV obtenues pendant la percolation de la NDA en continu (**Figure 45**) selon le calcul suivant :

$$\text{Quantité de NDA (nmol)} = \text{Débit } \varphi \text{ mobile} \times (T_{\text{plateau}} - T_m) \times C_{\text{NDA}} \times 1000$$

Avec :

$$\text{Débit } \varphi \text{ mobile } (\mu\text{L}/\text{min}) = \frac{D_c (\text{mm}) \times D_c (\text{mm}) \times \Pi \times L_d (\text{mm})}{4 \times T_m (\text{min})}$$

D_c (mm): diamètre du capillaire = 0,075 mm

L_d (mm): distance injection-détection = 260 mm

T_m (min) : Temps mort de la colonne de l'injection à la détection (dépendant des conditions de percolation)

- T_{plateau} (min) = temps d'arrivée de la NDA jusqu'au détecteur (pris à 50% de la hauteur du plateau)
- C_{NDA} (mol/L) = concentration de la NDA percolée = 2,9.10⁻³ mol/L

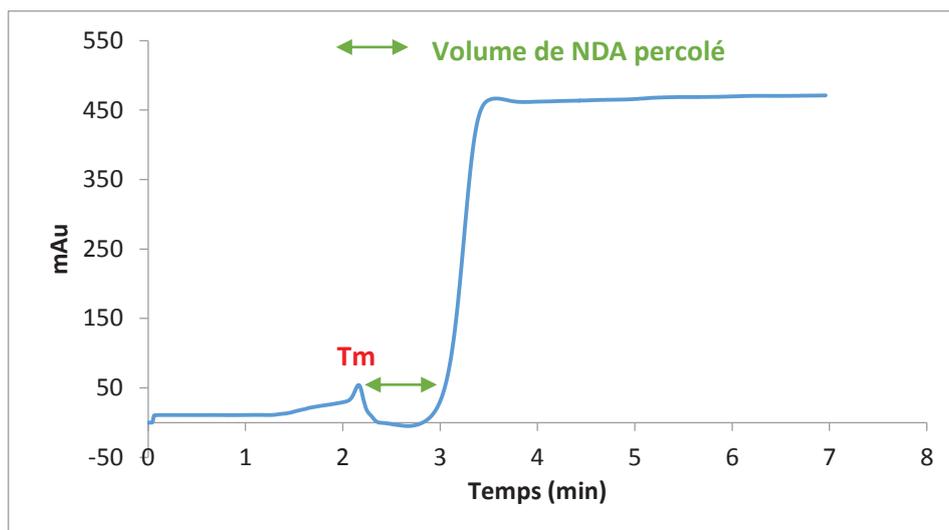


Figure 45: Signal UV à 254 nm pendant la percolation de la NDA.

L'arrivée de la NDA jusqu'au détecteur, visualisée par une augmentation de l'absorbance, met en évidence qu'un équilibre de rétention est atteint.

Cette quantité de NDA peut être modifiée en fonction du milieu de percolation. En effet, si la NDA est percolée dans une solution riche en solvant organique, l'équilibre de rétention entre la NDA et le monolithe sera plus vite atteint et la quantité de NDA fixée à l'équilibre sur le monolithe sera moindre. Ainsi, la NDA a été percolée sur le monolithe C12 dans des solutions eau/ACN dans différentes proportions avec une concentration fixée à 2,9 mM. Un maximum de 70% d'eau est fixé car la NDA n'est plus soluble pour des teneurs en eau > 70%. La quantité de NDA fixée sur le monolithe en fonction des conditions de percolation est donnée **Tableau 11**.

Tableau 11: Quantité de NDA fixée en fonction des conditions de percolation, [NDA] = 2,9 mM.

<i>Conditions de percolation de la NDA (% ACN / % Eau)</i>	50/50	40/60	30/70
<i>Quantité de NDA fixée (nmol)</i>	1,75	3,19	6,66

Notre objectif étant d'analyser des concentrations inférieures au ng/mL (avec des volumes percolés de quelques μL), la quantité de NDA sera toujours en excès par rapport à la quantité de peptide percolée et ce pour les trois conditions de percolation proposées. Pour exemple, si l'on percole 10 μL d'une solution de peptide à 0,1 ng/mL cela représente une quantité de peptide d'environ 0,2 pmol. La

quantité de NDA n'est donc pas un facteur limitant pour la dérivation. Pour la suite des essais, la percolation de la NDA sera réalisée dans 50/50 ACN/eau.

- **Stabilité de la Met dérivée**

Les dérivés fluorescents présentent souvent une stabilité limitée dans le temps [47]. Le couplage off-line n'étant pas automatisé, il est nécessaire de déterminer le temps maximal « autorisé » entre l'élution du peptide dérivé et l'analyse CZE pour éviter une dégradation de l'échantillon.

Cette étude de stabilité de la Met dérivée a été conduite dans la solution à l'issue de l'élution c'est-à-dire dans un mélange eau/MeOH (50/50, v/v). Une solution de Met dérivée a été analysée en CZE après différents laps de temps après l'étape d'élution. La **Figure 46** met en évidence la formation d'un pic de dégradation de la Met dérivée au-delà de 2h entre la percolation et l'analyse CZE.

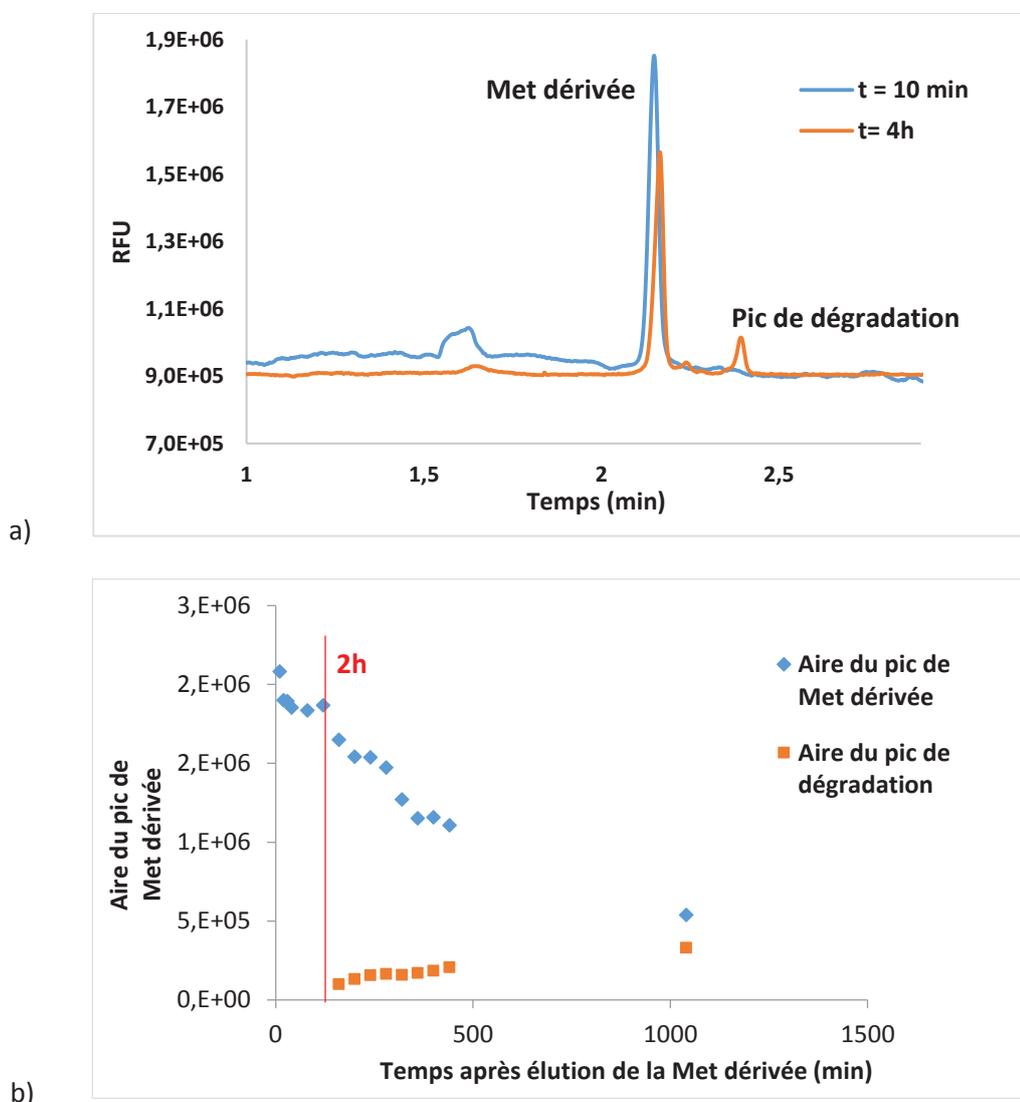


Figure 46: a) Analyse CZE à différents temps d'une solution de Met dérivée récupérée après percolation de 8 μ L de Met à 0,25 mg/mL sur monolithe C12. b) Evolution du signal de fluorescence de Met dérivée en fonction du temps après élution. Percolation de la NDA à 2,9 mM dans 50/50 ACN/eau.

- **Détermination expérimentale du volume maximal de percolation de la Met**

Pour éviter toute perte de peptide liée à son déplacement sur le monolithe au cours de la percolation, il est nécessaire de déterminer le volume maximal de percolation. Ainsi, des volumes croissants de Met à 2,5 µg/mL sont percolés après percolation de la NDA. Les résultats des analyses CZE présentés **Figure 47** mettent en évidence l'arrivée d'un plateau pour des volumes de percolation > 20 µL. Il sera donc judicieux pour la suite de percoler des volumes < 20 µL.

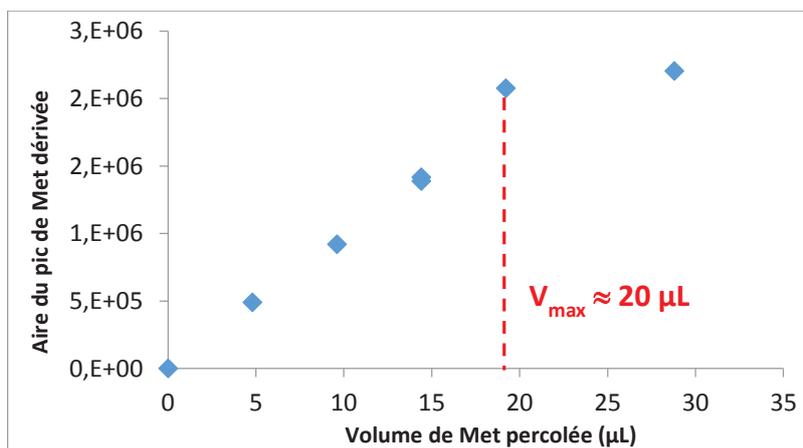


Figure 47: Aire du pic de Met dérivée obtenue en CZE après percolation et dérivation sur monolithe C12 de volumes croissants de Met à 2,5 µg/mL. Percolation de la NDA à 2,9 mM dans 50/50 ACN/eau. RSD <10 % (n=3).

- **Linéarité de la dérivation sur support**

Après optimisation des conditions de percolation de la NDA (percolation dans 70/30 ACN/eau) et de la Met-enk (volume maximal de 20 µL), la linéarité de la dérivation sur support a été étudiée en percolant des concentrations croissantes de Met avec un volume fixe de 15 µL. Les aires des pics de Met dérivée obtenues en CZE sont présentées **Figure 48**.

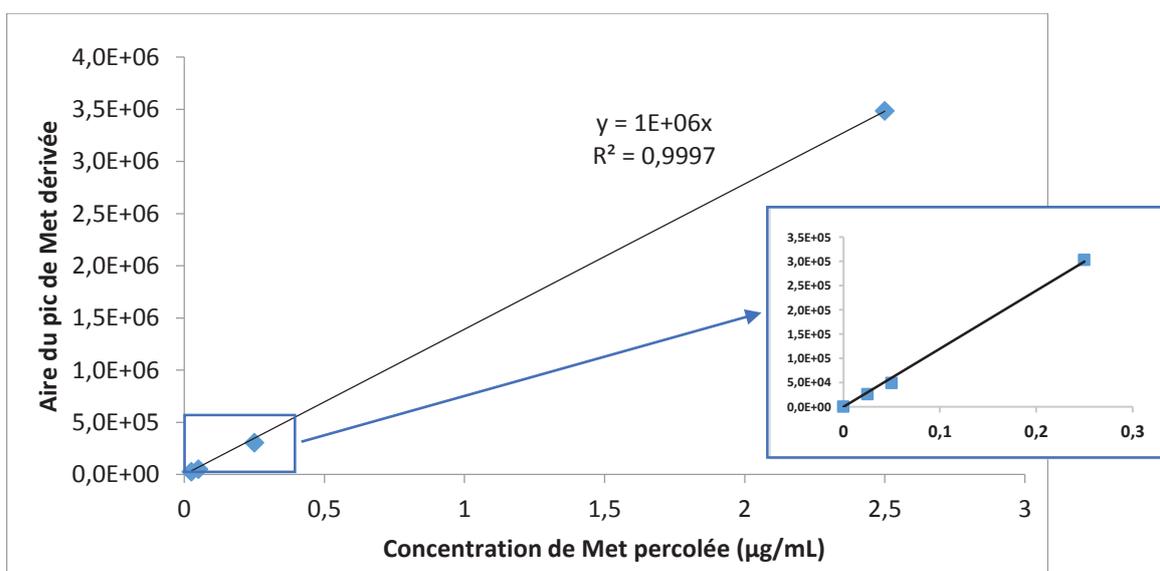


Figure 48: Aire du pic de Met dérivée analysée en CZE en fonction de la concentration de Met percolée. Percolation de la NDA à 2,9 mM dans 50/50 ACN/eau, volume fixe de Met percolé = 15 µL.

On constate que la dérivation est linéaire pour des concentrations en Met percolées variant de 0,025 à 2,5 µg/mL.

- **Influence du temps de dérivation**

Il est possible, au cours du protocole, de rajouter un « temps de dérivation » après l'étape de percolation de la Met afin de laisser réagir la NDA avec la Met plus longtemps dans le cas d'une réaction non immédiate. Cela consiste à mettre en pause l'analyse pendant un laps de temps donné. Afin de vérifier si ce temps supplémentaire s'avère nécessaire, deux dérivations similaires sont réalisées sur le monolithe C12, la première avec un temps de dérivation de 20 min et la seconde sans temps de dérivation. Les résultats présentés dans le **Tableau 12** ne montrent pas de différence significative entre l'analyse avec temps de dérivation et l'analyse sans (compte tenu des écart-type obtenus avec 3 répétitions). La réaction de dérivation semble donc être immédiate.

Tableau 12: Influence du temps de dérivation sur la dérivation sur support. Percolation de la NDA à 2,9 mM dans 50/50 ACN/eau, volume fixe de Met percolé = 15 µL.

<i>Temps de dérivation après la percolation de la Met (min)</i>	0	20
<i>Aire du pic de Met dérivée en CZE</i>	$(85 \pm 4) \cdot 10^4$	$(82 \pm 4) \cdot 10^4$

- **Récapitulatif des conditions optimales de dérivation sur support**

L'ensemble des conditions précédemment optimisées pour la dérivation sur support est résumé **Tableau 13**.

Tableau 13: Récapitulatif des conditions optimales de dérivation sur support.

<i>Temps maximal autorisé entre l'étape d'élution et l'analyse CZE</i>	2h
<i>Volume maximal de percolation des peptides</i>	20 µL/ 500 nL de monolithe

Après avoir optimisé la dérivation en « off-line », le protocole a été transposé pour l'analyse en ligne

b) Essais de préconcentration/dérivation/séparation en ligne

Les essais de préconcentration/dérivation/séparation en ligne ont soulevé plusieurs difficultés. Premièrement, nous avons pu constater que certaines colonnes se bouchaient au fur et à mesure des analyses. Après plusieurs essais nous avons constaté que la structure du monolithe était l'un des phénomènes à l'origine du problème. En effet une très faible variation de la morphologie du monolithe et notamment une faible diminution de la taille des macropores, semble favoriser le bouchage progressif des monolithes. Pour remédier à ce problème, des contrôles systématiques de la structure du monolithe et de la perméabilité de la colonne ont été mis en place avant chaque analyse. Les colonnes ne présentant pas les structures et/ou perméabilités adéquates sont systématiquement écartées pour cette application. Dans un deuxième temps, nous avons pu constater que la réduction progressive de la perméabilité des colonnes au cours de leur utilisation s'accompagnait de la présence, à l'intérieur du capillaire, de cristaux orange visibles au microscope optique. Pour déterminer l'origine de ces cristaux, plusieurs conditions de dérivation ont été testées hors capillaire (en solution). Ainsi, nous avons pu mettre en évidence que certains réactifs (tels que la NDA et le CN⁻) produisaient, contre toute attente, des produits de dérivation fluorescents, à l'origine de la précipitation des cristaux orange dans la colonne. Un changement de nucléophile a été envisagé mais des résultats similaires ont été obtenus, démontrant que ce phénomène n'était pas lié à la nature du nucléophile. Néanmoins, ce problème a été résolu en intercalant et adaptant des étapes de rinçage entre chaque étape du protocole de dérivation.

Dans un deuxième temps, la dérivation/ séparation en ligne réalisée sur des colonnes différentes a conduit à des électrophorogrammes présentant des profils de fluorescence très différents (nombre de signaux, intensités relatives, position en temps). De nombreux pics sont parfois détectés sur l'électrophorogramme et il s'avère difficile d'identifier chacun d'entre eux, avec une simple détection LIF. Des blancs réalisés (sans percolation de peptides) ont effectivement mis en évidence la présence de plusieurs pics sur l'électrophorogramme. Il est possible que certains pics correspondent aux réactifs de dérivation ou à des produits de dérivation secondaires. L'expérience nous a montré qu'un signal de fluorescence pouvait être obtenu à partir de composés non fluorescents ou bien même lors de changements de phase mobile ce qui complique considérablement l'identification des composés d'intérêt. Ces variations de profils électrophorétiques pourraient provenir d'une faible variation du flux électroosmotique d'une colonne à une autre voire d'une analyse à une autre. En effet, les peptides dérivés ont des mobilités électrophorétiques très proches (en valeur absolue) de celle du flux électroosmotique résiduel (mobilité électrophorétique de la Met dérivée d'environ 5.10^{-5} cm²/V/s et flux électroosmotique résiduel proche de 7.10^{-6} cm²/V/s dans le cas idéal). Ainsi, une légère variation du flux électroosmotique résiduel, dont le sens de migration est opposé à celui des peptides dérivés,

peut considérablement ralentir la migration des composés dans la colonne. Ces difficultés n'avaient pas été rencontrées dans le cas de la préconcentration/séparation en ligne des peptides non dérivés. Deux explications peuvent être envisagées. Premièrement, dans le cas de la préconcentration/séparation en ligne des peptides non dérivés, ces derniers migraient dans le sens du flux électroosmotique. Dans l'analyse en ligne des peptides dérivés ces derniers migrent dans le sens inverse du flux électroosmotique. De plus les peptides dérivés présentent des mobilités électrophorétiques plus faibles que les peptides non dérivés ce qui accentue l'influence de l'impact du flux électroosmotique sur les temps de migration. Par conséquent si le flux électroosmotique est du même ordre de grandeur que la mobilité électrophorétique des peptides dérivés, ils ne pourront être détectés (**Figure 49**).

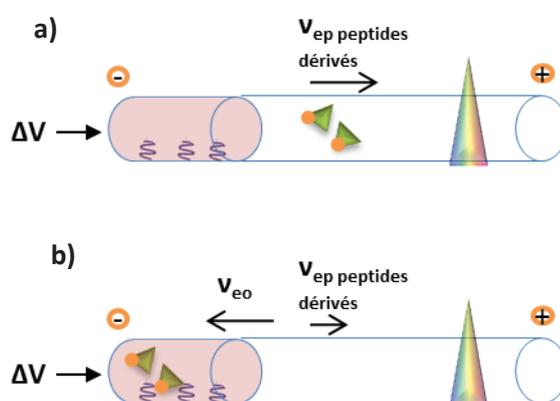


Figure 49: Migration des peptides dérivés dans la colonne selon la valeur du flux électroosmotique a) Flux électroosmotique quasi nul ou très inférieur à $5.10^{-5} \text{ cm}^2/\text{V/s}$ b) Flux électroosmotique $> 5.10^{-5} \text{ cm}^2/\text{V/s}$.

Plusieurs essais ont été réalisés afin de mesurer la valeur du flux électroosmotique en utilisant différents marqueurs de flux tels que la butylamine dérivée à la NDA ou encore un créneau de méthanol. Cependant, il s'avère difficile d'identifier clairement le marqueur en fluorescence (manque de spécificité de la détection).

Parallèlement, il a également été constaté qu'une quantité importante de réactifs de dérivation (utilisés en large excès) étaient élués avec les peptides et pouvaient altérer le revêtement acrylamide. Des essais complémentaires ont été réalisés en fixant une quantité moins importante de NDA sur le monolithe, mais plusieurs pics étaient toujours détectés sur l'électrophorégramme. D'autres essais ont également été réalisés dans un capillaire C12 sans revêtement acrylamide, en rajoutant des ions Ca^{2+} dans l'électrolyte de migration pour diminuer le flux électroosmotique. Néanmoins, la répétabilité des résultats obtenus n'a pas été améliorée de façon significative. Pour la suite des essais, il s'avère essentiel de mieux maîtriser le flux électroosmotique dans le capillaire. Seule une détection en

spectrométrie de masse permettra d'identifier clairement la nature des pics observés et de mieux comprendre le sens de migration des composés dans le capillaire.

Références bibliographiques

- [1]. R. El-Debs (2013). Synthèse de colonnes capillaires de monolithes de silice et développement d'un procédé photochimique simple, localisable et polyvalent de fonctionnalisation de leur chimie de surface (*Thesis, Université Claude Bernard Lyon1, Paris*)
- [2]. C.T. Lefebvre, A; Salzet, M, *Peptides opioïdes, substances opiacées et réponse immunitaire*, in *Médecine/Sciences*2000. p. 235-242.
- [3]. G. Gacel, M.-C. Fournié-Zaluski, E. Fellion, B.P. Roques, B. Senault, J.-M. Lecomte, B. Malfroy, J.-P. Swerts, J.-C. Schwartz, conformation and biological activities of hexapeptides related to enkephalins: Respective roles fo the ammonium and hydroxyl groups of tyrosine, *Life Sci.* 24 (1979) 725-731.
- [4]. M. Diez, S. Danner, P. Frey, B. Sommer, M. Staufenbiel, K.-H. Wiederhold, T. Hökfelt, Neuropeptide alterations in the hippocampal formation and cortex of transgenic mice overexpressing β -amyloid precursor protein (APP) with the Swedish double mutation (APP23), *Neurobiology of Disease* 14 (2003) 579-594.
- [5]. D.T. Yew, W.P. Li, S.E. Webb, H.W.L. Lai, L. Zhang, Neurotransmitters, peptides, and neural cell adhesion molecules in the cortices of normal elderly humans and alzheimer patients: a comparison, *Experimental Gerontology* 34 (1999) 117-133.
- [6]. A.C. Moser, D.S. Hage, Capillary electrophoresis-based immunoassays: Principles and quantitative applications, *Electrophoresis* 29 (2008) 3279-3295.
- [7]. N.A. Guzman, T. Blanc, T.M. Phillips, Immunoaffinity capillary electrophoresis as a powerful strategy for the quantification of low-abundance biomarkers, drugs, and metabolites in biological matrices, *Electrophoresis* 29 (2008) 3259-3278.
- [8]. E. Sánchez-López, C. Montealegre, A.L. Crego, M.L. Marina, Recent contributions of capillary electrophoresis to neuroscience, *TrAC, Trends Anal. Chem.* 67 (2015) 82-99.
- [9]. F. Kitagawa, K. Otsuka, Recent applications of on-line sample preconcentration techniques in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 1335 (2014) 43-60.
- [10]. X. Gu, Y. Wang, X. Zhang, Large-bore particle-entrapped monolithic precolumns prepared by a sol-gel method for on-line peptides trapping and preconcentration in multidimensional liquid chromatography system for proteome analysis, *J. Chromatogr. A* 1072 (2005) 223-232.
- [11]. C. Schley, R. Swart, C.G. Huber, Capillary scale monolithic trap column for desalting and preconcentration of peptides and proteins in one- and two-dimensional separations, *J. Chromatogr. A* 1136 (2006) 210-220.
- [12]. R. Ramautar, C.K. Ratnayake, G.W. Somsen, G.J. de Jong, Capillary electrophoresis-mass spectrometry using an in-line sol-gel concentrator for the determination of methionine enkephalin in cerebrospinal fluid, *Talanta* 78 (2009) 638-642.
- [13]. E. Ortiz-Villanueva, F. Benavente, E. Giménez, F. Yilmaz, V. Sanz-Nebot, Preparation and evaluation of open tubular C18-silica monolithic microcartridges for preconcentration of peptides by on-line solid phase extraction capillary electrophoresis, *Anal. Chim. Acta* 846 (2014) 51-59.
- [14]. T. Stroink, P. Schravendijk, G. Wiese, J. Teeuwsen, H. Lingeman, J.C.M. Waterval, A. Bult, G.J. de Jong, W.J.M. Underberg, On-line coupling of size-exclusion chromatography and capillary zone electrophoresis via a reversed-phase C18 trapping column for the determination of peptides in biological samples, *Electrophoresis* 24 (2003) 1126-1134.
- [15]. T. Stroink, G. Wiese, J. Teeuwsen, H. Lingeman, J.C.M. Waterval, A. Bult, G.J. de Jong, W.J.M. Underberg, On-line coupling of size exclusion and capillary zone electrophoresis via a reversed-phase C18 trapping column for the analysis of structurally related enkephalins in cerebrospinal fluid, *Electrophoresis* 24 (2003) 897-903.

- [16]. F.W.A. Tempels, G. Wiese, W.J.M. Underberg, G.W. Somsen, G.J. de Jong, On-line coupling of size exclusion chromatography and capillary electrophoresis via solid-phase extraction and a Tee-split interface, *J. Chromatogr. B* 839 (2006) 30-35.
- [17]. F.W.A. Tempels, W.J.M. Underberg, G.W. Somsen, G.J. de Jong, On-line coupling of SPE and CE-MS for peptide analysis, *Electrophoresis* 28 (2007) 1319-1326.
- [18]. F.W.A. Tempels, J. Teeuwsen, I.K. Kyriakou, G. Theodoridis, W.J.M. Underberg, G.W. Somsen, G.J. de Jong, Chromatographic preconcentration coupled on-line to capillary electrophoresis via a Tee-split interface, *J. Chromatogr. A* 1053 (2004) 263-268.
- [19]. F.W.A. Tempels, W.J.M. Underberg, G.W. Somsen, G.J. de Jong, Chromatographic Preconcentration Coupled To Capillary Electrophoresis via an In-Line Injection Valve, *Anal. Chem.* 76 (2004) 4432-4436.
- [20]. E. Hernández, F. Benavente, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa, Analysis of opioid peptides by on-line SPE-CE-ESI-MS, *Electrophoresis* 28 (2007) 3957-3965.
- [21]. S. Medina-Casanellas, E. Domínguez-Vega, F. Benavente, V. Sanz-Nebot, G.W. Somsen, G.J. de Jong, Low-picomolar analysis of peptides by on-line coupling of fritless solid-phase extraction to sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1328 (2014) 1-6.
- [22]. N. Siri, P. Riolet, C. Bayle, F. Couderc, Automated large-volume sample stacking procedure to detect labeled peptides at picomolar concentration using capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection, *J. Chromatogr. B* 793 (2003) 151-157.
- [23]. Y. Huang, J. Duan, X. Jiang, H. Chen, G. Chen, Separation and determination of enkephalin-related peptides using capillary electrophoresis, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 2534-2539.
- [24]. Y. Huang, J. Duan, Q. Chen, G. Chen, Micellar electrokinetic chromatography of enkephalin-related peptides with laser-induced fluorescence detection, *Electrophoresis* 25 (2004) 1051-1057.
- [25]. V. Šolínová, V. Kašička, T. Barth, L. Hauzerová, S. Fanali, Analysis and separation of enkephalin and dalargin analogues and fragments by capillary zone electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 1081 (2005) 9-18.
- [26]. P. De Montigny, J.F. Stobaugh, R.S. Givens, R.G. Carlson, K. Srinivasachar, L.A. Sternson, T. Higuchi, Naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde/cyanide ion: a rationally designed fluorogenic reagent for primary amines, *Anal. Chem.* 59 (1987) 1096-1101.
- [27]. P. De Montigny, C.M. Riley, L.A. Sternson, J.F. Stobaugh, Fluorogenic derivatization of peptides with naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde/cyanide: Optimization of yield and application in the determination of leucine-enkephalin spiked human plasma samples, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 8 (1990) 419-429.
- [28]. M. Faure, S. Korchane, I. Le Potier, A. Pallandre, C. Deslouis, A.-M. Haghiri-Gosnet, J. Gamby, Investigating of labelling and detection of transthyretin synthetic peptide derivatized with naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde, *Talanta* 116 (2013) 8-13.
- [29]. S. Korchane, A. Pallandre, C. Przybylski, C. Poüs, F. Gonnet, M. Taverna, R. Daniel, I. Le Potier, Derivatization strategies for CE-LIF analysis of biomarkers: Toward a clinical diagnostic of familial transthyretin amyloidosis, *Electrophoresis* 35 (2014) 1050-1059.
- [30]. M. Lacroix (2007). Optimisation d'une méthode de dosage de neurotransmetteurs par le couplage LC/Fluo/MS. Etudes théoriques du marquage au NDA par spectrométrie de masse haute résolution, modélisation moléculaire et étude quantitative de relations structure-temps de rétention (3D-QSRR) (*Thesis, Université de Toulouse, Paris*)
- [31]. B.L. Robert F, Denoroy L, Renaud B., Capillary zone electrophoresis with laser-induced fluorescence detection for the determination of nanomolar concentrations of noradrenaline and dopamine: application to brain microdialysate analysis., *Anal. Chem.* 67 (1995) 1838-1844.
- [32]. T. Ueda, R. Mitchell, F. Kitamura, T. Metcalf, T. Kuwana, A. Nakamoto, Separation of naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde-labeled amino acids by high-performance capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection, *J. Chromatogr. A* 593 (1992) 265-274.

- [33]. C.-K. Chen, K.-T. Liu, T.-C. Chiu, H.-T. Chang, Separation of amino acids and amines by capillary electrophoresis using poly(ethylene oxide) solution containing cetyltrimethylammonium bromide, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7576-7581.
- [34]. J.U. Georges Rammouz, Sidney J L Ribeiro, Younes Messaddeq, François Couderc, Véréna Poincot, Analysis of sphingosine 1-phosphate by capillary electrophoresis coupled to laser-induced fluorescence detection: use of a transparent fused-silica capillary, *Journal of capillary electrophoresis and microchip technology* 10 (2007) 25-31.
- [35]. M. Lacroix, J.-C. Garrigues, F. Couderc, Reaction of Naphthalene-2,3-Dicarboxaldehyde with Enkephalins for LC-Fluorescence and LC-MS Analysis: Conformational Studies by Molecular Modeling and H/D Exchange Mass Spectrometry, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 18 (2007) 1706-1713.
- [36]. T. Kaneta, T. Ogura, T. Imasaka, Analysis of proteins in biological samples by capillary sieving electrophoresis with postcolumn derivatization/laser-induced fluorescence detection, *Electrophoresis* 32 (2011) 1061-1067.
- [37]. C.-Z. Yu, Y.-Z. He, G.-N. Fu, H.-Y. Xie, W.-E. Gan, Determination of kanamycin A, amikacin and tobramycin residues in milk by capillary zone electrophoresis with post-column derivatization and laser-induced fluorescence detection, *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 333-338.
- [38]. M. Ye, S. Hu, W.W.C. Quigley, N.J. Dovichi, Post-column fluorescence derivatization of proteins and peptides in capillary electrophoresis with a sheath flow reactor and 488 nm argon ion laser excitation, *J. Chromatogr. A* 1022 (2004) 201-206.
- [39]. D.M. Pinto, E.A. Arriaga, S. Sia, Z. Li, N.J. Dovichi, Solid-phase fluorescent labeling reaction of picomole amounts of insulin in very dilute solutions and their analysis by capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 16 (1995) 534-540.
- [40]. E.A. Arriaga, Y. Zhang, N.J. Dovichi, Use of 3-(p-carboxybenzoyl)quinoline-2-carboxaldehyde to label amino acids for high-sensitivity fluorescence detection in capillary electrophoresis, *Anal. Chim. Acta* 299 (1995) 319-326.
- [41]. Q. Tao, M.-X. Gao, G.-F. Hong, Q. Chen, X.-M. Zhang, Solid-support fluorescent derivatization of picomoles of protein at low concentration with FITC, *Talanta* 84 (2011) 457-461.
- [42]. H.A. Bardelmeijer, J.C.M. Waterval, H. Lingeman, R.v.t. Hof, A. Bult, W.J.M. Underberg, Pre-, on- and post-column derivatization in capillary electrophoresis, *Electrophoresis* 18 (1997) 2214-2227.
- [43]. P.-L. Chang, T.-C. Chiu, H.-T. Chang, Stacking, derivatization, and separation by capillary electrophoresis of amino acids from cerebrospinal fluids, *Electrophoresis* 27 (2006) 1922-1931.
- [44]. J.L. Felhofer, K. Scida, M. Penick, P.A. Willis, C.D. Garcia, Simultaneous solid phase extraction and derivatization of aliphatic primary amines prior to separation and UV-absorbance detection, *Talanta* 115 (2013) 688-693.
- [45]. R. Ramautar, C.K. Ratnayake, G.W. Somsen, G.J. de Jong, Capillary electrophoresis-mass spectrometry using an in-line sol-gel concentrator for the determination of methionine enkephalin in cerebrospinal fluid, *Talanta* 78 (2009) 638-642.
- [46]. Y. Huang, J. Duan, X. Jiang, H. Chen, G. Chen, Separation and determination of enkephalin-related peptides using capillary electrophoresis, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 2534-2539.
- [47]. M. Lacroix (2007). Optimisation d'une méthode de dosage de neurotransmetteurs par le couplage LC/Fluo/MS. Etudes théoriques du marquage au NDA par spectrométrie de masse haute résolution, modélisation moléculaire et étude quantitative de relations structure-temps de rétention (3D-QSRR) (Thesis, Université de Toulouse, Paris)

CHAPITRE 2

**Préparation de colonnes multimodales par
photogreffage localisé (photoclick chemistry) de
monolithes de silice**

-

**Application à la préconcentration/séparation en ligne
de l'Ochratoxine A**

Introduction

Les résultats obtenus par photopolymérisation radicalaire libre ont montré que ce procédé était rapide (fonctionnalisation en quelques minutes), efficace et polyvalent (transposable à de multiples monomères). Cependant, nous avons pu constater que certaines colonnes capillaires se bouchaient au cours de la photopolymérisation mettant en évidence une limitation importante avec ce type de fonctionnalisation. En effet, la taille des couches polymériques, difficile à contrôler, et la formation possible de polymères en solution peuvent conduire à une obstruction partielle voire totale des méso/macropores du monolithe. Ainsi, afin d'éviter ces phénomènes de bouchage et de mieux contrôler la fonctionnalisation de surface, une autre approche de photofonctionnalisation, basée sur la photo-click chemistry, a été envisagée et fera l'objet de ce deuxième chapitre.

Afin d'évaluer le potentiel de ces réactions dites de chimie « click » pour la fonctionnalisation de la silice, un état de l'art de leur utilisation en sciences séparatives a été réalisé sous forme d'un article de revue intitulée « Is click chemistry attractive for separation science ? », présenté en première partie de ce chapitre. Plusieurs avantages de ce type de réaction ont été mis en évidence tels que des rendements théoriques de greffage proches de 100%, la spécificité des réactions ou encore la possibilité (pour certaines) d'être initiées photochimiquement, pour un greffage rapide et localisé. Plus spécifiquement, l'approche par « Thiol-ene click chemistry » a retenu notre attention. Le proton de la fonction thiol est connu pour être facilement abstractible et le radical thiyl qui en résulte réagit rapidement sur des composés insaturés (alcènes, alcynes, acrylates...).

Les deux approches de photochimie click, version « thiol-ene » (avec greffage de l'octadécène sur un support thiolé) et version « ene-thiol » (avec greffage de l'octadécane-thiol sur un support porteur d'une insaturation) ont été évaluées expérimentalement. Les résultats sont présentés dans une « short communication » intitulée « "Thiol-ene" photoclick chemistry as a rapid and localizable functionalization pathway for silica capillary monolithic columns ».

L'article suivant, «Versatile ene-thiol photoclick reaction for preparation of multimodal monolithic silica capillary columns », met en évidence la polyvalence de l'approche « ene-thiol » retenue pour le greffage de différents réactifs thiolés, de façon à couvrir différents modes chromatographiques : l'octadécane-thiol pour le mode inverse, la cystéine pour le mode HILIC ou encore le mercaptoéthanesulfonate de sodium pour l'échange d'ions. La deuxième partie de cet article démontre l'intérêt de cette approche photochimique pour la préparation de colonnes capillaires monolithiques multimodales par photogreffages successifs et localisés de différents réactifs thiolés. Des exemples d'applications de colonnes multimodales comprenant un segment d'échange de cations

en amont d'un segment greffé C18 sont présentés pour le fractionnement et la séparation sélective de cations et de composés neutres ainsi que pour la pré-concentration et la séparation en ligne de β -bloquants.

Dans la deuxième partie de ce chapitre, cette approche de photo-click a été étendue au photogreffage de biomolécules spécifiques pour l'élaboration de supports d'affinité, l'objectif étant de coupler ces supports avec une zone de séparation pour l'analyse en ligne de l'Ochratoxine A dans diverses matrices. Deux types de biomolécules ont été choisies pour la réalisation des supports d'affinité à savoir : les anticorps et les aptamères qui présentent une très grande affinité et spécificité vis-à-vis des antigènes associés et permettent d'établir des interactions fortes avec la molécule cible.

I. Développement d'un procédé de photofonctionnalisation par photoclick chemistry

I.1. Etat de l'art sur l'utilisation de la « click chemistry » en sciences séparatives

La review suivante intitulée « Is click chemistry attractive for separation sciences ? » est consacrée à l'utilisation de la chimie « click » dans le domaine des sciences séparatives et plus spécifiquement en chromatographie. La première partie de la review expose les différentes réactions de click chemistry utilisées, ainsi que leurs avantages/inconvénients respectifs. Plusieurs approches sont ensuite présentées pour la fonctionnalisation de supports chromatographiques organiques/inorganiques par chimie « click ». Enfin, la dernière partie énumère les multiples applications rapportées dans la littérature qui utilisent ce type de réaction pour la préparation des phases stationnaires, en fonction des différents modes chromatographiques. D'après cette étude sur le potentiel de la chimie « click » en sciences séparatives, ces réactions offrent des rendements très intéressants (parfois proches de 100%) et permettent de couvrir l'ensemble des modes chromatographiques, y compris celui de la chromatographie d'affinité par le greffage de molécules biologiques. Si les avantages en termes de densité de greffage, de reproductibilité et de stabilité ne semblent pas très significatifs, l'intérêt des réactions de click réside néanmoins dans la possibilité de pouvoir être, pour certaines, initiées photochimiquement et de permettre un greffage contrôlé et orienté de ligands sur la phase stationnaire. Cette particularité est d'autant plus intéressante dans le cas du greffage de biomolécules qui requièrent une orientation particulière afin d'assurer la reconnaissance des molécules cibles.

Audrey Marechal
Racha El-Debs
Vincent Dugas
Claire Demesmay

Institut des Sciences Analytiques,
UMR CNRS 5280, Université de
Lyon, Villeurbanne, France

Received February 28, 2013

Revised April 12, 2013

Accepted April 12, 2013

Review Article

Is click chemistry attractive for separation sciences?

Trends in LC focus on dedicated separation developments spanning different fields of applications ranging from sample preparation to miniaturization. Chromatographic performances result from the porous media, its implantation inside the “column,” and its surface functionalization. Because molecular interactions govern chromatographic phenomena, surface functionalization is still a hot research topic. Besides standard approaches for surface functionalization, the use of new surface chemistry reactions opens new perspectives. Click chemistry belongs to this new class of chemical reactions, characterized by its specificity, compatibility with aqueous media, and high reaction yields. In this frame, we review the use of click chemistry reactions in chromatographic sciences. In a first part, we present click chemistry with a specific focus on its implementation in stationary phases. The use of these new clicked materials is detailed and discussed with respect to the chromatographic mode.

Keywords: Chromatography / Click chemistry / Monolith / Stationary phase / Surface functionalization
DOI 10.1002/jssc.201300231

1 Introduction

The “click chemistry” concept was introduced for the first time by Sharpless et al. in 2001 [1]. As described by these authors, it refers to a “set of powerful, virtually 100% reliable, selective reactions for the rapid synthesis of new compounds via heteroatom links (C–X–C).” Such reactions afford high yields and can be carried out in various solvents such as aqueous solutions at room temperature. Due to these numerous benefits, “click reactions” have received more and more interest in many areas such as nanotechnology [2, 3], bioconjugation [4, 5], DNA functionalization [6, 7], surface modification [8–10], polymers [11–14], and others [15–17]. Over the last 10 years, click chemistry has also spread to separative sciences and more particularly for the preparation of chromatographic materials [18–23]. Indeed, most of separation techniques require stationary phases with various functionalizations to be used in several chromatographic modes. By the immobilization of different functional groups, click chemistry provides a wide variety of surface chemistries, thus expanding the possibilities of applications. Moreover, due to their high yields,

click reactions are very interesting in the case of expensive reagents or in limited quantities. Thanks to their regioselectivity they are also particularly suitable for the immobilization of biological molecules (proteins, antibodies, etc) in order to keep their biological activity. Only a few reactions referenced as “click reactions” are mainly implemented for the functionalization of stationary phases. They differ in the nature of the functional groups involved, the mode of initiation, their effectiveness or their selectivity. The first part of this review presents the different click reactions used and their particularities and relative benefits. The different ways to prepare “clickable” materials, either by activating existing materials (particulate or monolithic ones, inorganic or organic ones) or by directly synthesizing “clickable” supports, are then described. To account for the potential of click chemistry for the preparation of chromatographic supports, many applications are presented in third part of this review, covering all chromatographic modes from the classical RP-LC mode, to IEC, hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC), chiral separations, affinity chromatography, etc.

2 “Click reaction” types

In most publications dealing with the functionalization of surfaces and stationary phases by click chemistry, three reactions have mainly emerged: the copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC), the thiol-ene reaction, and the Diels-Alder one. Whereas all these reactions possess the properties of click reactions, i.e. are versatile, simple, and efficient, they present different benefits and disadvantages depending on the desired application.

Colour online: See the article online to view Figs. 3 and 8 in colour.

Correspondence: Dr. Claire Demesmay, Institut des Sciences Analytiques, UMR CNRS 5280, Université de Lyon, 5 rue de la DOUA, 69100 Villeurbanne, France
E-mail: Demesmay@univ-lyon1.fr

Abbreviations: AIBN, azobisisobutyronitrile; CD, cyclodextrin; CSP, chiral stationary phases; CuAAC, copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition; HILIC, hydrophilic interaction liquid chromatography; ODS, octadecyl-silanized; PAHs, polynuclear aromatic hydrocarbons; WAX, weak anion exchange; WCX, weak cation exchange

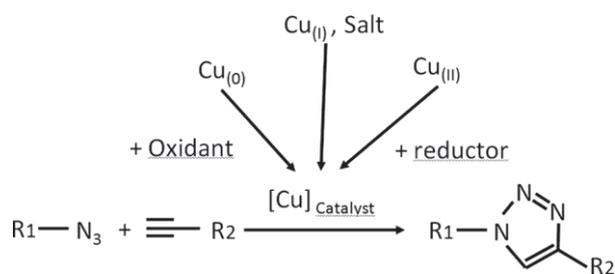


Figure 1. CuAAC reaction scheme leading to 1,4-disubstituted-1,2,3-triazoles. Adapted from [30].

2.1 Copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition

CuAAC was the first example of “click” chemistry. Discovered in 2002, this process was reported simultaneously and independently by the groups of Meldal [24] and Sharpless [25]. It is currently the most commonly click reaction used and it has been proven to be a powerful strategy to immobilize functional groups on different materials [26–28]. Chu et al. have extensively studied the CuAAC reaction for the preparation of separation materials for LC and have reported the benefits of this click reaction [29]. The overall reaction is a cycloaddition of an alkyne and an organic azide to give a five-membered 1,2,3-triazole as depicted in Fig. 1 [30].

Both the azide and alkyne functional groups are inert to most organic functionalities and stable in a wide range of solvents, temperature and pH. Despite the apparent simplicity of the reaction, its mechanism involves multiple reversible steps, involving coordination complexes of copper(I) acetylides of varying nuclearity [31]. The noncatalyzed reaction, which was discovered by Michael at the end of the 19th century and developed by Huisgen in 1963 [32], can take hours or days, requires high temperatures and results in regioisomeric mixtures [30]. In the presence of copper(I) species, the reaction is significantly sped up [30] and can be associated to a “click” reaction. The CuAAC transformation is easy to perform and gives the intended products in high yields. The rate of CuAAC is increased by a factor of 10^7 relative to the thermal process. Different sources of copper(I) are available (Fig. 1) and can be used under specific conditions. For example, when Cu(I) salts are added to the solution, the reaction can be carried out in aqueous media and in presence of a base to prevent the degradation of Cu(I). The use of Cu(II) salts requires the addition of a reducing agent to *in situ* generate copper (I). Finally, it is possible to *in situ* oxidize metallic copper, but copper powders are expensive and such a process is only applicable to particles functionalized in batch mode (miniaturized monoliths modified in a dynamic way would be clogged by the copper powder). The great success of the copper(I) catalyzed cycloaddition is rooted by its numerous benefits. Firstly, the triazole formation is irreversible, high yielding, and the product is essentially chemically inert to reactive conditions (oxidation, reduction, or hydrolysis). Moreover, this chemoselective reaction can be performed at room temperature, both in solution and on solid supports and ei-

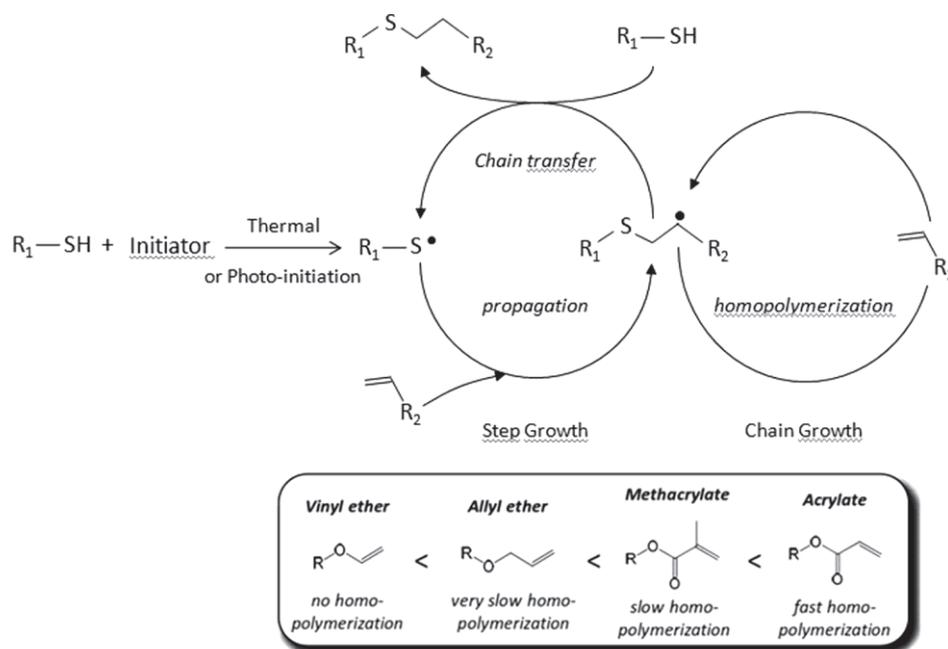
ther in an organic environment or in an aqueous one, which is interesting when molecules sensitive to organic solvents are considered. As specific benefits of this reaction, azides and alkynes are very tolerant to water or oxygen and can be easily introduced into a substrate as reactive functions. However, this reaction has still some drawbacks due to the toxic effect of copper(I) for living organisms and the explosive nature of azides. Indeed, inorganic azides may decompose explosively with heavy metals [33]. Moreover, azide functions may be degraded by exposure to light and become inactive [34]. It is therefore preferable to store these products in the dark.

2.2 Thiol-ene or thiol-yne reaction

Discovered and described by Posner in 1905 [35], the reaction of sulfur containing compounds with alkenes and alkynes is not a recent discovery. Commonly called thiol-ene or thiol-yne chemistry, this process was used extensively in the middle part of the 20th century as a synthetic route to cross-linked polymers and networks [36]. Thiols are prone to react both according to catalyzed processes (thiol Michael addition) [37] and radical ones (thiol-ene reaction), but radical addition has been known to proceed by an efficient step-growth chain process for several decades [38].

The photochemically/thermally induced version of this reaction is known to proceed by a radical mechanism to give an anti-Markovnikov-type thioether [39], as shown in Fig. 2 [40]. The ideal thiol-ene radical reaction revolves around the alternation between thiyl radical propagation across the ene functional group and the chain transfer reaction, which involves abstraction of a hydrogen radical from the thiol by the carbon-centered radical. In the ideal purely step-growth thiol-ene reaction, no homopolymerization (i.e. chain growth), in which the carbon-centered radical propagates through the ene moiety, occurs [40]. As a consequence, the net reaction is simply the combination between the thiol and ene functional moieties. Ideal thiol-ene reactions are observed for norbornene and vinyl ethers. On the opposite, with less reactive enes, the active carbon-centered radical may also participate to an additional propagation reaction, thus leading to homopolymerization and chain growth.

Two research groups have studied in details the influence of the alkene type [41, 42] and have shown that the reaction kinetics and the reactivity are significantly different according to the nature of the alkene involved (Fig. 2). The order of reactivity proposed by these two groups is quite similar, setting aside a few exceptions probably arising from slight differences in the experimental conditions in which the alkene reactivity was evaluated. They explain that the reactivity decreases with decreasing the electron density of the C=C double bond, except for norbornene, methacrylate, styrene, and conjugated dienes that are special cases. The rate of free-radical addition of thiols to norbornene is especially rapid because of a combination of the significant relief of ring strain (resulting from the addition of the thiyl radical across the double bond) and the subsequent rapid hydrogen-abstraction rate of a thiol



hydrogen by the carbon-centered radical. On the contrary, the carbon-centered radicals that form when the thiol radical is added to a methacrylate, styrene, or conjugated diene C=C bond are very stable and produce radicals (methacrylic, benzylic, or allylic) that have inherently low hydrogen-abstraction rate constants. By contrast to conjugated dienes, nonconjugated ones undergo thiol-ene reactions quite rapidly, according to the exact position of the alkene. At last, these authors have also demonstrated that the position of the alkene function on the compound has a strong impact on kinetics [42]: whereas the conversion of 1-hexene with 3-mercaptopropionate is quantitative after only 6 s of irradiation, conversion rates of only 20 and 40% are respectively reached for 2- and 3-hexene after 30 s irradiation.

Uygun et al. [43] have studied the influence of the type of initiation (photo or thermal initiation) in thiol-ene “click” chemistry. Azobisisobutyronitrile (AIBN) was used as radical initiator for thermal initiation (at 80°C) and two kinds of photoinitiator were tested: type I with the formation of two radicals (e.g. (2,4,6-trimethylbenzoyl)diphenylphosphine oxide, 2,2-dimethoxy-2-phenyl acetophenone), and type II with the abstraction of a hydrogen (e.g. benzophenone, thioxanthone, camphorquinone). Results obtained with different ene and thiol compounds show that yields reached with photoinitiation are still better than those attained with thermal initiation (with the same reaction duration). Secondly, it is preferable to use a type I photoinitiator that allows reaching yields close to 100%.

Several features of this reaction led it to be defined as a click reaction. Indeed, it is highly efficient, orthogonal to a wide range of functional groups, regioselective, robust and can be considered as an environmentally friendly process since it occurs in the absence of organic solvent and in mild reaction conditions. Finally, a potential drawback of this reac-

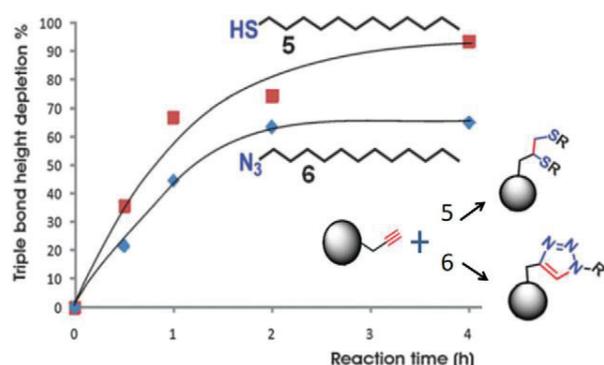


Figure 3. Comparison of thiol-yne and CuAAC click reactions on yne-beads. Reaction conditions (left) and kinetics (right). (red) Squares for 1-dodecanethiol (5) and (blue) diamonds for 1-dodecaneazide (6). Curves are drawn arbitrarily. Adapted from [45].

tion may lie in the possible formation of unwanted disulfide by-products through radical recombination [44]. However, the high reactivity of the thiol groups may be a critical drawback because thiol containing compounds can react with more common organic functionalities (i.e. thiol, epoxyde) this reaction is therefore not as specific as the CuAAC reaction. This characteristic still gives an advantage to this reaction that proceeds faster than other click reactions. In a recent study Gokmen et al. [45], have compared the kinetics of thiol-yne and alkyne-azide reactions, to introduce the same lauryl group on alkyne-modified silica particles (Fig. 3). As described by the authors, commonly used literature conditions have been set up for both reactions, involving a continuous UV-irradiation for the thiol-yne reaction and a Cu-catalyzed reaction for the alkyne-azide one. For each reaction, several batches of the “yne-beads” have been prepared and the

reactions have been stopped by washing the beads after predetermined reaction durations (30 min, 1, 2, and 4 h). Kinetics of both reactions were studied by IR spectroscopy, by monitoring the stretching vibration of the $C\equiv C$ bond.

After 4 h, the thiol–yne reaction is almost quantitative, whereas a yield of only 60% is obtained for the CuAAC reaction. So, the thiol–yne reaction goes to completion in these conditions, without neglecting the fact that the thiol concentration was two times higher and UV exposure was necessary. Another benefit of this reaction compared to the CuAAC one, is the absence of any metal catalyst that suggests its usefulness for bioconjugation, but only with biomolecules tolerant to UV irradiation (350 nm).

2.3 Diels–Alder reaction

The Diels–Alder reaction was developed by Diels and Alder in 1928, who received the Nobel Prize in 1950 for their discovery [46]. It involves a straightforward [4] + [2] cycloaddition reaction between an electron-rich diene and an electron-poor dienophile to form a stable cyclohexene adduct [47]. This simple and highly versatile reaction does not require any catalyst (a key feature for biomolecules), can proceed under physiological conditions with high yields and does not lead to any by-product [48, 49]. In a recent article Arumugam et al. [50], have shown that when this reaction is photoinduced, only vinyl ethers and enamines are reactive to form the Diels–Alder adduct in an aqueous medium.

Although the Diels–Alder reaction has already found applications in surface functionalization [51], it has yet not found any application in the field of surface functionalization of chromatographic materials. Only one recent article reports the functionalization of ethylene-bridged periodic mesoporous organic silica via the Diels–Alder cycloaddition [52].

3 Preparation of “clickable” chromatographic solid supports

The application of click chemistry for surface functionalization requires the presence of “clickable” functions—*azide*, *alkyne*, *alkene*, or *thiol*—on the surface of the solid material used as chromatographic support. This “clickable” function may either be attached during a preliminary functionalization step of an existing material or be obtained via the one-pot synthesis of a material bearing the “clickable” moieties.

3.1 Prefunctionalization of existing chromatographic supports with “clickable” functions

The main benefit of this approach, is to take advantage of existing chromatographic materials with optimized and well-known chromatographic properties in terms of efficiency, specific area, mass transfer kinetics, etc, provided

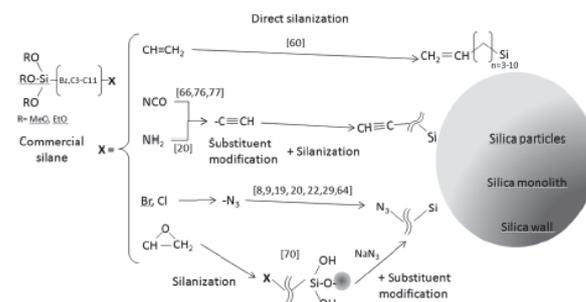


Figure 4. Silica surface functionalization pathways for the fabrication of “clickable” silica supports.

that their functionalization does not impair these properties. The set-up of this prefunctionalization step depends both on the chemistry of the solid support (inorganic or organic solid support) and on its physical state (particulate stationary phases or monolithic ones or even inner walls of open channels).

Whereas particulate stationary phases are functionalized in batch format, monolithic ones as well as inner walls of capillaries or empty channels have to be *in situ* modified. As a consequence, if the number of prefunctionalization steps as well as their duration is not critical when considering particles, it may turn into a key parameter when considering miniaturized columns that have to be modified one-by-one. In this latter case, fewer steps with shorter durations have to be preferred.

The main inorganic solid support used in chromatography is silica, from silica surfaces (oxidized silicon wafers, fused silica capillaries, or glass microsystems) to porous materials like particles or silica monoliths synthesized by sol-gel process. The chemical modification of silica surface uses organosilanes as hetero-bifunctional cross-linkers. Indeed, silanes react readily with a wide range of materials (bearing surface hydroxyl groups) to form stable siloxane bonds with silica surfaces. Furthermore, commercial silanes bearing different chemical functions are readily available. Figure 4 gives a general structure of silane coupling agents (also named organosilanes). These molecules are composed of two distinct reactive moieties: the silyl head group ($-\text{SiOR}_3$) and the organic reactive group (X) classically carried at the end of an aliphatic chain (tail group). The silyl head group undergoes reaction with surface hydroxyl groups leading to a robust tethering of the organosilane molecule to the substrate [53]. Then, organic functions (X) are used to functionalize the silica surface. Most commonly (commercial) reported groups for click reaction are isocyanato, amino, organic halides, epoxy, vinyl, and thiol groups.

The main approaches used to prepare clickable silica supports from commercial organosilanes are summarized in Fig. 4. Functionalization with alkenes and thiols groups is readily obtained by derivatization of the silica surface with commercial vinyl or mercaptosilanes. Alkyne and azide functionalized surfaces require the modification of the silane

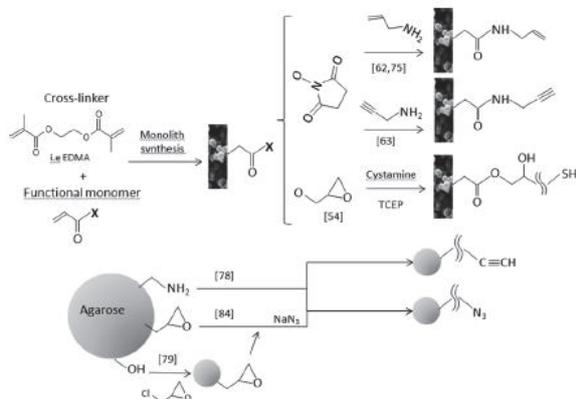


Figure 5. Preparation of clickable organic materials.

end-functional group either prior or after the silanization step.

The nature of the spacer between the silica surface and the “clickable” function depends on the reaction scheme adopted and may have a significant impact (positive or negative) both on the reactivity of the clickable function [41] and on the retention mechanism after the modification by click chemistry (this point will be discussed later).

Such silanization reactions remain time-consuming (from 1 to 36 h), usually require high temperatures (up to 110°C) and are usually implemented under inert atmosphere.

There is no clear information about the benefit to immobilize one function over another on the silica support (thiol versus alkene or alkyne versus azide), except for the report of the immobilization of the thiol function on the support allows to take advantage of the wealth of compounds containing a carbon–carbon double bond compared to the number of readily available and foul-smelling thiols [54].

Organic supports, particulate, or monolithic ones are either acrylate or methacrylate based polymers or agarose gels. They also require a prefunctionalization step before to be clicked with the desired moiety. Figure 5 summarizes the different ways to modify them to obtain pendant clickable reactive functions.

3.2 One-pot synthesis of “clickable” chromatographic supports

As an alternative to the postmodification of the chromatographic materials, some authors have developed a direct approach based on the “one-pot” synthesis of monolithic materials already functionalized with the desired clickable functions. Given the great diversity of organic monomers as well as of functionalized alkoxy silanes, a great variety of organic or hybrid materials bearing clickable functions can be synthesized by sol–gel process or by polymerization. Such a strategy allows avoiding the time-consuming prefunctionalization step. However, one has to keep in mind that the mod-

ification of only one reagent of the monomer mixture implies the entire reoptimization of the synthesis in order to obtain a material with good chromatographic properties in terms of permeability, mass transfer kinetics, specific area, etc.

For example, Sun et al. [55] and Slater et al. [56] have introduced propargyl monomers in the polymerization mixture in order to synthesize alkyne prefunctionalized organic monoliths dedicated to azide–alkyne click reactions (Fig. 6). Salwiński et al. have also prepared in one step an alkyne-prefunctionalized organic monoliths from poly(propargyl acrylate-pentaerythritol triacrylate-trimethylolpropane trimethacrylate) in a process of photochemically initiated copolymerization [57].

Chen et al. have reported the one-pot synthesis of hybrid silica-based monoliths bearing alkene functions [58, 59] by cocondensing an organosilane bearing either a methacrylate or a vinyl group with tetramethoxysilane. The reactivity of the thiol–ene click reaction was shown to be lower for the methacrylated silica monolith [41].

4 “Clicked” stationary phases and their applications in various chromatographic modes

Click chemistry has been used to prepare a great variety of stationary phases, each being devoted to one or several chromatographic modes. This part summarizes some applications reported in literature with different types of grafts: hydrophobic grafts, charged grafts (cationic, anionic, or zwitterionic), biological molecules including carbohydrates (cyclodextrins, sugars), enzymes, proteins, peptides, amino acids. They cover the overall chromatographic modes from the classical RP mode, the HILIC mode, the ion-exchange mode to chiral separation, affinity chromatography. To account for the benefits or drawbacks of click chemistry, the specificities of the as-synthesized stationary phases are discussed in terms of retention, selectivity, efficiency, long-term stability and others.

4.1 Hydrophobic clicked stationary phases dedicated to reversed mode

Thiol–ene click chemistry has been implemented by several groups to prepare RP chromatographic supports.

C18 open-tubular columns for CEC have been prepared based on thiol–ene click chemistry between *n*-octadecanethiol and a vinyl-prefunctionalized silica capillary (50 μm id) [60]. The reaction was carried out in dichloromethane for 24 h at 60°C. The electrochromatographic behavior of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) used as test solutes revealed a typical reversed phase behavior. The absence of peak tailing for basic solutes was attributed to the benefic effect of polar sulfur embedded groups that shielded the adsorption of basic analytes onto residual silanol groups.

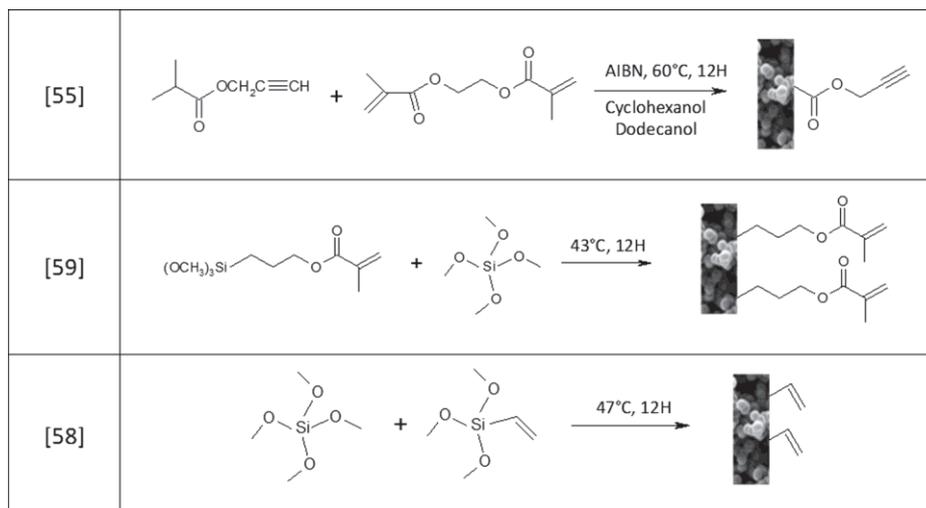


Figure 6. One-pot synthesis of clickable functionalized monoliths.

The *in situ* thiol–ene click modification of a vinyl hybrid silica monolithic capillary column with a mixture of *n*-octadecanethiol and 3-mercapto-1-propane sulfonate has been reported by Wang et al. [61]. Such a modification, achieved in 5 h in ethanol, led to reversed-phase monoliths with strong electro-osmotic flow, low plate heights in CEC (i.e. 8 μm) and satisfactory peak symmetries. The resulting monoliths have been used for the separation of several classes of compounds including benzenes, aromatic amines, and peptides from a BSA digest.

Thiol–ene reaction initiated by UV irradiation (at 365 nm for 4 h), in presence of AIBN as photoinitiator, has been investigated by Tijunelyte et al. [62] to the *in situ* modification of allyl functionalized organic monoliths. While the efficiency of this C18-like monolithic columns in CEC was moderate (50 000 plates/m < N < 80 000 plates/m), the run-to-run reproducibility as well as the column-to-column reproducibility, were excellent (1.7 and 2.1%, respectively ($n = 5$)), thus demonstrating the reliability of this way of functionalization.

At last, thiol–ene click chemistry (with both UV and thermal initiation) has been also implemented [54] to functionalize thiol-modified organic monolithic capillary columns (75 μm id) with dodecylmethacrylate. In presence of 2,2-dimethyl-2-phenylacetophenone as photoinitiator, the “clicking” was achieved at room temperature by irradiation at 360 nm for only 30 min. It has been reported that an excessive polymerization of lauryl methacrylate can lead to an increase in back pressure for clicked monoliths, consecutive to the pore clogging. However, polymerization could be controlled by kinetic parameters, i.e. the initiator concentration and reaction time. The as-obtained clicked monoliths were used for the separation of alkylbenzenes as well as proteins. The efficiencies were limited to about 20 000 plates/m for a small retained compound.

Thiol–yne photo click chemistry has been exploited by Dao et al. in order to graft adamantane on an alkyne-

prefunctionalized organic monolith that has been used in RP chromatographic mode [63].

The copper(I)-catalyzed 1,3-dipolar cycloaddition reaction has also proved its usefulness for the preparation of stationary phases (C8 and C18) dedicated to the reversed mode. The pioneering work of Slater et al. in 2006 [56] using alkyne- or azide-functionalized polymer beads has demonstrated that both functional groups are relatively stable to many synthetic procedures and can therefore be incorporated onto the stationary phase as desired. Such a result highlights the versatility of this reaction. The comparison between the grafting density obtained for the C18-clicked stationary phase (2.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$) and classical monomeric octadecyl-silanzed (ODS) stationary phases (2–3.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$), as well as between their methylene selectivities (1.44–1.58 and 1.3–1.6, respectively, for clicked and classical ODS silica stationary phases) shows that the hydrophobicity of the clicked materials exceeds those of many ODS columns. However, it is worth noting that the polymer backbone may also contribute to the overall hydrophobicity of the clicked materials.

Sun et al. have also implemented the CuAAC reaction [55] onto an alkyne-reactive organic monolith *in situ* synthesized in a 4.6-mm id stainless-steel tube. The characterization of the clicked monoliths (FTIR and XPS data) demonstrated that the click reaction yield was about 60% after 120 h at 30°C. The methylene selectivity increased from 1.08 for the blank column to 1.24 and 1.46, respectively, for the C8 and C18 functionalized monolithic columns. The separation ability of the as-synthesized stationary phases was demonstrated by the separation of five proteins, although the efficiency should be further improved as claimed by the authors.

At last, the azide–alkyne click reaction was also investigated in batch mode [64], on azide-modified silica particles to prepare oligo(ethylene glycol) bonded silica particles dedicated to reversed mode. The click reaction takes place at room temperature for 60 h in methanol/water. The resulting stationary phase demonstrated good separation efficiency and

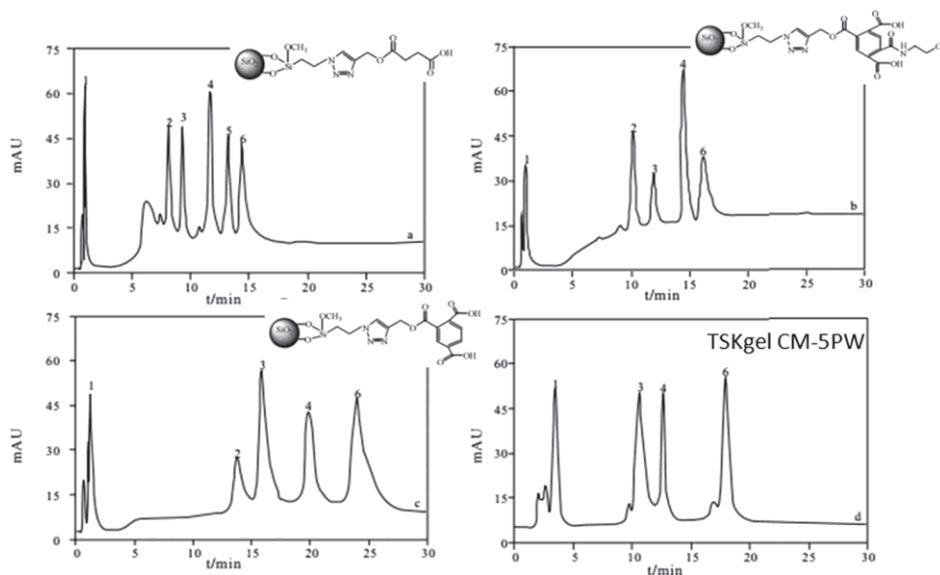


Figure 7. Comparison of the chromatograms of protein mixtures separated with four kinds of WCX columns. Peaks: 1-myoglobin; 2-RNase B; 3-RNase A; 4-Cytochrome C; 5- α -Chemotrypsin A; 6-Lysozyme. Adapted from [22].

selectivity in RP mode, with phenyl compounds as test solutes. A satisfactory reduced plate height of ca. 3, as well as peak symmetry of 1.15, were measured from naphthalene. Although the main retention mechanism was demonstrated to be RP, the ether bonds, hydroxyl end-groups, and unique helix-like conformation, led to some other interactions such as hydrogen bonding and dipole–dipole interactions, which brought different selectivity from ordinary ODS column.

In the context of miniaturization, the integration of different steps inside a microsystem (chip or capillary) is challenging. Analytical tools often rely on multidimensional chromatographic steps, i.e. a sample preparation step upstream to a separation one. Chen et al. [58] elaborated a 2-D silica monolithic capillary column, including a SCX column in the first dimension, in-line coupled with a reversed phase (C18) segment or a HILIC one (hexanol), both being obtained by a photoinitiated thiol–ene click reaction on a vinyl hybrid silica monolith. They demonstrated the interest of such a column coupling for the enrichment and separation of bases, peptides and BSA hydrolysate by CEC. They displayed a run-to-run reproducibility inferior to 2.3% estimated on the migration time and surface area of aniline and a column-to-column reproducibility of 4.1%.

All these works intend to demonstrate that click chemistry may be used to modify both organic and inorganic stationary phases to synthesize RP materials but no data allows a comparison of the grafting density or retention obtained by conventional grafting methods of silica (silanization) and click chemistry on the same support. Such information should be relevant to conclude if click chemistry is superior or not to the classical approach. In addition, there is no information about the potential benefit of the presence of ionizable triazole group ($pK = 9.3$) both in the reduction of the silanol secondary interactions and on its ability to promote a high electroosmotic flow, even at low pH in CEC.

4.2. Clicked charged (cationic, ionic, or zwitterionic) solid supports dedicated to ion exchange or HILIC mode

Two kinds of charged materials will be considered in this part: ions exchangers and zwitterionic materials.

CuAAC reaction has been successfully used to prepare different weak cation-exchange (WCX) columns by coupling three different alkyne-carboxylic acids onto azide-modified silica beads [22]. The click reaction was carried out in ethanol/water using CuI as catalyst, at room temperature for 36 h. Compared with the commercial WCX column (TSK gel CM-5PW), the WCX columns obtained by click chemistry afford better resolution and selectivity for the set of standard proteins studied (Fig. 7). Moreover, results obtained in terms of mass recoveries of protein (more than 97%), RSD in mass recoveries (less than 3%), as well as higher bioactivity recoveries, show that these clicked materials are very suitable for protein separation.

Using the same approach Liu et al. have immobilized propargylamine onto azide silica particles to get weak anion-exchange (WAX) columns [19]. This readily prepared click amino stationary phase exhibits good selectivity for the separation of common inorganic anions (Fig. 8). Authors have pointed out that the triazole ring plays a major role for the separation of the anions studied. Moreover, these stationary phases present also interesting hydrophilic interaction properties for the separation of polar compounds like nucleosides, organic acid, and bases. High efficiencies were maintained after the click reaction (reduced plate height of ca. 2.8). The apparent exchange capacity of the clicked column was determined from the average nitrogen percentage to be 1.44 mmol/g whereas a WAX column prepared by a standard silanization (using amino propyl triethoxysilane) exhibited a smaller capacity of 0.74 mmol/g.

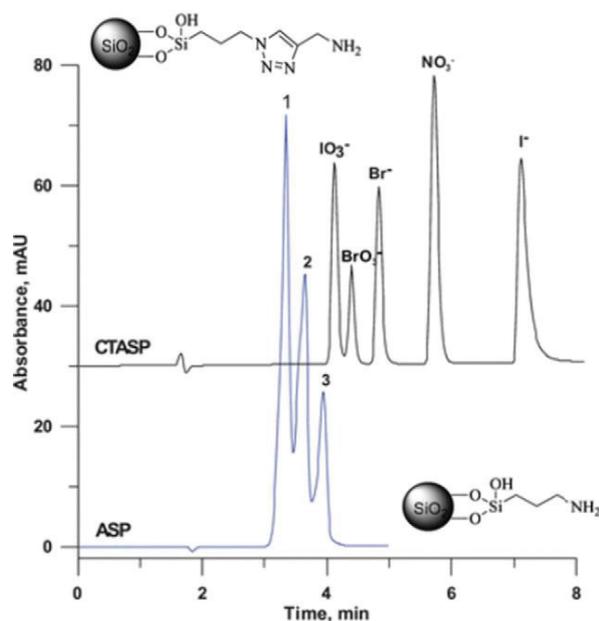


Figure 8. Comparison of click triazole-amino stationary phase and common amino stationary phase (ASP-based) column on the separation. Conditions: eluent, 5 mM Na₂SO₄ + 0.5 mM H₂SO₄; analytes, 0.1 mM of IO₃⁻, BrO₃⁻, Br⁻, I⁻, and 0.05 mM NO₃⁻; peaks on ASP-based column, 1, Br⁻ + I⁻; 2, BrO₃⁻ + NO₃⁻; 3, IO₃⁻; column temperature, 30°C; injection volume, 5 μL; flow rate, 1 mL min⁻¹; UV detection, 210 nm. Adapted from [19].

The efficiency of such WAX columns prepared by click chemistry was evaluated to 70 000 plates/m for Br⁻ and NO₃⁻. The reproducibility of the column preparation was estimated to 5.8% based on the RSD of the retention time for NO₃⁻.

Thiol-yne photoclick chemistry has been used by Guerrouache et al. to graft cysteamine on an organic monolith functionalized with alkyne functions [65]. The reaction was achieved in 4 h under UV irradiation at 313 nm in the presence of 2-hydroxy-2-methyl-1-phenyl propanone as initiator. The separation of three phenols has been carried out under HILIC chromatographic mode.

Zwitterionic functional groups (lysine) were also covalently bound to azide-modified silica beads conducting the CuAAC reaction at 40°C for 42 h in MeOH/water (1:2) [66]. The elemental analysis realized on the traditional lysine stationary phase and clicked lysine stationary phase shows that the surface grafting density is higher for the clicked one (1.46 versus 0.92 μmol.m⁻²). This zwitterionic stationary phase was used in HILIC mode for separation of nucleosides and bases. Compared to other HILIC commercial columns (zwitterionic-HILIC column and Atlantis silica column), the clicked support shows better retention properties with a peculiar selectivity (Fig. 9), which can be tuned by pH adjustment. However, only 34 000 plates/m have been obtained on cytidine with the clicked column.

The versatility of thiol-ene click chemistry has been also demonstrated on thiol-containing organic monoliths clicked with zwitterionic [2-methacryloyloxy]ethyl]dimethyl

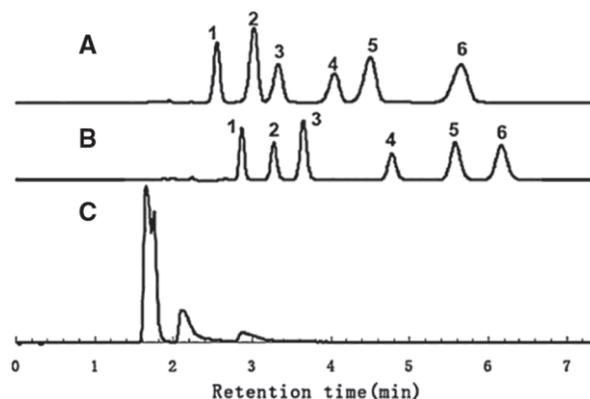


Figure 9. Separation of nucleosides and bases on click lysine stationary phase ((A) 5 μm, 150 mm × 4.6 mm id), zwitterionic-HILIC ((B) 5 μm, 150 mm × 4.6 mm id), and Atlantis HILIC-silica ((C) 5 μm, 150 mm × 4.6 mm id). Conditions: flow rate 1 mL/min; 30°C; mobile phase: acetonitrile/water (85:15, v/v); UV: 254 nm. Peak identification: (1) uracil, (2) adenosine, (3) uridine, (4) cytosine, (5) cytidine, and (6) guanosine. Reprinted from [61] with permission.

(3-sulfopropyl)ammonium betaine [54], with both UV and thermal initiation. Thermal initiation was implemented at 80°C for 2–4 h in presence of AIBN as initiator, whereas photoinitiation required only 30 min of irradiation at 360 nm with a light intensity of 12 mW.cm⁻² in the presence of DPMA or benzophenone as photoinitiator. This reaction provided a highly hydrophilic surface chemistry without pore clogging as previously observed by the authors when clicking long alkyl chains. This zwitterionic clicked monolith has proved its usefulness for the separation of various peptides and nucleosides mixtures.

At last, a zwitterionic HILIC stationary phase grafted with cysteine has been prepared by Shen et al. from silica particles prefunctionalized with vinyl groups [67]. As this polar amino acid already contains a thiol group, it can be reactive in the thiol-ene reaction. This click reaction preserves amino and carboxyl groups and thus maintains the zwitterionic property of cysteine. In their work, they use thermal initiation with AIBN as initiator at 65°C. In order to evaluate the separation efficiency of the clicked cysteine column, five polar compounds have been separated with an efficiencies ranging from 45 000 plates/m (uracil) to 82 000 plates/m (orotic acid). The comparison of their clicked column with different HILIC columns demonstrates its excellent hydrophilicity.

4.3 Biomolecule-clicked stationary phases

Immobilization of biomolecules onto the surface of solid matrices is a key feature in designing new chromatographic stationary phases. The linking procedures may attach the biomolecule in a controlled manner by highly selective reaction of complementary functionalities, orthogonal to those that may be present in the ligand to be attached. They must also preserve the chemical integrity and biological activity

of the attached molecule in order to retain their recognition properties. Because azide and alkyne functionalities do not interfere with common biological processes, the CuAAC provides an ideal profile for this purpose and has been widely used for the immobilization of various classes of biomolecules ranging from carbohydrates, amino acid derivatives, peptides, and proteins, alkaloids, etc, all these stationary phases finding applications in the field of chromatography (HILIC mode [68], affinity chromatography, chiral separation) or sample preparation (protein enrichment).

4.3.1 Clicked carbohydrate stationary phases

Carbohydrates are a class of molecules of paramount importance with respect to specific interactions, ranging from enantiospecific to affinity ligand interactions. This specificity depends on their spatial conformation and availability in solution. Their immobilization is subject to caution. Their ability to interact specifically even stereospecifically can be dramatically affected by the immobilization process. In the case of nonselective immobilization methodologies, poor stability in an aqueous mobile phase, formation of multilinked carbohydrate stationary phases and lack of batch-to-batch reproducibility are sometimes observed or side reactions by the competition of other hydroxyl groups occur. The use and benefits of click chemistry for the preparation of carbohydrate-functionalized chromatographic solid supports has been extensively investigated by several authors [29, 69] and it has been demonstrated that click chemistry allows to overcome these drawbacks and leads to stable and structurally well-defined stationary phases.

4.3.1.1 Cyclodextrins

Cyclodextrins (CDs) have been successfully grafted by click chemistry. The high selectivity of click chemistry reaction allows to orient the CD on the solid support in order to maintain its activity. This approach is fairly direct due to the relative ease to insert specifically an azide or an alkyne function on CDs [70–72].

Although CDs are mainly used for chiral separations, their hydrophobic cavity may also open the field to RP chromatography. CDs and other carbohydrate molecules, due to their polar hydroxyl groups find also applications in HILIC mode. Finally, carbohydrates and their clusters are used as specific ligands in affinity chromatography.

Guo et al. have immobilized CDs on azide-modified silica particles and have used the clicked materials in different chromatographic modes (HILIC, RP, and chiral chromatography) [18, 73, 74]. For each application, click reaction conditions are quite similar using CuSO₄ as catalyst and sodium ascorbate as reductor. Reactions are conducted in MeOH/water at room temperature for up to 72 h.

These CD clicked materials were used in HILIC mode for the separation of sugars and sugar derivatives [18]. No information is available about efficiency and resolution of

such separation. Such columns were also demonstrated to be adapted for the separation of polar compounds.

Based on the same embodiment, the same group reported the resolution of some racemic mixtures in chiral chromatography [74]. Only three of the six racemates tested were correctly separated. However, the comparison between the separations of two racemates (*trans*-stilbene oxide and benzoin) on chiral stationary phases (CSP) prepared either by a nonselective reaction (randomly oriented immobilization of CD) or with a selective immobilization of CD using click chemistry, clearly demonstrates the benefit of the oriented immobilization for CDs. Selectivities of 1.08 for *trans*-stilbene oxide ($R_s = 0.72$) and 1.09 for Benzoin ($R_s = 0.97$) were achieved with the clicked CSP, while racemates were totally coeluted with CSP prepared by the nonselective approach. This confirms the known assumption that immobilization of chiral selectors must be done in an oriented and homogeneous manner.

Finally, they evaluated the click cyclodextrin stationary phases in hydrophilic and RP-mixed mode [73]. In this work, they first demonstrated the application of the clicked CD stationary phases under HILIC mode by separation of some representative polar compounds (nine nucleosides and 12 fructooligosaccharides) and chiral separation (Ibuprofen). The U-shaped retention curves versus acetonitrile composition with a set of flavone glycosides revealed a HILIC/RP-LC mixed-mode retention behavior. For this set of test solutes (16 analytes), the authors have evaluated the orthogonality of RP-LC and HILIC on the click β -CD stationary phase. The excellent orthogonality (69.4%) demonstrates the great potential of this kind of column in 2-D-LC separation. A comparative study with a commercially available column, for continuous injections in HILIC mode, has highlighted a better reproducibility for the clicked column. Moreover, the column stability was investigated within a period of approximately six months and no change in retention times was observed, which proves the high stability of clicked grafts.

CDs have also been clicked on organic monoliths prefunctionalized with alkyne functions. The CuAAC click reaction was achieved in 16 h at 60°C [75]. The separation of flavanone enantiomers was obtained in CEC and nano-LC. Although obtained resolutions were > 1.5 , peak symmetries as well as analysis times up to 80 min, limited the performances of such approach. This issue was not attributed to the surface functionalization way but to the monolith synthesis, which should be optimized to increase performances. The click reaction was not necessarily called into question. Salwiński et al. have also used an alkyne prefunctionalized organic monolith in order to graft β -cyclodextrin or cinnamyl by CuAAC click reaction [57]. In their work, they studied the retention of flavonols and PAHs in electrochromatography.

4.3.1.2 Sugars

Glucose and maltose were immobilized on azide-modified silica particles by CuAAC click chemistry for the preparation of separation materials in HILIC mode [18]. The

side-reactions aroused by the hydroxyl groups can be avoided in this click strategy and the “click saccharides” bonded on the silica surface can retain their inherent structures and properties. These columns show excellent separation selectivity for the separation of polar compounds (nucleosides, sugar, and sugar derivatives). The same CuAAC chemistry has been used to immobilize glycosyl phenyl glycine on silica beads [76]. The click reaction was achieved at room temperature during five days (which is not negligible). Six nucleosides and bases were analyzed in HILIC mode with the clicked glycosyl phenyl glycine stationary phase and compared to the commercial Atlantis HILIC column. While compounds were coeluted with the commercial column, the clicked glycosyl phenyl glycine stationary phase allowed the separation of compounds, with only one coelution and without the need to use any buffer. These particular columns were used for the enrichment of glycopeptides from human IgG digest that proves the strong affinity of this stationary phase for glyco-compounds.

The same authors also have prepared a clicked chitoooligosaccharide stationary phase [77]. An azide group was attached to the saccharide that was subsequently clicked onto alkyne-silica particles. The comparison between the clicked chitoooligosaccharide column and the commercial Atlantis HILIC-silica column for the separation of six nucleosides shows that higher retentions and better separation are reached with the clicked column. However, no information about efficiency is given.

Glyco-silica beads dedicated to affinity purification and isolation of lectins have been synthesized by Ortega-Munoz et al. [20] by a CuAAC click reaction with microwave irradiation (800 W, 90°C for 1 h). Considering that the carbohydrate-protein interactions necessary for an efficient and specific recognition of biomolecules are multivalent, the immobilization of monovalent as well as multivalent carbohydrates and even trivalent dendrons was achieved by the authors. These materials are interesting affinity supports in which nonspecific interactions that make silica unsuitable for affinity chromatography are passivated. The benefits of the as-prepared materials have been demonstrated for the purification of protein mixtures, but also for the *in situ* fluorescent labeling of recognized lectins.

4.3.2 Amino-acid-, protein-, and enzyme-clicked stationary phases

As reported by Punna et al. the alkyne-azide click chemistry presents several advantages with respect to the attachment of biomolecules to biocompatible supports [78]: reaction can take place in aqueous solvent, the functionalities are highly selective in their reactivity, do not interfere with common biological processes and are stable to wide range of solvent, temperature, and pH.

In an attempt to prepare porous polymer-based particulate stationary phases for the separation of peptides and proteins, Slater et al. [56] investigated the effect of surface chemistry on separation properties. Alkyne-containing beads prepared by copolymerization of propargyl acrylate with

ethylene dimethacrylate led to more hydrophobic materials compared to azide-functionalized beads prepared by chemical modification of glycidyl methacrylate (GMA-co-EDMA) particles. Indeed, the presence of hydroxyl groups in these azide-functionalized beads increases the hydrophilicity of the material. This feature was turned into advantage for the design of separation systems for affinity chromatography where nonspecific hydrophobic interactions should be minimized. Soybean trypsin inhibitor was clicked on this support after conjugation through the *N*-hydroxysuccinimide ester of 4-pentynoic acid to produce an affinity sorbent for trypsin. Porous (GMA-co-EDMA) monolithic capillary columns were used to click an alkyne-carrying enzyme derivative (α -chemotrypsin) to prepare immobilized enzyme reactors [16]. In both cases, biomolecules have to be derivatized with heterobifunctional reagents carrying the alkyne moiety. This bioconjugation is not site directed, leading to a random immobilization of the biomolecule onto the solid support.

Agarose gels are very popular in affinity chromatography mainly due to their inexpensive and biocompatible nature [78]. Epoxy [79] and amine [78] functionalized agarose beads were used to prepare azide-functionalized beads. Oriented immobilization of alkyne-biotin and peptides derivatives was conveniently and easily realized on these clickable agarose supports [78]). Peptides that contain primary amide, carboxylic acid, thiol, and alcohol functional groups would otherwise complicate the strategy of immobilization. In an effort to increase the significance of clickable agarose, Hu et al. [79] have prepared a pseudo-biospecific material with less expensive clickable ligands than standard protein ligands (proteins A, G, L, and anti-IgG ligands) for the development of safe, efficient, and affordable immunosorbents for IgG adsorption. L-Histidine has been reported to show particular ability in separating IgG from human plasma or serum. Pseudo-biospecific ligand immuno-adsorbents were thus prepared by immobilization of L-Histidine alkyne derivatives onto azide reactive sepharose as support matrix. Compared to the direct immobilization of L-Histidine onto epoxy sepharose, the ligand density obtained by click chemistry (319.1 $\mu\text{mol/g}$) is almost fourfold higher while the binding capacity for IgG from human plasma increases 5.75-fold. Compared to a classical protein A-sepharose support, the binding capacity for the clicked L-Histidine sorbent is lower, but it exhibits higher adsorption selectivity for IgG. It is worth noticing that the clicked L-Histidine sorbent can be reused up to ten times without significant decrease in binding capacity. While results on the IgG-binding capacity depend on the ligand density, the authors have pointed out that the triazole ring in the clicked histidine support acts as a more rigid spacer arm thus enhancing the ligand availability. They also demonstrate that the triazole ring contributes to the specific adsorption of IgGs.

In an attempt to synthesize a brush-type chiral stationary phase Slater et al. [80] have immobilized a proline-derived chiral selector containing an alkyne moiety onto azide-silica particles and monoliths by using the CuAAC click reaction. They have demonstrated that the azido propyl group does not

create substantial nonspecific retention in the normal phase mode, therefore no end capping of the residual, unreacted coupling partner is required after the click reaction.

4.4 Miscellaneous

4.4.1 Cinchona alkaloid clicked chiral stationary phases

The group of Lindner has demonstrated that the CuAAC reaction may offer a mild and broadly substrate-compatible immobilization strategy for *Cinchona* alkaloids derivatives onto azide-modified silica, to synthesize chiral stationary phases for the resolution of a representative set of structurally diverse racemic compounds [81–83]. They have shown that click chemistry allows to control the surface coverage and to create silica gels with high surface loadings, which compare well to or even exceed those, achievable with the established-free radical addition protocol.

The clicked stationary phases were compared with their thioether-linked congeners. With a first small set of chiral model analytes and under polar organic mobile phase conditions, the authors stated in an early article [83] that the conformational constraints of the triazole-linker appear to diminish analytes retention compared to more flexible thioether congener, but that the recognition capacity (selectivity) of the selector is largely retained, thus demonstrating that the triazole linkage (whether attached through a short C3- or a long flexible C11-linker) is noninvasive to chiral recognition. In another more recent article [82] and with a larger set of mandelic acids as test solutes, they conclude that the gain in enantioselectivity for the click stationary phase is consistent (Fig. 10) when the rigid triazole linker is introduced at the C11 position of the chiral selector. At last, they have demonstrated the high chemical stability of the clicked chiral stationary phases both in polar-organic and hydro-organic modes.

4.4.2 Boronic acid clicked material for affinity chromatography

Suksrichavalit et al. [84] have prepared a “clickable” boronic acid ligand that was immobilized on sepharose gel. For this, they introduced a terminal acetylene group into commercially available 3-aminophenyl boronic acid and prefunctionalized sepharose with an azide group. The CuAAC click reaction took place under physiological conditions (water/MeOH) with CuSO₄ water/MeOH. The efficiency of glycoprotein separation afforded by this new affinity clicked matrix was compared with that offered by a commercial boronic acid gel, as well as by a similar ligand immobilized through a conventional coupling reaction (direct ring opening of epoxide available on gel). Compared to these other boronic acid affinity gels, the clicked one displays superior effectiveness in separating model glycoproteins from closely related BSA. According to the authors, the high glycoprotein binding with

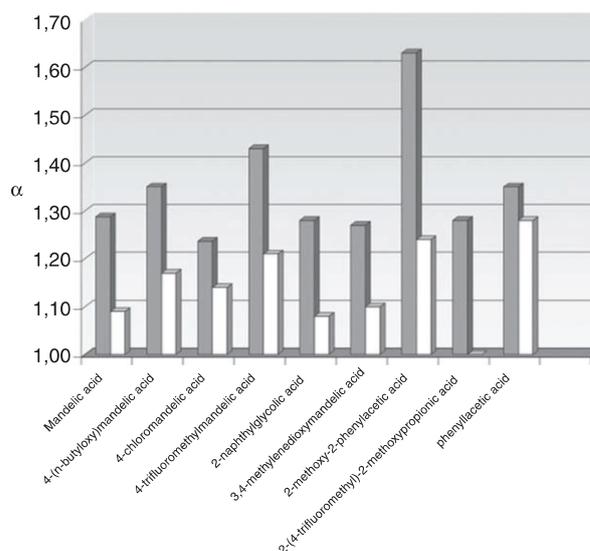


Figure 10. Comparison of the enantioselectivities obtained with the 1,2,3-triazolo-linked (gray) and thioether-linked CSP-2 (white) for selected mandelic acids derivatives under optimized conditions (acetonitrile, AcOH 160 mM, TEA 10 mM, 0.75 mL/min, detection 254 nm, column 100 × 4 mm). Reprinted from [82] with permission.

the clicked boronic gel may be explained in part by the lower cross-linking density of the sepharose used and by the longer triazole spacer that may also reduce steric hindrance for binding large protein molecules. Moreover, the clicked gel presents much improved stability compared to that obtained by a direct nonselective coupling.

5 Conclusion

As summarized in Table 1, click chemistry has been used to develop a great variety of new stationary phases dedicated to the separation of various classes of compounds in all chromatographic modes.

Some of these materials, mainly those grafted with alkyl ligands, can be considered as proof of concept of the applicability of click chemistry in the field of stationary phase functionalization and do not clearly demonstrate a true plus from the chromatographic point of view. Data allowing to compare clicked stationary phases with their classically functionalized counterparts are too often missing and it is therefore difficult to conclude on the benefits of click chemistry in terms of grafting density, reproducibility, and stability. That is why the growing number of applications of click chemistry in the field of RP-LC is not always well justified. The benefits of click chemistry for the functionalization of stationary phases clearly relies on its ability to control the immobilization of “ligand” molecules, which possess several polar groups that would be otherwise involved in a classical immobilization reaction and would lead to a random immobilization and to inhomogenous recognition pathways. As a consequence, the

Table 1. Applications of click chemistry in chromatography (in bold character, the clickable function attached to the solid support)

Support	Click reaction	Graft molecules	Chromatographic mode	Applications	References
SiO ₂ capillary wall	Alkene -thiol	C18	RP	PAH, basic compounds	[60]
SiO ₂ particles	Alkyne -azide	Carbohydrate (β-CD)	RP	Flavone glycosides	[73]
SiO ₂ particles	Azide -alkyne	Tetra ethylene glycol	RP	Phenyl compounds, traditional Chinese medicine	[64]
SiO ₂ particles	Azide -alkyne	Benzyl, C12, C18	RP	Alkylbenzene, PAH	[85]
Hybrid SiO ₂ monolith	Alkene -thiol	Mixed C18 + sulfonate	RP/mixed mode	Alkylbenzenes, protein digest	[61]
Hybrid SiO ₂ monolith	Alkene -thiol	C18	RP	Peptides	[58]
Organic monolith	Azide -alkyne	C18	RP	Proteins, peptides, alkylbenzene	[56]
Organic monolith	Alkyne -azide	C8, C18	RP	Proteins	[55]
Organic monolith	Thiol -alkene	PEG	RP	Alkylbenzenes	[62]
Organic monolith	Alkyne -thiol	Adamantane	RP	Alkylbenzenes	[63]
Organic monolith	Thiol -alkene	C12	RP	Alkylbenzenes	[54]
Hybrid SiO ₂ monolith	Alkene -thiol	Sulfonate	SCX	Amines	[61]
SiO ₂ particles	Azide -alkyne	Carboxylic acids	WCX	Proteins	[22]
SiO ₂ particles	Azide -alkyne	Amine	WAX	Inorganic anions	[19]
SiO ₂ particles	Azide -alkyne	Amine	HILIC	Nucleosides, organic acids, organics bases	[19]
SiO ₂ particles	Azide -alkyne	Hydroxyl	HILIC	Sugars	[85]
SiO ₂ particles	Alkene -thiol	Cysteine (amino acid)	HILIC	Fructo-oligosaccharides, basic and polar compounds, peptides	[67]
SiO ₂ particles	Alkyne -azide	Carbohydrate (β-CD)	HILIC	Nucleosides, organic acids, alkaloids, oligosaccharides	[73]
SiO ₂ particles	Azide -alkyne	Carbohydrate (Glc, maltose, β-CD)	HILIC	Nucleosides, organic acids, puric and pyrimidic bases	[18]
SiO ₂ particles	Alkyne -azide	Carbohydrate (glycosylphenylglycine)	HILIC	Nucleosides, organic acids, nucleic acid bases, enrichment of glycopeptide	[76]
SiO ₂ particles	Alkyne -azide	Zwitterion	HILIC	Nucleosides, organic acids, antibiotics (cephalosporines), carbapenemes	[66]
SiO ₂ particles	Alkyne -azide	Chitooligosaccharide	HILIC	Nucleosides, saccharide, amino acids, fructooligosaccharide, enrichment of glycopeptide	[77]
Organic monolith	Alkyne -thiol	Cysteamine	HILIC	Phenols	[65]
Organic monolith	Thiol -alkene	Zwitterion	HILIC	Peptides, nucleosides	[54]
Organic monolith	Thiol -alkene	PEG	HILIC	Phenols	[62]
Organic monolith	Alkyne -azide	Carbohydrate (β-CD)	Chiral/RP	Flavonones	[75]
Organic monolith	Alkyne -azide	Carbohydrate (β-CD) /Cinnamyl	Chiral/RP	PAHs, flavonols, enantiomer	[57]
SiO ₂ particles	Alkyne -azide	Carbohydrate (β-CD)	Chiral/RP	Pharmaceutical enantiomers	[74]
SiO ₂ particles	Alkyne -Azide	Carbohydrate (β-CD)	Chiral/HILIC	Nucleosides, organic acids, alkaloids, oligosaccharides	[73]
SiO ₂ particles	Alkyne -azide	Carbohydrate (β-CD)	Chiral/RP	Enantiomers	[86]
SiO ₂ particles and SiO ₂ monolith	Azide -alkyne	Proline derivative	Chiral/NP	π-Acidic aminoacids amide derivatives	[80]
SiO ₂ particles	Azide -alkyne	Carbohydrate (maltose)	HILIC	Saccharide, nucleic acid base, nucleosides, peptides, oligosaccharide	[87]
SiO ₂ particles	Azide -alkyne	Cinchona alkaloids	Chiral/WAX	Amino acids, aryloxyacids, aromatic carboxylic acids	[81–83]
SiO ₂ particles	Azide -alkyne Alkyne -azide	Carbohydrate sugar	Affinity	Lectin (ConA) purification	[20]
Agarose gel	Azide -alkyne	Biotine	Affinity	Proteins purification	[88]
Agarose gel	Azide -alkyne	Boronic acid ligands	Affinity	Glycoproteins	[84]
Organic monolith	Azide -alkyne	Enzyme	IMER	Protein digestion	[16]
Organic monolith	Azide -alkyne	Protein	Affinity	Trypsin	[56]
Agarose	Azide -alkyne	Peptides and biotin	Affinity	Antibody	[87]
Agarose	Azide -alkyne	L-Histidine	Affinity	IgG	[79]
Capillary wall	Azide -alkyne	Dendrimers PEO PEG PEI	EOF modifiers	Adsorptions	[10]

IMER, immobilized enzyme reactors.

most relevant applications of click chemistry as a new tool for stationary phase functionalization, belong to the field of chiral or affinity chromatography for which the biological activity or accessibility of the grafted ligands are of main concern.

The authors have declared no conflict of interest.

6 References

- [1] Kolb, H. C., Finn, M. G., Sharpless, K. B., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, 40, 2004–2021.
- [2] Voggu, R., Suguna, P., Chandrasekaran, S., Rao, C. N. R., *Chem. Phys. Lett.* 2007, 443, 118–121.
- [3] Li, N. W., Binder, W. H., *J. Mater. Chem.* 2011, 21, 16717–16734.
- [4] Wang, Q., Chan, T. R., Hilgraf, R., Fokin, V. V., Sharpless, K. B., Finn, M. G., *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 3192–3193.
- [5] Wang, X. B., Liu, L., Luo, Y., Shi, H. T., Li, J. Y., Zhao, H. Y., *Macromol. Biosci.* 2012, 12, 1575–1582.
- [6] Gierlich, J., Burley, G. A., Gramlich, P. M. E., Hammond, D. M., Carell, T., *Org. Lett.* 2006, 8, 3639–3642.
- [7] Seo, T. S., Li, Z. M., Ruparel, H., Ju, J. Y., *J. Org. Chem.* 2003, 68, 609–612.
- [8] Ranjan, R., Brittain, W. J., *Macromolecules* 2007, 40, 6217–6223.
- [9] Henriksson, A., Friedbacher, G., Hoffmann, H., *Langmuir* 2011, 27, 7345–7348.
- [10] Prakash, S., Long, T. M., Selby, J. C., Moore, J. S., Shannon, M. A., *Anal. Chem.* 2007, 79, 1661–1667.
- [11] Helms, B., Mynar, J. L., Hawker, C. J., Frechet, J. M. J., *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 15020–15021.
- [12] Opsteen, J. A., Van Hest, J. C. M., *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* 2007, 45, 2913–2924.
- [13] Lutz, J. F., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, 46, 1018–1025.
- [14] Fournier, D., Hoogenboom, R., Schubert, U. S., *Chem. Soc. Rev.* 2007, 36, 1369–1380.
- [15] Wu, P., Fokin, V., Sharpless, K. B., *The Scripps Research Institute*, USA 2007, p. 52.
- [16] Celebi, B., Bayraktar, A., Tuncel, A., *Anal. Bioanal. Chem.* 2012, 403, 2655–2663.
- [17] Pirali, T., Gatti, S., Di, B. R., Tacchi, S., Zaninetti, R., Brunelli, E., Massarotti, A., Sorba, G., Canonico, P. L., Moro, L., Genazzani, A. A., Tron, G. C., Billington, R. A., *Chem. Med. Chem.* 2007, 2, 437–440.
- [18] Guo, Z. M., Lei, A. W., Zhang, Y. P., Xu, Q., Xue, X. Y., Zhang, F. F., Liang, X. M., *Chem. Commun.* 2007, 24, 2491–2493.
- [19] Liu, Y. J., Du, Q., Yang, B. C., Zhang, F. F., Chu, C. H., Liang, X. M., *Analyst* 2012, 137, 1624–1628.
- [20] Ortega-Munoz, M., Lopez-Jaramillo, J., Hernandez-Mateo, F., Santoyo-Gonzalez, F., *Adv. Synth. Catal.* 2006, 348, 2410–2420.
- [21] Yu, H., Yin, C. H., Jia, C. Y., Jin, Y., Ke, Y. X., Liang, X. M., *Chirality* 2012, 24, 391–399.
- [22] Zhao, K. L., Song, C., Wang, F., Bai, Q., *Chin. Chem. Lett.* 2012, 23, 305–308.
- [23] Zhao, K. L., Bai, Q., Song, C., Wang, F., Yang, F., *J. Sep. Sci.* 2012, 35, 907–914.
- [24] Tornøe, C. W., Christensen, C., Meldal, M., *J. Org. Chem.* 2002, 67, 3057–3064.
- [25] Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V., Sharpless, K. B., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002, 41, 2596–2599.
- [26] Kolb, H. C., Sharpless, K. B., *Drug Discovery Today* 2003, 8, 1128–1137.
- [27] Bock, V. D., Hiemstra, H., van Maarseveen, J. H., *Eur. J. Org. Chem.* 2006, 2006, 51–68.
- [28] Guan, B., Ciampi, S., Le Saux, G., Gaus, K., Reece, P. J., Gooding, J. J., *Langmuir* 2011, 27, 328–334.
- [29] Chu, C. H., Liu, R. H., *Chem. Soc. Rev.* 2011, 40, 2177–2188.
- [30] Hein, J. E., Fokin, V. V., *Chem. Soc. Rev.* 2010, 39, 1302–1315.
- [31] Meldal, M., Tornøe, C. W., *Chem. Rev.* 2008, 108, 2952–3015.
- [32] Huisgen, R., *Angew. Chem. Int. Ed.* 1963, 2, 565–598.
- [33] Bräse, S., Gil, C., Knepper, K., Zimmermann, V., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, 44, 5188–5240.
- [34] Sahu, S. K., Panda, S. P., Sadafule, D. S., Kumbhar, C. G., Kulkarni, S. G., Thakur, J. V., *Polym. Degrad. Stab.* 1998, 62, 495–500.
- [35] Posner, T., *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 1905, 38, 646–657.
- [36] Morgan, C. R., Magnotta, F., Ketley, A. D., *J. Polym. Sci.* 1977, 15, 627–645.
- [37] Hoyle, C. E., Lowe, A. B., Bowman, C. N., *Chem. Soc. Rev.* 2010, 39, 1355–1387.
- [38] Okay, O., Bowman, C. N., *Macromol. Theory Simul.* 2005, 14, 267–277.
- [39] Zard, S. Z., *Radical Reactions in Organic Synthesis*, Oxford University Press, New York 2003.
- [40] Hoyle, C. E., Bowman, C. N., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 1540–1573.
- [41] Northrop, B. H., Coffey, R. N., *J. Am. Chem. Soc.* 2012, 134, 13804–13817.
- [42] Hoyle, C. E., Lee, T. Y., Roper, T., *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 2004, 42, 5301–5338.
- [43] Uygun, M., Tasdelen, M. A., Yagci, Y., *Macromol. Chem. Phys.* 2010, 211, 103–110.
- [44] Desroches, M., Caillol, S., Lapinte, V., Auvergne, R. M., Boutevin, B., *Macromolecules* 2011, 44, 2489–2500.
- [45] Gokmen, M. T., Brassinne, J., Prasath, R. A., Du Prez, F. E., *Chem. Commun.* 2011, 47, 4652–4654.
- [46] Diels, O., Alder, K., *Justus Liebigs Annalen der Chemie* 1928, 460, 98–122.
- [47] Sauer, J., Sustmann, R., *Angew. Chem. Int. Ed.* 1980, 19, 779–807.
- [48] Palomo, J. M., *Eur. J. Org. Chem.* 2010, 2010, 6303–6314.
- [49] Nandivada, H., Jiang, X., Lahann, J., *Adv. Mater.* 2007, 19, 2197–2208.
- [50] Arumugam, S., Popik, V. V., *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 5573–5579.

- [51] Sun, X.-L., Stabler, C. L., Cazalis, C. S., Chaikof, E. L., *Bioconj. Chem.* 2005, 17, 52–57.
- [52] Esquivel, D., De Canck, E., Jimenez-Sanchidrian, C., Van Der Voort, P., Romero-Salguero, F. J., *J. Mater. Chem.* 2011, 21, 10990–10998.
- [53] Dugas, V., Demesmay, C., Chevolut, Y., Souteyrand, E., *Use of Organosilanes in Biosensors*, Nova Science Publishing, New York 2010.
- [54] Lv, Y., Lin, Z., Svec, F., *Analyst* 2012, 137, 4114–4118.
- [55] Sun, X., Lin, D., He, X., Chen, L., Zhang, Y., *Talanta* 2010, 82, 404–408.
- [56] Slater, M., Snauko, M., Svec, F., Fréchet, J. M. J., *Anal. Chem.* 2006, 78, 4969–4975.
- [57] Salwiński, A., Roy, V., Agrofoglio, L. A., Delépée, R., *Macromol. Chem. Phys.* 2011, 212, 2700–2707.
- [58] Chen, Y. Z., Wang, K. Y., Yang, H. H., Liu, Y. X., Yao, S. Z., Chen, B., Nie, L. H., Xu, G. M., *J. Chromatogr. A* 2012, 1233, 91–99.
- [59] Chen, Y., Wu, M., Wang, K., Chen, B., Yao, S., Zou, H., Nie, L., *J. Chromatogr. A* 2011, 1218, 7982–7988.
- [60] Chen, X., Wei, Y., Lu, J.-Y., Zhang, A.-Z., Ye, F.-G., Zhao, S.-L., *Chinese. J. Anal. Chem.* 2012, 40, 1584–1588.
- [61] Wang, K. Y., Chen, Y. Z., Yang, H. H., Li, Y., Nie, L. H., Yao, S. Z., *Talanta* 2012, 91, 52–59.
- [62] Tijnelyte, I., Babinot, J., Guerrouache, M., Valincius, G., Carbonnier, B., *Polymer* 2012, 53, 29–36.
- [63] Dao, T. T. H., Guerrouache, M., Carbonnier, B., *Chin. J. Chem.* 2012, 30, 2281–2284.
- [64] Guo, Z., Liu, Y., Xu, J., Xu, Q., Xue, X., Zhang, F., Ke, Y., Liang, X., Lei, A., *J. Chromatogr. A* 2008, 1191, 78–82.
- [65] Guerrouache, M., Mahouche-Chergui, S., Chehimi, M. M., Carbonnier, B., *Chem. Commun.* 2012, 48, 7486–7488.
- [66] Guo, H., Liu, R., Yang, J., Yang, B., Liang, X., Chu, C., *J. Chromatogr. A* 2012, 1223, 47–52.
- [67] Shen, A., Guo, Z., Yu, L., Cao, L., Liang, X., *Chem. Commun.* 2011, 47, 4550–4552.
- [68] Moni, L., Ciogli, A., D'Acquarica, I., Dondoni, A., Gasparini, F., Marra, A., *Chemistry* 2010, 16, 5712–5722.
- [69] Faugeras, P. A., Boens, B., Elchinger, P. H., Brouillette, F., Montplaisir, D., Zerrouki, R., Lucas, R., *Eur. J. Org. Chem.* 2012, 4087–4105.
- [70] Melton, L. D., Slessor, K. N., *Carbohydr. Res.* 1971, 18, 29–37.
- [71] Zhang, L.-F., Wong, Y.-C., Chen, L., Ching, C. B., Siu-Choonng, N., *Tetrahedron Lett.* 1999, 40, 1815–1818.
- [72] Nielsen, T. T., Wintgens, V. R., Amiel, C., Wimmer, R., Larsen, K. L., *Biomacromolecules* 2010, 11, 1710–1715.
- [73] Guo, Z. M., Jin, Y., Liang, T., Liu, Y. F., Xu, Q., Liang, X. M., Lei, A. W., *J. Chromatogr. A* 2009, 1216, 257–263.
- [74] Zhang, Y., Guo, Z., Ye, J., Xu, Q., Liang, X., Lei, A., *J. Chromatogr. A* 2008, 1191, 188–192.
- [75] Guerrouache, M., Millot, M. C., Carbonnier, B., *Macromol. Rapid Commun.* 2009, 30, 109–113.
- [76] Huang, H., Guo, H., Xue, M., Liu, Y., Yang, J., Liang, X., Chu, C., *Talanta* 2011, 85, 1642–1647.
- [77] Huang, H., Jin, Y., Xue, M., Yu, L., Fu, Q., Ke, Y., Chu, C., Liang, X., *Chem. Commun.* 2009, 45, 6973–6975.
- [78] Punna, S., Kaltgrad, E., Finn, M. G., *Bioconj. Chem.* 2005, 16, 1536–1541.
- [79] Hu, X., Li, G., Huang, E., *J. Chromatogr. B* 2012, 899, 96–102.
- [80] Slater, M. D., Frechet, J. M. J., Svec, F., *J. Sep. Sci.* 2009, 32, 21–28.
- [81] Kacprzak, K. M., Maier, N. M., Lindner, W., *J. Chromatogr. A* 2011, 1218, 1452–1460.
- [82] Kacprzak, K., Maier, N., Lindner, W., *J. Sep. Sci.* 2010, 33, 2590–2598.
- [83] Kacprzak, K. M., Maier, N. M., Lindner, W., *Tetrahedron Lett.* 2006, 47, 8721–8726.
- [84] Suksrichavalit, T., Yoshimatsu, K., Prachayasittikul, V., Bülow, L., Ye, L., *J. Chromatogr. A* 2010, 1217, 3635–3641.
- [85] Guo, Z. M., Lei, A. W., Liang, X. M., Xu, Q., *Chem. Commun.* 2006, 43, 4512–4514.
- [86] Wang, Y., Xiao, Y., Yang Tan, T. T., Ng, S.-C., *Tetrahedron Lett.* 2008, 49, 5190–5191.
- [87] Fu, Q., Guo, Z., Liang, T., Zhang, X., Xu, Q., Liang, X., *Anal. Methods* 2010, 2, 217–224.
- [88] Landi, F., Johansson, C. M., Campopiano, D. J., Hulme, A. N., *Org. Biomol. Chem.* 2010, 8, 56–59.

I.2 Fonctionnalisation de monolithes de silice par « thiol-ene » et « ene-thiol » photoclick chemistry

Après avoir étudié les différentes réactions de click utilisées en sciences séparatives, la réaction mettant en jeu une fonction thiol et une fonction alcène a été retenue pour la suite des travaux. Cette réaction de fonctionnalisation peut être réalisée selon deux approches différentes : version « thiol-ene » et version « ene-thiol ».

La première, présentée **Figure 50**, consiste à préfonctionnaliser le support monolithique avec un composé thiolé et à greffer le composé d'intérêt par sa double liaison. Cette approche implique la présence d'une double liaison dans le composé à greffer (acrylate, alcène...). La réaction est initiée directement en surface du monolithe, à partir de la formation d'un radical libre après abstraction de l'hydrogène du thiol par un photoinitiateur. Le radical est ensuite impliqué dans des étapes de propagation et de transfert de chaîne conduisant à la formation de liaisons thioether. Ces liaisons sont stables chimiquement et ne devraient pas conférer au support d'interactions secondaires néfastes d'un point de vue chromatographique. Dans cette configuration, il peut y avoir croissance d'un polymère par une réaction additionnelle d'homo-polymérisation. Cependant, il a été montré que cette polymérisation pouvait être contrôlée selon la nature des alcènes utilisés, permettant ainsi de maîtriser la taille de la couche polymérique en surface.

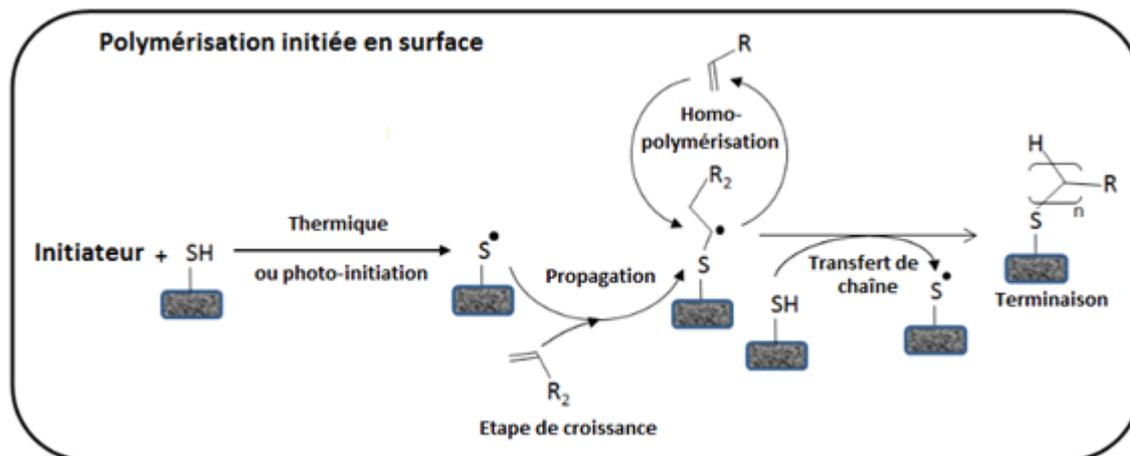


Figure 50: Représentation schématique du mécanisme de la réaction « thiol-ene »

L'approche inverse, nommée « ene-thiol » permet de greffer des composés thiolés sur un monolithe préfonctionnalisé avec une fonction alcène (**Figure 51**). Comme illustré **Figure 51**, la réaction « ene-thiol » conduit au greffage d'une seule molécule (voire deux) sur la surface et non plus d'une couche polymérique. Cela devrait permettre d'accéder à une couverture de surface mieux définie qu'avec une polymérisation mais à des rétentions plus faibles.

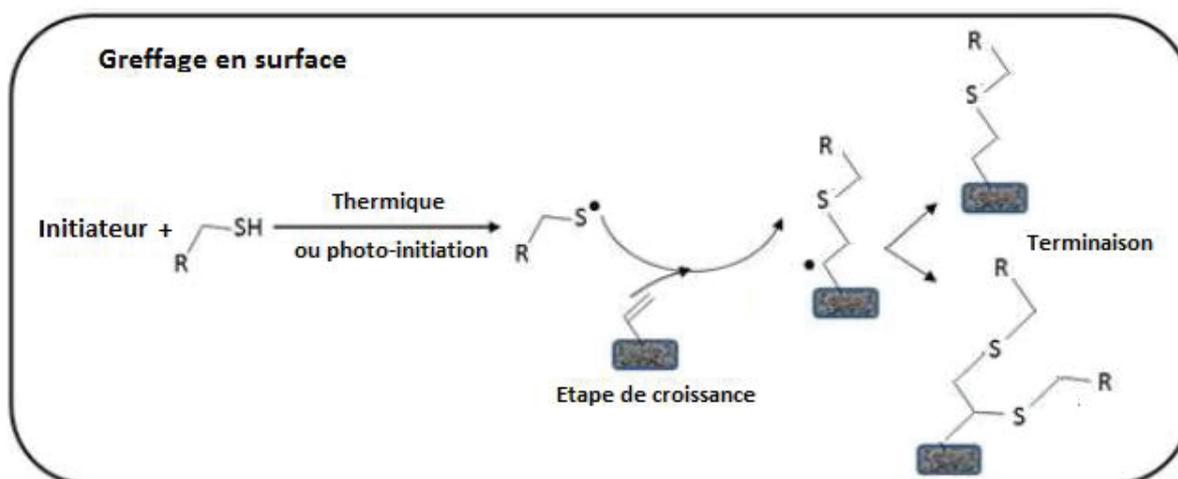


Figure 51: Représentation schématique du mécanisme de la réaction inverse « ene-thiol »

Les deux approches présentent donc chacune leurs avantages et inconvénients respectifs en termes de contrôle de chimie de surface et de rétention.

Les deux versions « ene-thiol » et « thiol-ene » ont été comparées en suivant la rétention de composés hydrophobes sur des colonnes photogreffées C18. Les résultats présentés dans la « short communication » suivante intitulée « « Thiol-ene » photoclick chemistry as a rapid and localizable functionalization pathway for silica capillary monolithic columns » mettent en évidence des rétentions bien plus importantes avec la version « ene-thiol ». Cette approche a donc été retenue pour la suite des travaux. Les conditions de photogreffage, (nature et concentration des réactifs, photoinitiateurs, thiols, durée d'irradiation) ont ensuite été optimisées en suivant l'évolution de propriétés chromatographiques (rétention/sélectivité et efficacité). Il a été montré qu'une irradiation de 5 min avec une concentration en thiol de 0,8 M était suffisante pour obtenir des rétentions maximales. Les résultats démontrent également la possibilité d'obtenir des rétentions équivalentes en réalisant des irradiations successives avec des concentrations en thiol moins importantes ce qui est particulièrement intéressant dans le cas de réactifs onéreux et/ou disponibles en faibles concentrations. Enfin, les mesures d'efficacité (jusqu'à 160 000 ptx/m) et de perméabilité obtenues sur les colonnes photogreffées prouvent que les propriétés intrinsèques du monolithe ne sont pas altérées après le photogreffage par chimie click.



Short communication

“Thiol-ene” photoclick chemistry as a rapid and localizable functionalization pathway for silica capillary monolithic columns



A. Laaniste, A. Marechal*, R. El-Debs, J. Randon, V. Dugas, C. Demesmay

Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon I, Institut des Sciences Analytiques, UMR CNRS 5280, 5, rue de la DOUA, 69100 Villeurbanne, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 December 2013

Received in revised form 6 May 2014

Accepted 11 June 2014

Available online 19 June 2014

Keywords:

Silica monolithic columns

Photografting

Photoclick thiol-ene reaction

Surface functionalization

Nano-LC

ABSTRACT

Herein, we report the “ene-thiol” photografting of 1-octadecanethiol onto vinyl pre-functionalized silica monolith to prepare clicked reversed-phase silica monolithic columns with high permeability and performances. The experimental conditions (concentration of thiol in solution, irradiation duration) are optimized with respect to highest retention and methylene selectivity, i.e. to the highest surface coverage of the monolith. It is demonstrated that an irradiation duration of 5 min is enough with a 0.8 M concentration of 1-octadecanethiol in solution or that it may be replaced by successive irradiations at a lower ODT concentration (0.19 M) with renewing of the solution between the illuminations. Retention factors as high as those obtained with standard silanization are reached while keeping the intrinsic monolith permeability and efficiency (160,000 plates/m in nano-LC at 0.7 mm/s). The absence of polymerization, in the “ene-thiol” version, is demonstrated. Indeed, the steric selectivity of our clicked-material is characteristic of monolayer-like functionalized silica and significantly lower than the steric selectivity measured on polymeric-like functionalized silica.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The analysis of complex samples available in very small amounts has pushed forward the development of miniaturized separation systems. The unique properties of silica monoliths (bimodal porosity, great permeability, high specific surface area and high chromatographic efficiencies) make them the ideal candidates for miniaturized separation techniques. Moreover, they do not present the drawbacks of swelling and shrinking of their organic counterparts during exposure to different solvents and are therefore usable in the whole domain of organic/aqueous mobile phases. There are mainly two strategies to prepare silica monolithic capillaries. The more straightforward approach is the so-called “one-pot” sol-gel process, where the silica monoliths with the desired surface chemistry are obtained in one step, by mixing several silica precursors. This approach, leading to monoliths dedicated to all chromatographic modes has been recently reviewed [1]. However, the laborious and cumbersome re-optimization of the sol-gel composition mixture for each surface chemistry; in order, to obtain efficient chromatographic materials is the main limitation of this strategy.

The alternative and most commonly used approach for synthesizing silica monoliths with different surface chemistries consists in a multistep process in which a bare silica monolith is synthesized and subsequently grafted. Indeed, bare silica monolithic columns belong to the “generic” monolithic support class whose surface modification can be tuned with respect to the application. If thermally initiated surface modification processes (silanization as well as thermal polymerization of monomers onto the silica surface) allows reaching a great variety of surface chemistries they are time consuming and not localizable. Our recent work aims to develop strategies to facilitate the surface modification of miniaturized chromatographic columns inside silica capillary columns [2]. Our strategy relies on a photo-assisted chemical surface modification process of efficient monolithic capillary columns. A first approach published recently by our group [2,3] and the group of Svec [4] implements a photopolymerization process to anchor various moieties to generic silica monoliths. This process, leading to polymeric layers is rapid, simple, versatile and localizable compared to the previously reported thermal initiation pathway but the polymerization reaction may be strictly controlled in order to keep the intrinsic performances of the “generic” monolith that may be impaired. Herein, a photografting process based on the thiol-ene photoclick reaction is proposed to prepare monolayer-like functionalized silica monolithic columns. The reaction is triggered either by a H-abstraction or by free-radical reaction. Several recent reviews give an overview of the potential of this click reaction for

* Corresponding author. Tel.: +33 437423552.

E-mail address: audreymars@hotmail.fr (A. Marechal).

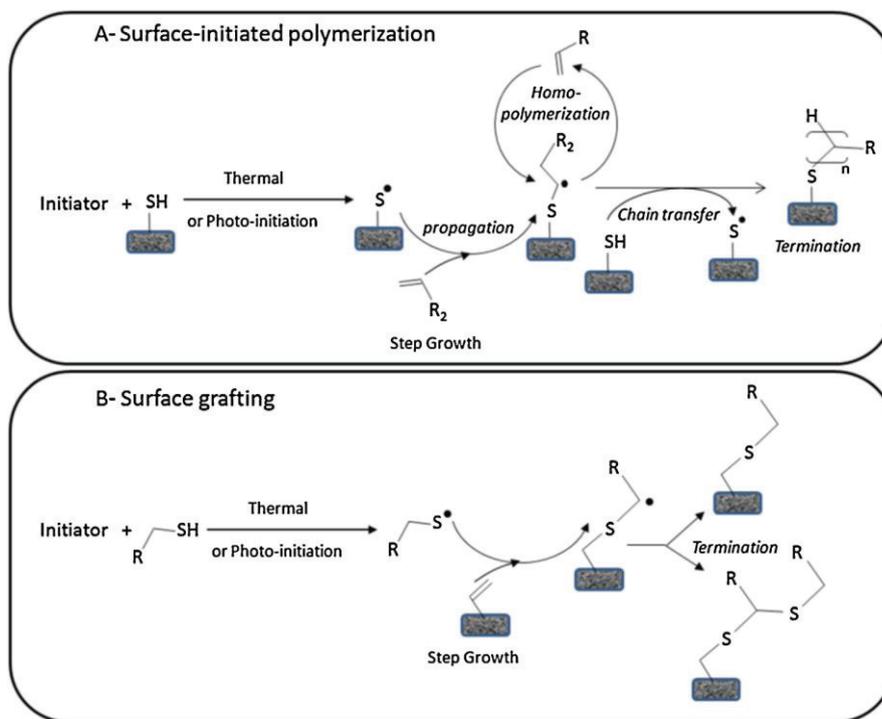


Fig. 1. Schematic representation of the thiol-ene (A) compared to ene-thiol (B) reaction mechanisms.

surface modification of stationary phases [5,6]. Although thiol-ene click reaction, has already been proposed for the elaboration of functionalized silica columns in its thermally initiated pathway [7–16], no photo-initiation attempt was already reported. Only few articles refer to a photo-initiated pathway on porous polymer monoliths [17–19]. In ref. [17], the reaction was realized under the “thiol-ene” version (here referred as thiol functionalized monolith reacting with alkene monomers in solution) and limited efficiencies (30,000 plates/m) were obtained. In the “thiol-ene” reaction (Fig. 1), the vinyl monomers may polymerize in solution and either further react with the thiol functions of the monolith, leading to loss of permeability [17]. Its “ene-thiol” alternative (here referred as vinyl functionalized silica and thiol functions in solution) may avoid such a polymerization and lead to a simple coupling of the thiol moiety with the vinyl one, i.e. to a monolayer-like functionalized surface. In addition, the “ene-thiol” version allows direct immobilization of biomolecules (enzymes, proteins, antibodies).

Such “ene-thiol” approach has been investigated on porous organic stationary phases [19]. Reaction times up to 4 h were required, using high concentrations of initiator (0.1 M or 10 wt%) and quasi-pure thiol monomers. Moreover, the efficiencies of these C18 modified organic monolithic columns ranged between 50,000 and 85,000 N/m in CEC mode and the retention factors reached were quite low ($k=0.5$ for hexylbenzene in a 70/30 acetonitrile/water mobile phase).

Herein, we report the photografting of 1-octadecanethiol onto vinyl pre-functionalized silica monolith to prepare silica-based reversed-phase monolithic columns with high permeability and performances. The chromatographic characterization is done by nano-LC before and after photo-grafting and therefore allows evaluating the influence of the grafting process on the overall column efficiency. The concentration of 1-octadecanethiol as well as the irradiation duration are optimized with respect to retention and methylene selectivity properties and the influence

of the grafting on permeability and efficiency is evaluated. At last, the steric selectivity is compared to the one obtained with monomeric/polymeric-like surface modifications to verify if this “ene-thiol” version of the click reaction leads to monolayer-like functionalized silica as assumed.

2. Experimental

2.1. Reagents and chemicals

All the reagents used were of analytical grade. Tetramethoxysilane (TMOS), methyltrimethoxysilane (MTMS), urea, PEG ($M_n=10,000$), benzophenone (BP), triethylamine (TEA), methanol (HPLC grade), thiourea, vinyltrimethoxysilane (VTMS), 1-octadecanethiol (ODT), naphthalene were purchased from Sigma-Aldrich (France). Acetonitrile (ACN) (HPLC grade) was purchased from VWR. Acetic acid was from Riedel-de Haënn (Germany). Tetrahydrofuran (THF) was from Rathburn (UK). Propylbenzene, pentylbenzene, phenylheptane, and octylbenzene were purchased from Fluka (Switzerland). Hexylbenzene was from Alfa-Aesar (France). All aqueous solutions were prepared using >18 MDI water (Millipore, Molsheim, France). PTFE-coated fused-silica capillaries (TSU 75 μm i.d.) were purchased from Polymicro Technologies (USA).

2.2. Preparation of vinyl pre-functionalized silica supports

2.2.1. Synthesis of silica monolith

The preparation conditions of silica monolithic columns were similar to those reported by Hara et al. [20]. Monolithic silica capillary columns were prepared from a mixture of TMOS/MTMS (85:15; v/v). A total of 18 mL of this mixture was added to 40 mL acetic acid (0.01 M) containing 1.9 g PEG and 4.05 g urea and stirred at 0 °C for 30 min. Then the temperature was raised up to 40 °C and the

mixture was stirred for 10 min before it was charged into fused-silica capillaries. Filling steps of capillary columns were carried under nitrogen (N_2) pressure using a Nanobaume system (CIL-Cluzeau Info Labo SA). After that, the filled and blocked capillaries were kept at 40 °C overnight for gelification and aging. Then, the temperature was raised slowly up to 120 °C and maintained at this temperature for 4 additional hours to form mesopores with the ammonia generated by the hydrolysis of urea. The monolithic silica columns then cooled and washed with methanol. Morphological characterization of the monoliths was done using a JEOL nanoscope JCM 5000 (Japan) scanning electron microscope after a gold coating of the samples. The hydrodynamic permeability was determined using Darcy's law and naphthalene or thiourea as t_0 markers for bare silica in the HILIC mode (95/5 acetonitrile/water mobile phase) and C18 clicked phase in the reversed phase mode, respectively.

2.2.2. Vinyl pre-functionalization

Prior to surface modification by photo-click chemistry, silica monoliths were prefunctionalized with vinyltrimethoxysilane (VTMS) to anchor vinyl moieties onto the surface by covalent bonding. The silanization solution was composed of VTMS (5%, v/v), (triethylamine) (2.5%, v/v), in a MeOH/Water (95/5%, v/v) mixture. Silanization was performed at 80 °C during 6 h under hydrodynamic flow. The optimum silanization conditions (those leading to the highest surface density of vinyl groups) were adapted from a previous study [3], in which the influence of several solvents, catalysts, temperatures and reaction time were studied. After silanization, monoliths were thoroughly rinsed with MeOH. No alteration of the permeability was noticed after this step.

2.3. "Ene-thiol" photo-click functionalization of monoliths

The vinyl pre-functionalized silica support was filled with the grafting mixture containing the initiator (benzophenone) (0.0125 M), the functional reagent 1-octadecanethiol (ODT) at concentrations ranging from 0.19 to 1.19 M in THF as solvent. Then, the tips of the capillary were plugged with rubber and the capillary was put into UV-crosslinker for various irradiation durations ranging from 10 to 30 min, at 365 nm and then washed extensively with THF. In some cases, several successive graftings were implemented with renewing the grafting solution between each irradiation step.

2.4. Instrumentation

CE experiments were carried out with an Agilent HP3D CE system (Waldbronn, Germany) equipped with a diode array detector and an external pressure device allowing to work up to 12 bar. No voltage was applied. The external pressurization device was used to move the mobile phase, to inject solutes directly "on-column", and the detection was achieved through the monolith.

The control of the electrophoresis system and the data acquisition were carried out by the Chemstation system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). The illumination system used for photo-click reaction was a BioLink cross linker (VWR International, Strasbourg, France) equipped with five 8 W UV tubes emitting at 365 nm. An LC pump (Shimadzu LC 10AD, Tokyo, Japan) was used to rinse the capillaries after their synthesis and functionalization. A Nanobaume system (CIL-Cluzeau Info Labo SA) was used to fill the capillaries with the different mixtures under nitrogen pressure.

3. Results and discussion

Firstly, the influence of two parameters (time of irradiation, concentration of 1-octadecane thiol (ODT)) has been evaluated in order

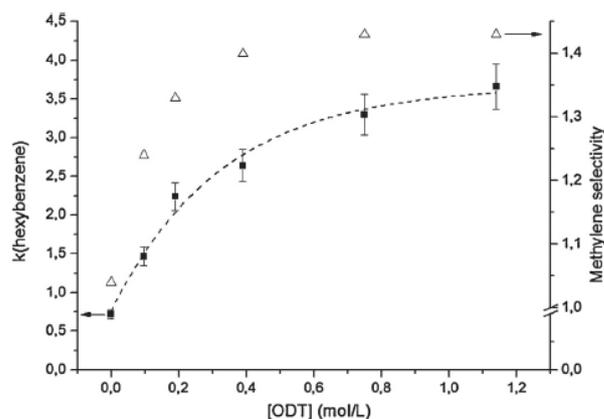


Fig. 2. Retention factor of hexylbenzene and methylene selectivity measured in 80/20 (ACN/water) mobile phase for ODT photografted columns prepared with increasing ODT concentration in the grafting reaction mixture. Other grafting conditions: benzophenone 0.25% (w/v), solvent THF, 30 min irradiation @365 nm.

to optimize the photo-click reaction of ODT on the vinyl activated silica monoliths. For this set of experiments, a unique long monolithic column was synthesized, vinyl pre-functionalized according to a previously optimized silanization protocol [3] and cut into several pieces (of about 12 cm) before the photoclick reaction, in order to allow a direct comparison of the clicked columns among themselves and to eliminate any bias due to the monolith synthesis or to its silanization. Starting monolithic bare silica columns (skeleton size $1.2 \pm 0.1 \mu\text{m}$ and macropores $1.5 \pm 0.2 \mu\text{m}$) exhibit high efficiency (measured in HILIC mode), with minimal plate heights of $6.0 \mu\text{m} \pm 0.5 \mu\text{m}$ (inter-capillary standard deviation, $n=6$) and relatively high permeability values ($4.6 \pm 1.1 \times 10^{-14} \text{m}^2$).

Benzophenone was chosen as photoinitiator for its high efficiency as hydrogen abstractor under illumination [21,22]. Its concentration was set at a fixed value (0.25%, w/v) which corresponds to an average value of the literature [23–25]. The irradiation intensity was not a tunable parameter with the UV-cross-linker used throughout this study and the power of illumination of the cross-linker was fixed (2.96mW/cm^2 at 365 nm) and only the duration of the irradiation was adjustable. The ODT concentration in the grafting mixture was varied from 0.19 to 1.14 M. The obtained photo-clicked columns have been characterized by nano-LC in reversed-phase mode for the separation of a set of alkylbenzenes. Retention factors values can be used to compare the surface coverage of the stationary phase which is supposed to directly correlate with them if a single coupling between thiol and ene function occurs as stated.

Fig. 2 illustrates the influence of the ODT concentration on the retention factors of hexylbenzene, for a fixed irradiation time of 30 min. As can be seen, retention factors increase with ODT concentration and reach a plateau for approximately 0.75 M with a retention factor higher than 3 for hexylbenzene. The high ODT concentration value required to reach the highest surface coverage is in good agreement with the estimated amount of ODT required for a complete conversion of the vinyl functions. Indeed, assuming a specific surface area of about $300 \text{m}^2/\text{g}$ [26], a density of silica monolith of about 0.7g cm^{-3} (evaluated experimentally by weighing a monolith synthesized in batch mode), an estimated average density of accessible vinyl functions of at least $3\text{--}4 \mu\text{mol m}^{-2}$ after silanization [27], the complete conversion of vinyl moieties of a monolith 10 cm in length and $75 \mu\text{m}$ in internal diameter should require an ODT concentration of approximately 0.6–0.8 M (the grafting solution volume being limited to the void volume of the column about, i.e. 400 nL). The methylene selectivity measured with

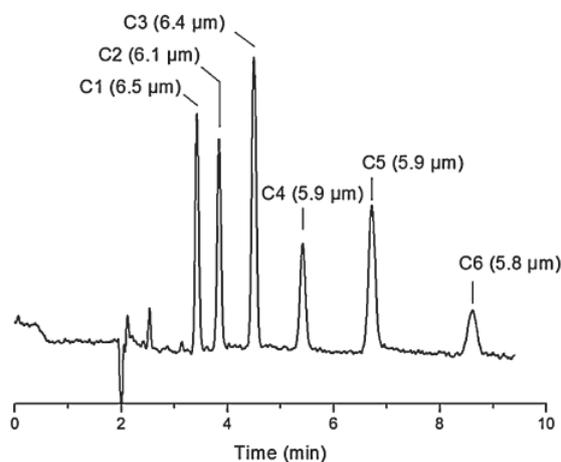


Fig. 3. Chromatogram obtained for alkylbenzenes on an ODT photografted silica monolithic column (concentration of ODT = 0.75 M, irradiation time = 10 min @ 365 nm). Detection at 214 nm. Capillary length = 10 cm, length to detector = 8.5 cm, i.d. = 75 μm , 80% ACN aqueous mobile phase, 180 nL/min. Temperature 25 °C. Peak identification: C1, toluene; C2, ethylbenzene; C3, propylbenzene; C4, butylbenzene; C5, amylbenzene; C6, hexylbenzene; H values are given in brackets.

pentylbenzene and hexylbenzene (Fig. 2) follows the same trend, as it increases before reaching a plateau at a maximum value of 1.42.

The retention factor reached for hexylbenzene ($k = 3.6 \pm 0.2$ with a 80/20 acetonitrile/water mobile phase) indicates that the grafting density achieved with photo-click chemistry is at least as high as the grafting obtained according to the classical ODS silanization [3] with the advantage of being rapid and localizable. The process is less time consuming and leads to retention factors largely higher than those ($k = 0.5$ with a 70/30 acetonitrile/water mobile phase) obtained after the photochemical process on porous organic monoliths.

For the following experiments, the influence of the irradiation duration was decreased down to 5 min for a fixed concentration of ODT at 0.8 M (a non-limiting concentration as determined in the previous experiment set). No significant variation of the retention factor nor of the methylene selectivity were observed, thus demonstrating the speed of the photo-click reaction. As high concentrations of ODT or of thiyl radicals obtained after H abstraction may favor their combination into dimers in solution (by creation of a disulfide bonds), it was intended to decrease this concentration down to 0.19 M and to renew the solution, between short successive illumination steps. Five successive illuminations of 5 min with the renewing of the 0.19 M ODT solution between each irradiation step were implemented. The retention factor obtained for hexylbenzene as well as the methylene selectivity do not vary significantly ($k(\text{hexylbenzene}) = 3.6 \pm 0.2$ (inter-capillary standard deviation ($n = 3$)) and $\alpha(\text{CH}_2) = 1.42 \pm 0.01$), thus indicating that disulfide bond formation between thiols or thiyl radicals is not an issue in the process. This result also indicates that the same grafting density may be reached in various conditions, provided that the total amount of thiol monomers irradiated (in one or several steps) is high enough. This may be a key feature, when only diluted thiol solutions are available (in the case of thiolated biological molecules, for example).

Moreover, it is worth noticing that, whatever the grafting, the permeability and the efficiency of the monolithic columns were not altered, i.e. that the photo-click functionalization allows keeping the intrinsic properties of the silica monoliths. In the best photo-click reaction conditions (Fig. 3), i.e. those leading to the highest

surface coverage (highest retention and methylene selectivity), the value of H_{min} (minimal theoretical plate height measured at the optimal velocity of the mobile phase) is $6.1 \pm 0.3 \mu\text{m}$ (corresponding to approximately 160,000 plates/m) and the permeability value is $4.7 \times 10^{-14} \pm 0.5 \text{ m}^2$. It confirms the starting hypothesis that no polymerization occurs in the “ene-thiol” version of click functionalization, as usually observed when polymerization occurs [17]. The conservation of the chromatographic efficiency through the photografting process is a straightforward evidence that the photografted column is homogeneous (radial and longitudinal homogeneity). There is no shadow or shielding effect of the 365 nm light irradiation inside the silica monolith. In addition, the process avoids the mentioned problem of longitudinal gradient surface density encountered with in-situ silanization [28].

The steric (shape) selectivity ($k_{\text{Triphenylene}}/k_{\text{O-Terphenyl}}$) is another criterion used in the Tanaka Test [29] to assess the polymeric/monomeric nature of the grafting because of the similar hydrophobic properties but different planarity of triphenylene and o-terphenyl: polymeric grafting usually leads to an increased shape selectivity. The steric selectivity value measured with a 80/20 (v/v) (methanol/water) mobile phase ($\alpha_{\text{T/O}} = 1.49$) is comparable to the value measured on the same monolith grafted with the C18 ODS silane ($\alpha_{\text{T/O}} = 1.50$) and significantly lower than the selectivity reported after polymerization of alkylacrylate monomers onto the silica surface ($1.94 < \alpha_{\text{T/O}} < 2.58$) [30], thus confirming once again the monolayer grafting.

4. Conclusion

This short communication demonstrates that the photo-click “ene-thiol” reaction implemented with 1 octadecanethiol on a silica-based vinyl pre-functionalized monolith, allows reaching retention as high as those obtained with a classical silanization, in less than five minutes while keeping the intrinsic efficiency ($N = 160,000$ plates/m) of the monolith. It is also demonstrated that click-reaction conditions are not critical to reach the highest surface coverage (highest retention), provided that the total amount of thiol monomers irradiated (in one or several steps) is high enough. This may be a key feature, when only diluted thiol solutions are available (in the case of thiolated biological molecules, for example).

The absence of polymerization is confirmed by the steric selectivity value, close to the selectivity measured on monolayer-like stationary phases. The versatility of this approach is under study.

The implementation of this click reaction to hybrid vinyl monoliths, the synthesis of which has already been reported [31,10], opens the field to the rapid and localizable surface modification of silica monoliths and to their use in multimodal separation systems.

References

- [1] I. Ou, H. Lin, Z. Zhang, G. Huang, J. Dong, H. Zou, Recent advances in preparation and application of hybrid organic-silica monolithic capillary columns, *Electrophoresis* 34 (2013) 126–140.
- [2] R. El-Debs, A. Marechal, V. Dugas, C. Demesmay, Photopolymerization of acrylamide as a new functionalization way of silica monoliths for hydrophilic interaction chromatography and coated silica capillaries for capillary electrophoresis, *J Chromatogr A* 1326 (2014) 89–95.
- [3] R. El-Debs, V. Dugas, C. Demesmay, Photografting as a versatile, localizable, and single-step surface functionalization of silica-based monoliths dedicated to microscale separation techniques, *J Sep. Sci.* 36 (2013) 993–1001.
- [4] Z. Zajickova, I. Luna, F. Svec, Surface modification of silica-based monolith with poly(pentadecanopropyl methacrylate) using single step photografting, *J Liquid Chromatogr* 33 (2010) 1640–1648.
- [5] A. Marechal, R. El-Debs, V. Dugas, C. Demesmay, Is click chemistry attractive for separation sciences? *J Sep Sci* 36 (2013) 2049–2062.
- [6] C. Chu, R. Liu, Application of click chemistry on preparation of separation materials for liquid chromatography, *Chem Soc Rev* 40 (2011) 2177–2188.
- [7] A. Shen, Z. Guo, L. Yu, L. Cao, X. Liang, A novel zwitterionic HILIC stationary phase based on “thiol-ene” click chemistry between cysteine and vinyl silica, *Chem Comm* 47 (2011) 4550–4552.

- [8] Y. Chen, M. Wu, K. Wang, B. Chen, S. Yao, H. Zou, L. Nie, Vinyl functionalized silica hybrid monolith-based trypsin microreactor for on line digestion and separation via thiol-ene "click" strategy, *J Chromatogr A* 1218 (2011) 7982–7988.
- [9] A.-M.K. Weed, J. Dvornik, J.J. Stefancin, A.A. Gyapong, F. Svec, Z. Zajickova, Photopolymerized organo-silica hybrid monolithic columns: Characterization of their performance in capillary liquid chromatography, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 270–278.
- [10] K. Wang, Y. Chen, H. Yang, Y. Li, L. Nie, S. Yao, Modification of VTMS hybrid monolith via thiol-ene click chemistry for capillary electrochromatography, *Talanta* 91 (2012) 52–59.
- [11] M.-L. Chen, J. Zhang, Z. Zhang, B.-F. Yuan, Q.-W. Yu, Y.-Q. Feng, Facile preparation of organic-silica hybrid monolith for capillary hydrophilic liquid chromatography based on "thiol-ene" click chemistry, *J Chromatogr A* 1284 (2013) 118–125.
- [12] L. Qiao, A. Dou, X. Shi, H. Li, Y. Shan, X. Lu, G. Xu, Development and evaluation of new imidazolium-based zwitterionic stationary phases for hydrophilic interaction chromatography, *J Chromatogr A* 1286 (2013) 137–145.
- [13] A. Shen, X. Li, X. Dong, J. Wei, Z. Guo, X. Liang, Glutathione-based zwitterionic stationary phase for hydrophilic interaction/cation-exchange mixed-mode chromatography, *J Chromatogr A* 1314 (2013) 63–69.
- [14] Y. Liu, Y. Chen, H. Yang, L. Nie, S. Yao, Cage-like silica nanoparticles-functionalized silica hybrid monolith for high performance capillary electrochromatography via "one-pot" process, *J Chromatogr A* 1283 (2013) 132–139.
- [15] X.T. Peng, T. Liu, S.X. Ji, Y.Q. Feng, Preparation of a novel carboxyl stationary phase by "thiol-ene" click chemistry for hydrophilic interaction chromatography, *J Sep Sci* 36 (2013) 2571–2577.
- [16] H. Yang, Y. Chen, Y. Liu, L. Nie, S. Yao, One-pot synthesis of (3-sulfopropyl methacrylate potassium)-silica hybrid monolith via thiol-ene click chemistry for CEC, *Electrophoresis* 34 (2013) 510–517.
- [17] Y. Lv, Z. Lin, F. Svec, "Thiol-ene" click chemistry: a facile and versatile route for the functionalization of porous polymer monoliths, *The Analyst* 137 (2012) 4114–4118.
- [18] T.T.H. Dao, M. Guerrouache, B. Carbonnier, J. Chin, Thiol-yne Click Adamantane Monolithic Stationary Phase for Capillary Electrochromatography, *Chem.* 30 (2012) 2281–2284.
- [19] I. Tijunelyte, J. Babinot, M. Guerrouache, G. Valincius, B. Carbonnier, Hydrophilic monolith with ethylene glycol-based grafts prepared via surface confined thiol-ene click photoaddition, *Polymer* 53 (2012) 29–36.
- [20] T. Hara, S. Makino, Y. Watanabe, T. Ikegami, K. Cabrera, B. Smarsly, N. Tanaka, The performance of hybrid monolithic silica capillary columns prepared by changing feed ratios of tetramethoxysilane and methyltrimethoxysilane, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 89–98.
- [21] O. Robert, Kan, in: *Organic Photochemistry*, McGraw-Hill, New York, 1966.
- [22] J. Deng, L. Wang, L. Liu, W. Yang, Developments and new applications of UV-induced surface graft polymerizations, *Prog. Polym. Sci.* 34 (2009) 156–193.
- [23] Y. Ladner, A. Bruchet, G. Cretier, V. Dugas, J. Randon, K. Faure, New "one-step" method for the simultaneous synthesis and anchoring of organic monolith inside COC microchip channels, *Lab Chip* 12 (2012) 1680–1685.
- [24] Q. Pu, O. Oyesanya, B. Thompson, S. Liu, J.C. Alvarez, On-Chip Micropatterning of Plastic (Cyclic Olefin Copolymer, COC) Microfluidic Channels for the Fabrication of Biomolecule Microarrays Using Photografting Methods, *Langmuir* 23 (2006) 1577–1583.
- [25] T. Rohr, D.F. Ogletree, F. Svec, J.M.J. Fréchet, Surface Functionalization of Thermoplastic Polymers for the Fabrication of Microfluidic Devices by Photoinitiated Grafting, *Adv. Funct. Mater.* 13 (2003) 264–270.
- [26] G. Puy, R. Roux, C. Demesmay, J.L. Rocca, J. Iapichella, A. Galarneau, D. Brunel, Influence of the hydrothermal treatment on the chromatographic properties of monolithic silica capillaries for nano-liquid chromatography or capillary electrochromatography, *J Chromatogr A* 1160 (2007) 150–159.
- [27] V. Dugas, Y. Chevalier, J. Surface hydroxylation and silane grafting on fumed and thermal silica, *Colloid Interface Sci.* 264 (2003) 354–361.
- [28] A. Soliven, G.R. Dennis, G. Guiochon, E.F. Hilder, P.R. Haddad, R.A. Shalliker, Cyano bonded silica monolith—Development of an in situ modification method for analytical scale columns, *J Chromatogr A* 1217 (2010) 6085–6091.
- [29] K. Kimata, K. Iwaguchi, S. Onishi, K. Jinno, R. Eksteen, K. Hosoya, M. Araki, N. Tanaka, Chromatographic Characterization of Silica C18 Packing Materials. Correlation between a Preparation Method and Retention Behavior of Stationary Phase, *Journal of Chromatographic Science* 27 (1989) 721–728.
- [30] O. Nunez, T. Ikegami, W. Kajiwara, K. Miyamoto, K. Horie, N. Tanaka, Preparation of high efficiency and highly retentive monolithic silica capillary columns for reversed-phase chromatography by chemical modification by polymerization of octadecyl methacrylate, *J Chromatogr A* 1156 (2007) 35–44.
- [31] A. Itagaki, K. Nakanishi, K. Hirao, J. Sol-Gel, Phase Separation in Sol-Gel System Containing Mixture of 3- and 4-Functional Alkoxysilanes, *Sci. Technol.* 26 (2003) 153–156.

I.3 Polyvalence de la « ene-thiol » photoclick chemistry pour la fonctionnalisation de monolithes de silice

L'article suivant intitulé « Versatile ene-thiol photoclick reaction for preparation of multimodal monolithic silica capillary columns » met en évidence la polyvalence du photogreffage par le greffage de différents réactifs thiolés pour couvrir plusieurs modes chromatographiques : l'octadécane-thiol pour la phase inverse, la cystéine pour le mode HILIC ou encore le mercaptoéthanesulfonate de sodium pour l'échange d'ions. Il a été vérifié que la concentration en thiol optimale (0,8 M) pour accéder à la plus grande densité de greffage est identique quelle que soit la nature du thiol utilisé. Ainsi, dans le cas d'un changement de monomère, seul le solvant et l'initiateur doivent être adaptés en fonction de leur solubilité dans le solvant du monomère. La deuxième partie de l'article démontre l'intérêt de cette approche photochimique pour la préparation de colonnes capillaire monolithiques multimodales par greffages successifs et localisés de différents réactifs thiolés. Des exemples d'applications (preuves de concept) de colonnes multimodales comprenant un segment d'échange de cations en amont d'un segment greffé C18 sont présentés pour le fractionnement et la séparation sélective de cations et de composés neutres ainsi que pour la préconcentration et la séparation en ligne de β -bloquants.



Versatile ene-thiol photoclick reaction for preparation of multimodal monolithic silica capillary columns

A. Marechal¹, A. Laaniste¹, R. El-Debs¹, V. Dugas¹, C. Demesmay^{*,1}

Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon I, Institut des Sciences Analytiques, UMR CNRS 5280, 5, rue de la DOUA, 69100 Villeurbanne, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 July 2014

Received in revised form 1 September 2014

Accepted 7 September 2014

Available online 16 September 2014

Keywords:

Silica monolithic columns

Photografting

Biphasic capillary column

SCX

HILIC

Multimodal chromatography

ABSTRACT

This paper presents a photografting process of monolithic silica capillary columns based on the ene-thiol click chemistry. This study is performed on a “generic” vinyl-functionalized silica monolith ($H_{\min} 6 \pm 1 \mu\text{m}$). The photoclick reaction is investigated using different thiol monomers (octadecanethiol, cysteine and sodium mercaptoethanesulfonate) to prepare capillary columns dedicated to various chromatographic modes (reversed-phase, HILIC and strong cation exchange). Whatever the monomer used, the photografting reaction is achieved in less than 5 min with a relatively high thiol monomer content. This allows preparing highly retentive and efficient monolithic columns while avoiding polymerization and/or column clogging. In addition to the aforementioned properties (duration, versatility, efficiency), this photo-triggered chemical reaction allows addressing several appropriate surface functionalizations inside a single monolithic column in order to prepare nanovolume multimodal capillary columns. A multimodal biphasic monolithic column with a 1 cm length cation-exchange segment followed by a 9 cm length reversed-phase segment (SCX-RP) is prepared through two successive photografting reactions using a UV-mask to localize the reactions. This multimodal biphasic column is investigated using a model sample for the selective fractionation and separation of cationic and neutral compounds and is applied to the on-line preconcentration and separation of β -blockers.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The functionalization of silica monoliths in tiny capillary tubing is not a trivial task. Although silanization is the “gold” standard procedure to chemically modify silica stationary phases, this approach is not suitable for the preparation of multimodal chromatographic capillary columns (MCC) with several sequential zones of different surface chemistries. Multimodal chromatography, with so called biphasic (or even multiphasic) columns, is mainly devoted to the analysis of complex biological samples and its use in miniaturized systems (capillary columns for example) is challenging for detection limits and sample volume concerns. It has found applications for the analysis of small molecules as reviewed recently by Mansour [1] as well as in proteomics. For example, several articles highlight the potential of MCC for shotgun analysis in a so-called MudPIT (Multi Dimensional Protein Identification Technology) approach [2–5]. If MudPIT with packed columns has already been proven robust for the resolution of complex mixtures of

peptides, improvements in the resolution are always desirable to provide increased protein coverage. As reported by the group of Yates, such improvements could be achieved, with UltraHigh Pressure MudPIT (UHP-MudPIT) [6], by increasing the length of the C18 segment and reducing the particle size of the resin used. The main limitation to the development of such long sequential multimodal silica capillary columns (MCC) is due to the way of preparing miniaturized analytical systems integrating several zones of different surface chemistries. For example, packing different successive beds of functionalized silica particles in capillary tubing is cumbersome and labour-intensive although it has been already successfully implemented for the MudPIT approach. In addition, a lower permeability is obtained with sub- $3 \mu\text{m}$ silica particles (usually used in the reversed phase segment) compared to the one obtained with monolithic beds, which limits the capillary length i.e. the maximal efficiency attainable for the reversed phase separation consecutive to the ion-exchange fractionation. In addition, these assemblies require frits that are usually source of undesirable adsorption as well as flow inhomogeneities. On the other hand, silica monoliths are easily *in-situ* synthesized in capillary. However, the synthesis of different silica monolithic segments is difficult to control for mass production purpose. Recent works based on photochemical processes have been implemented in order to address this

* Corresponding author. Tel.: +33 0 437423552.

E-mail address: vincent.dugas@univ-lyon1.fr (V. Dugas).

¹ Tel.: +33 0 437423552.

issue with varying degrees of success [7–10]. These strategies use well-known free radical polymerization reactions of acrylate-based monomers initiated by UV-irradiation. These photopolymerization processes are rapid, efficient and versatile due to the wide variety of commercially available functional monomers. The chromatographic performances of these columns are quite satisfactory in terms of retention, but sometimes disappointing in terms of efficiency. Indeed, when the polymerization process is not properly controlled it may lead to the growth of thick layers and losses of efficiency when mesopores are sterically hindered [7]. It can also lead to column clogging when polymerization affects macropores [8].

In order to avoid this drawback while taking advantage of the rapid, simple and versatile nature of photochemical reactions, a photografting (and not photopolymerization) process is investigated. This functionalization pathway is based on the ene-thiol photoclick reaction. Compared to the free radical polymerization (Fig. 1) the photo-click reaction takes advantage of the site specific activation of thiol monomers in solution by an H-abstracting photoinitiator. The thyl radical attacks the vinyl group tethered to the silica surface leading to a stable thioether link. Because one vinyl group is only able to react with two thiol monomers, this reaction is considered as a grafting reaction and not as a polymerization one. We have already investigated the elaboration of functionalized silica monolithic columns using commercially available octadecanethiol (C18) [11]. The as-synthesized C18 photoclicked monolithic columns present slightly higher retention properties than standard ODS monolithic columns [9]. These retention properties are close to those achieved after the polymerization or photopolymerization of lauryl acrylate onto methacrylate functionalized silica monoliths [9,12], such polymerization processes being intended to lead to highly retentive stationary phases [12].

The retentive properties of the ODT photoclicked columns can be attributed to dense layers. In addition, the value of steric selectivity (*o*-terphenyl/triphenylene selectivity) [13] is similar to the one measured for ODS columns. It confirms the monolayer like structure of the photografted layer, while photopolymerized layers behave differently due to the 3D-network of the polymerized layer. It was also demonstrated that the kinetic performances of the starting silica material was maintained after the functionalization process which avoided any clogging of mesopores.

Herein, we investigate the photografting of different commercial thiol monomers. Although the ene-thiol click reaction approach has been already reported for the functionalization of silica, the process involved is time consuming and not localizable [10,14–20]. The grafting of cysteine and sodium mercaptoethanesulfonate (SMES) onto a vinyl activated silica monolith is followed and characterized in hydrophilic interaction (HILIC) and strong cation exchange (SCX) chromatography respectively. Retention factors, selectivities and ion-exchange capacities are compared with the values reported in the literature for silica monoliths modified either with the classical silanization pathway or with polymerization. It is also verified that the kinetic performances of the starting silica materials are maintained, thus confirming that the functionalization process avoids clogging of the mesopores. To illustrate the benefit of the presented photochemical approach at the capillary format, multimodal biphasic (SCX-RPLC) chromatographic capillary columns are prepared. Their potential is illustrated through two examples of applications: (i) the selective fractionation and separation of neutral and charged model solutes, (ii) the preconcentration of cationic β -blockers in cation exchange mode followed by their separation by reversed-phase chromatography.

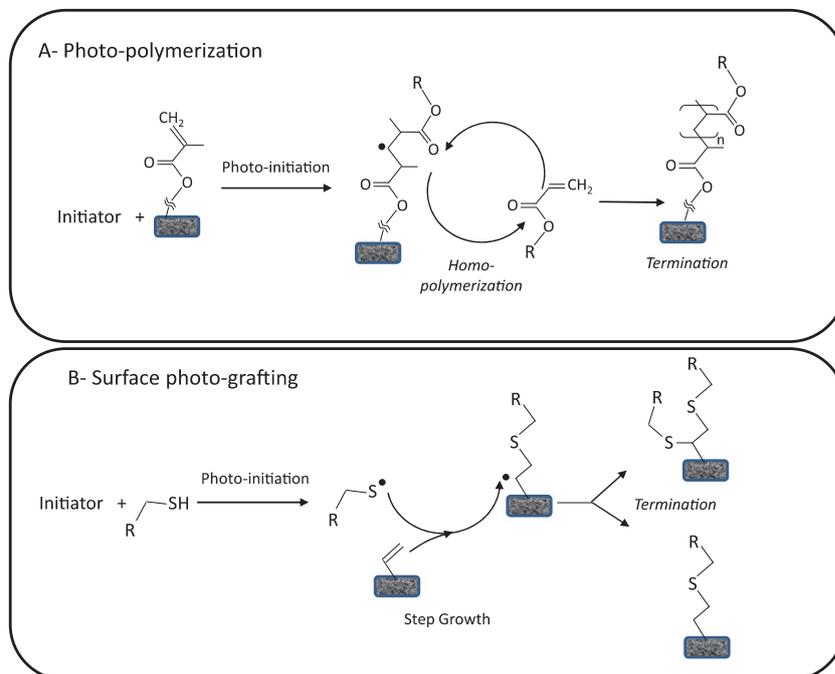


Fig. 1. Schematic representation of the photopolymerization and photografting processes. Photopolymerization is based on the free radical polymerization of acrylate and methacrylate monomers. It should be noticed that the same reaction occurs between monomers in solution leading to the formation of polymers in solution responsible for an increase of its viscosity. At the opposite, photografting is based on the selective activation of thiol monomers in solution which react with vinyl groups tethered to the surface of the silica monolith. This process leads only to dimers in solution if two thyl radicals react together. The substituent R is chosen to bring the desired surface retention properties (i.e. C12 or C18 alkyl chains, zwitterionic or charged groups).

2. Materials and methods

2.1. Reagents and chemicals

All the reagents used were of analytical grade. Tetramethoxysilane (TMOS), methytrimethoxysilane (MTMS), urea, PEG (Mn = 10 000), triethylamine (TEA), methanol (HPLC grade), thiourea, vinyltrimethoxysilane (VTMS), 1-octadecanethiol (ODT), cysteine, sodium 2-mercaptoethanesulfonate (SMES), benzophenone, caffeine, 7-(β -hydroxypropyl)theophylline, benzene, toluene, nadolol, oxpranolol, propranolol, uracil, adenosine, cytosine, cytidine and naphthalene were purchased from Sigma–Aldrich (France). Acetonitrile (ACN) (HPLC grade) was purchased from VWR. Acetic acid was from Riedel-de Haënn (Germany). All aqueous solutions were prepared using $>18\text{ M}\Omega\text{-cm}$ water (Millipore, Molsheim, France). PTFE-coated fused-silica capillaries (TSU deep-UV Transparent Coating $75\ \mu\text{m}$ i.d.) were purchased from Polymicro Technologies (USA).

2.2. Preparation of vinyl pre-functionalized silica supports

2.2.1. Synthesis of silica monoliths

The preparation conditions of silica monolithic columns were similar to those reported by Hara et al. [21]. Monolithic silica capillary columns were prepared from a mixture of TMOS/MTMS (85/15; v/v). A total of 18 mL of this mixture was added to 40 mL acetic acid (0.01 M) containing 1.9 g PEG and 4.05 g urea and stirred at 0°C for 30 min. Then the temperature was raised up to 40°C and the mixture was stirred for 10 min before it was charged into fused-silica capillaries. Filling steps of capillary columns were carried under nitrogen (N_2) pressure using a Nanobaume system (CIL-Cluzeau Info Labo SA). After that, the filled and blocked capillaries were kept at 40°C overnight for gelification and aging. Then, the temperature was raised slowly up to 120°C and maintained at this temperature for 4 additional hours to form mesopores with the ammonia generated by the hydrolysis of urea. The monolithic silica columns were then cooled and washed with methanol. The hydrodynamic permeability was determined using Darcy's law and naphthalene or thiourea as t_0 markers for bare silica in the HILIC mode (95/5 acetonitrile/water mobile phase) and C18 clicked phase in the reversed-phase mode respectively.

2.2.2. Vinyl pre-functionalization

Prior to surface modification by photo-click chemistry, silica monoliths were prefunctionalized with vinyltrimethoxysilane (VTMS) to anchor vinyl moieties onto the surface by covalent bonding. The silanization solution was composed of VTMS (5%, v/v), triethylamine (2.5%, v/v), in a (95/5, v/v MeOH/Water) mixture. Silanization was performed at 80°C during 6 h under hydrodynamic flow. After silanization, monoliths were thoroughly rinsed with MeOH.

2.3. "Ene-thiol" photo-click functionalization of monoliths

For reversed-phase capillary columns, the vinyl pre-functionalized silica column was filled with the grafting mixture containing the initiator (benzophenone) (0.0125 M), the functional reagent 1-octadecanethiol (ODT) at a concentration of 1.08 M, in THF as solvent. Then, the tips of the capillary were plugged with rubber and the capillary was put into an UV-crosslinker for a 5 min irradiation duration, at 365 nm and the column was then washed extensively with THF.

For the preparation of HILIC capillary columns, the silanized monolith was grafted with cysteine. As cysteine is soluble in water, 2,2'-azobis(2-methylpropionamide)dihydrochloride (AIBA) was used as initiator. The grafting mixture consisted of the appropriate

mass of cysteine (different amounts have been tested ranging from 13.2 mg to 132 mg corresponding to final concentrations ranging from 0.1 M to 1 M and 3 mg of AIBA in 1 mL of water. The vinyl pre-functionalized monolithic capillary (previously washed with water for at least 30 min) was flushed for 10 min with the grafting mixture and then irradiated at 365 nm for 5 min. After, the capillary was washed for over 30 min with water and subsequently tested.

Cation-exchange columns were grafted with sodium 2-mercaptoethanesulfonate (SMES). The grafting mixture and grafting conditions were identical to those used for the preparation of HILIC columns, with cysteine being replaced by SMES in the grafting mixture.

2.3.1. Preparation of the SCX-RP biphasic monolithic capillary column

The vinyl pre-functionalized silica monolith was first end-capped in gas phase with pure hexamethyldisilazane at 160°C for 2 h. Localization of the photochemical reactions was carried out by masking a part of the capillary with peek tubing as UV mask. A 1 cm length SCX segment was first photografted at the inlet of the column. The capillary was successively washed with water and THF before being filled with the second grafting mixture (ODT). After the second photografting step the multimodal biphasic capillary column was washed for 30 min with THF.

2.3.2. Determination of the cation-exchange capacity

The IEC (ion-exchange capacity) was determined by measuring the breakthrough curves of potassium chloride using a contactless conductivity detection (TraceDec, Austria).

2.4. Instrumentation

Nano-LC experiments were carried out with an Agilent HP3D CE system (Waldbronn, Germany) equipped with a diode array detector and an external pressure device allowing to work up to 12 bar. The control of the electrophoresis system and the data acquisition were carried out by the Chemstation system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). The illumination system used for photo-click reaction was a BioLink cross linker (VWR International, Strasbourg, France) equipped with five 8 W UV tubes emitting at 365 nm. An LC pump (Shimadzu LC 10AD, Tokyo, Japan) was used to rinse the capillaries after their synthesis and functionalization. A Nanobaume system (CIL-Cluzeau Info Labo SA) was used to fill the capillaries with the different mixtures under nitrogen pressure.

3. Results

3.1. Ene-thiol photoclick surface functionalization study

The photografting was performed on *in-situ* synthesized silica monoliths pre-functionalized with vinyltrimethoxysilane. The bare silica monoliths synthesized according to the procedure of Hara et al. [21], yield high efficiencies with an average minimum plate height of $6 \pm 1\ \mu\text{m}$ (measured in the HILIC mode with caffeine and 7-(β -hydroxypropyl)theophylline as test solutes) at the optimum mobile phase velocity of about 0.1 cm/s. Since the silanization step does not significantly modify the intrinsic properties of the monolith (Van Deemter plots as well as permeability remained unchanged after the silanization), the evolution of the column efficiency and permeability after the photografting step only characterizes the photofunctionalization process. We have previously investigated the photografting of octadecanethiol (ODT) onto vinyl activated silica monolithic capillary columns for RP-chromatography [11]. It was demonstrated that the reaction is rapid, within 5 min under relatively high concentration (up to 1 M)

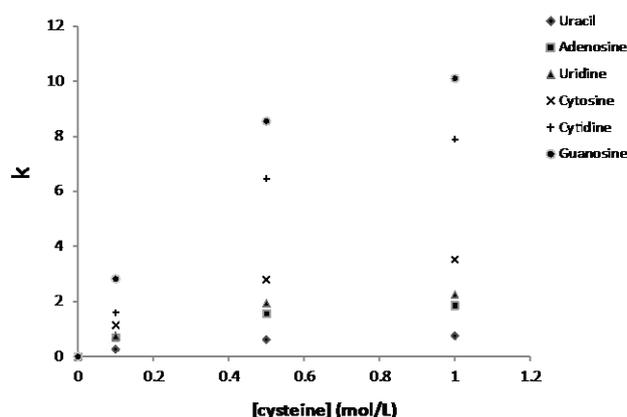


Fig. 2. Influence of the cysteine concentration in the grafting mixture on the retention factors of nucleotides in HILIC mode on cysteine photo-clicked HILIC capillary columns. Column total length $L=11$ cm; length from injection to detection $l=8.5$ cm; pressure drop $\Delta P=12$ bar. Mobile phase 9:1-acetonitrile:water with ammonium formate at 15 mM at pH 3.6. Detection at 214 nm. CV <5% with $n=3$ (Three repetitions for each point).

of monomers (ODT). Moreover, an increase of the irradiation duration or of the monomer concentration (above 1 M) does not lead to any decrease in efficiency as previously observed by several authors [10,12]. Such loss of efficiency was observed in the case of pore clogging consecutive to the growth of thick polymeric layers in the photopolymerization process.

The only limiting factor is the amount of monomer available (that can be circumvented by the renewing of the solution), but a monomer excess as well as an increased irradiation time have no detrimental effects on the monolith. These instructive results demonstrated that the control of functionalization parameters is not as critical as in polymerization and that this process should be readily adaptable to other monomers. The versatility of the as-developed photo-functionalization process was therefore studied with other monomers, with the aim to prepare biphasic capillary columns with successive segments of different functionalities.

A quite large diversity of HILIC columns can be prepared with respect to the chemical surface properties (amide, cyano, hydroxyl...). Zwitterionic-HILIC columns present interesting retention properties with a peculiar selectivity [22,23] that can be tuned by pH adjustment. The photografting of cysteine was used to prepare zwitterionic stationary phases suited for HILIC mode [20,23] for the separation of various classes of compounds including oligosaccharides, peptides and basic compounds. The grafting of cysteine via its thiol groups leads to cysteine-grafted monoliths bearing both amino and carboxylate functionality. Due to solubility issues, the photografting of cysteine was performed in water. Benzophenone was thus replaced by the water soluble AIBA photoinitiator. Optimization of the cysteine photo-click reaction was performed by following the nano-LC separation of 6 nucleotides in HILIC mode.

3.1.1. Optimization of the photografting reaction with cysteine

For this set of experiments, the irradiation time was fixed at 5 min according to previous results. Indeed, the photo-click reaction is rapid (less than 5 min) and longer irradiation times do not improve the extent of surface grafting reaction. The concentration of cysteine in the reaction mixture was then investigated. Without cysteine in the reaction mixture, nucleotides are not retained on the vinyl pre-functionalized monoliths. An increase of the cysteine concentration in the reaction mixture (from 0.1 to 1 M) leads to a concomitant increase of the retention factors (Fig. 2).

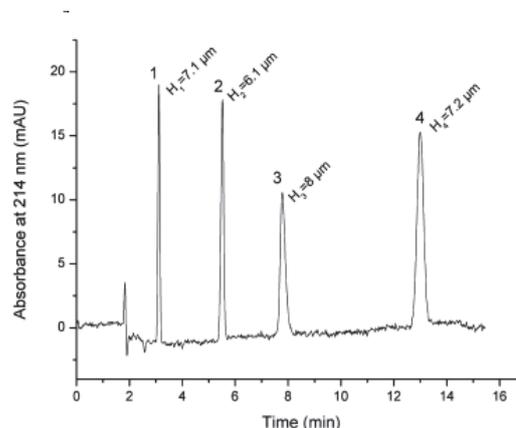


Fig. 3. Separation of uracil, adenosine, cytosine and cytidine on cysteine photo-clicked HILIC capillary column. Grafting mixture: 1 M cysteine, 0.011 M AIBA in water; irradiation: 5 minutes at 365 nm. Column length $L=11$ cm; length to detector $l=8.5$ cm; pressure drop $\Delta P=12$ bar. Mobile phase 9:1-acetonitrile:water and detection at 214 nm. 1: Uracil, 2 adenosine, 3 cytosine, 4 cytidine.

According to previous results, a 1 M cysteine concentration was used as upper limit concentration and gives the highest retention factors i.e. the highest surface coverage. It is worth noticing that a second photografting step with renewing the reaction mixture in the capillary in-between, did not improve the chromatographic retention factors of nucleotides. This result leads to the conclusion that neither irradiation time nor cysteine amount are limiting under these conditions. The chromatogram in Fig. 3 represents the separation of uracil, adenosine, cytosine and cytidine as test solutes in a 90:10 (v/v) acetonitrile/water mobile phase. The column efficiency is not modified when compared to the initial ungrafted column with an average plate height of $6.5 \pm 1 \mu\text{m}$.

3.1.2. Specificities of cysteine photo-clicked columns

Table 1 compares the retention properties of cysteine photo-clicked columns with bare silica, vinyl and poly(acrylamide) functionalized monolithic capillary columns. Surface silanol groups of silica monoliths allow implementation of HILIC separations of nucleotides with bare silica monoliths. Their surface derivatization with vinyltrimethoxysilane suppresses the polar properties of silica and thus the retention of nucleotides, while the photografting of such vinyl-functionalized silica monolithic capillary columns with cysteine leads to highly retentive HILIC columns. In addition to the gain in retention, the shift in selectivity observed between bare silica and cysteine photo-clicked column highlights the surface modification. Finally, the comparison with photopolymerized polyacrylamide silica monolithic capillary columns highlights the large increase in retention properties.

It is worth noticing that in the case of the photopolymerization of acrylamide, the polymerization conditions (monomer concentration and irradiation time) had to be well controlled and balanced in order to avoid mesopore clogging consecutive to the growth of polymeric thick layers. This has never been observed using the

Table 1

Comparison of retention factors for adenosine, cytosine and cytidine, between different HILIC columns: thiol-ene, bare silica and poly(acrylamide) [2] under similar chromatographic conditions (conditions similar to Fig. 2).

	Bare silica	Vinyl	Cysteine clicked	Poly(acrylamide)
$k(\text{adenosine})$	0.87	0	1.85	1.14
$k(\text{cytosine})$	1.43	0	3.55	1.43
$k(\text{cytidine})$	0.96	0	7.95	1.89

Table 2

Slopes and intercept values from $\log k$ vs. $\log [K^+]$ for photoclicked capillary columns functionalized with increasing SMES concentrations (0.1, 0.5 and 1 M). nanoLC experiments with a 30/70 (v/v) acetonitrile/aqueous mobile phase with increasing concentrations of potassium chloride.

	0.1 M SMES			0.5 M SMES			1 M SMES		
	Slope	Intercept	Correlation coefficient	Slope	Intercept	Correlation coefficient	Slope	Intercept	Correlation coefficient
Cations									
Bisprolol	−0.65	0.77	0.958	−0.77	0.74	0.996	−0.90	0.91	0.988
Celiprolol	−0.51	0.96	0.975	−0.55	0.83	0.999	−0.85	1.04	0.997
Acebutolol	−0.47	1.07	0.977	−0.57	0.87	0.998	−0.82	1.12	0.998
Atenolol	−0.45	1.10	0.981	−0.57	1.01	0.995	−0.81	1.28	0.999

ene-thiol photoclick approach. Therefore photo-click reaction represents, in such applications, a great improvement when compared to the photopolymerization counterpart.

3.1.3. Strong cation exchange photo-clicked monolithic capillary columns

The elaboration of SCX monolithic capillary columns via ene-thiol photoclick chemistry was realized using sodium 2-mercaptoethanesulfonate (SMES) according to experimental conditions used for the grafting of cysteine (0.1–1 M). Performances of the SMES photo-clicked capillary columns were determined in ion exchange (IE) mode for the separation of 4 β -blockers. Since it is well-known that organic ions can interact with the stationary phase through electrostatic interactions as well as hydrophobic ones, organic modifier (acetonitrile) was added to the mobile phase in order to limit hydrophobic effect. Indeed, separation in a pure aqueous medium resulted in excessive retention factors and/or broad peaks. The photografting conditions (concentration of SMES in the photografting mixture, implementation of successive photografting steps) were optimized by monitoring the separation of the 4 β -blockers, using increasing KCl concentrations in a 30/70 (v/v) of ACN/aqueous mobile phase.

The following equation describes the ion-exchange chromatographic mechanism:

$$\log k = \text{const} \tan t - \frac{y}{x} \log [E^{x+}] \quad (1)$$

where y is the charge of the analyte, and x is the charge of the eluent ion [1,24,25].

Table 2 gives the slopes, intercepts to ordinate and correlation coefficients of the linear regressions fitting the data for the 4 β -blockers on the photoclicked capillary columns functionalized with increasing SMES concentrations.

An increase of the SMES concentration in the photografting mixture leads to an increase of the slopes close to 0.9 for the highest SMES concentration (1 M). A slope close to unity is representative of an exclusive ion exchange mechanism when the solutes and the eluent ions bare the same charge ($x=y$). In other words, in

comparable experimental conditions, the columns photoclicked with SMES at 0.1 M exhibit mixed-mode behaviour, while at a 1 M monomer content, the retention is mainly governed by electrostatic interactions. This is confirmed by the plot of retention factors versus the reciprocal of eluent ion concentration in the mobile phase (Fig. 4) [24]. Indeed, at infinite eluent ion concentration, the residual retention (y -intercept) represents the retention due to an additional mechanism except from ion exchange.

The y -intercepts are higher when the columns are clicked with lower monomer concentrations, thus confirming a concomitant and non negligible reversed-phase mechanism in addition to the ion exchange one (even with 30% of acetonitrile added to the aqueous mobile phase). The hydrophobic character exhibited by the 0.1 M photoclicked capillary column is related to remaining (unclicked) vinyl groups on the silica surface. This was confirmed by determining the retention factors of the test solutes on the vinyl-prefunctionalized monoliths (retention factors ranging from 0.2 to 0.9 with a 30% acetonitrile mobile phase). For columns clicked with the highest SMES concentration (1 M), linear plots passing through the origin were obtained for all solutes, thus indicating a higher surface coverage with SMES. As already observed for ODT and cysteine photografting, an increase of the thiol monomer concentration as well as a duplication of the grafting step at 1 M did not further increase the retention properties, thus confirming that the maximal surface coverage is also obtained with a 1 M monomer concentration with SMES. To further characterize the different SMES photoclicked columns, their ion-exchange capacities were determined with an inorganic cation (potassium) as test solute. These ion-exchange capacities reflect the surface density of anionic charges bound to the monolith. These measurements of cation exchange capacities were carried out through the quantification of the eluted potassium ions after overloading of the column with a solution of potassium chloride.

Ion-exchange capacity measurements performed with potassium ions and led to a value of 1.29 ± 0.05 nequiv/cm for the 1 M photografted monolith in a $75 \mu\text{m}$ id capillary (Table 3), which is comparable to the ion exchange capacity previously reported for organic monolithic columns [26,27]. The results confirm that

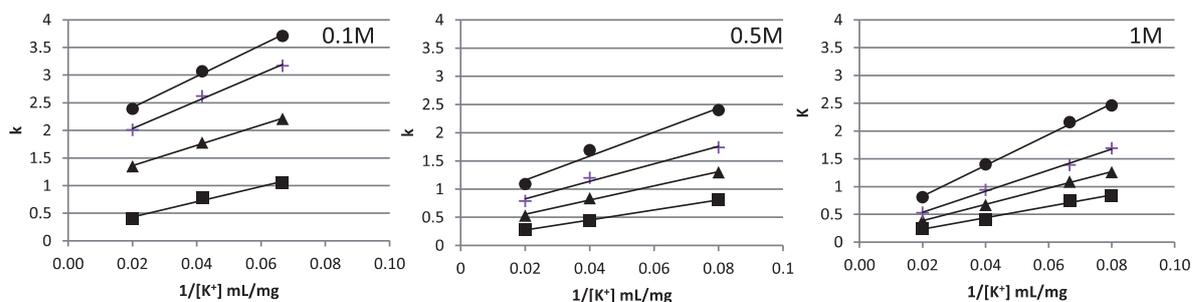


Fig. 4. Relationship between retention factors versus $1/\text{Concentration of } K^+$ for 4 β -blockers on photoclicked columns prepared with increasing concentrations of SMES (0.1 M, 0.5 M and 1 M). Mobile phase: 30/70 ACN/Acid acetic 3% with KCl. Detection at 214 nm. Column total length $L = 11$ cm; length from injection to detection $l = 8.5$ cm; pressure drop $P = 12$ bar: ■ bisprolol, ▲ celiprolol, + acebutolol, ● atenolol.

Table 3
Ion exchange capacities in neq/cm ($n=3$) of monolithic columns before and after their functionalization with SMES at various concentrations (capillary i.d. 75 μm).

Vinyl pre-functionalized silica monolith	SMES 0.1 M (neq/cm)	SMES 0.5 M (neq/cm)	SMES 1 M (neq/cm)
0.51 \pm 0.01	0.60 \pm 0.05	1.24 \pm 0.05	1.29 \pm 0.05

an increase of the SMES concentration in the grafting solution increases the cation-exchange capacity of the monolith due to a higher surface coverage with anionic moieties and that the maximal ion-exchange capacity is obtained for a monomer concentration above 0.5 M. These results lead to two interesting conclusions. First, the optimum SMES monomer concentration for the preparation of SCX silica monolithic capillary column is a 1 M solution. This is consistent with the results obtained for the photoclick reaction of other thiol monomers viz octadecanethiol and cysteine. Thus, for the 3 monomers tested, the reactivity is roughly independent of the monomer involved. Secondly, mixed-mode columns of different hydrophobic/ion-exchange ratio can be prepared by simply tuning the concentration of SMES in the photografting reaction mixture. This may present a strong interest in more complex separations (for example in separations of biological compounds) because it is possible to favor or conversely to reduce the non polar interactions, depending on the analyzed compounds.

In Fig. 5, the complete separation of 5 β -blockers is obtained on the SMES photografted monolithic column with intact efficiency ($6.5 \pm 0.5 \mu\text{m}$). The retention and selectivities are comparable to those achieved with columns photopolymerized with sulfonate monomers [7].

3.2. Multimodal chromatography applications (SCX-RP nano-LC)

The elaboration of a SCX segment upstream from a reversed-phase segment (SCX-RP) is of particular interest for proteins and peptides analysis by multimodal chromatography (Mud-PIT Multimodal Protein Identification Technology) [4,28,29]. Some authors even recommend the implementation of 3 successive zones (RP-SCX-RP) [4], the first being devoted to a desalting step, the second to a preconcentration/fractionation of peptides by ion-exchange and the last one to the separation of pre-fractionated

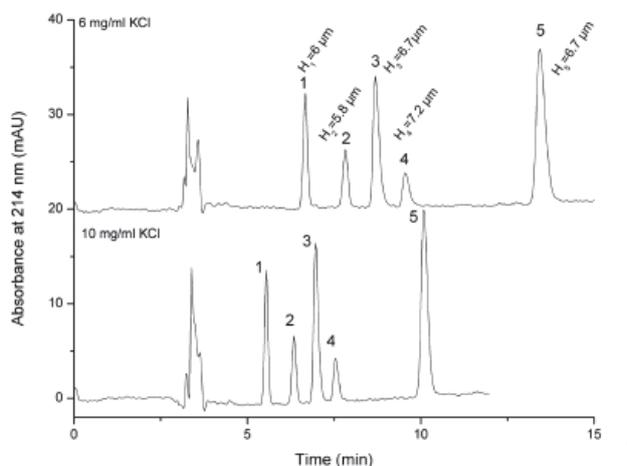


Fig. 5. Separation of 5 β -blockers on SMES (0.1 M) photoclicked column. Detection at 214 nm, Column length $L=11$ cm; length from injection to detection $l=8.5$ cm; pressure drop \square $P=12$ bar, mobile phase: 30/70 (v/v) acetonitrile/acetic acid in water (3% v/v) mixture with 6 and 10 mg/ml of KCl. β -blockers' identification: 1 atenolol, 2 acebutolol, 3 celiprolol, 4 bisoprolol, 5 propranolol.

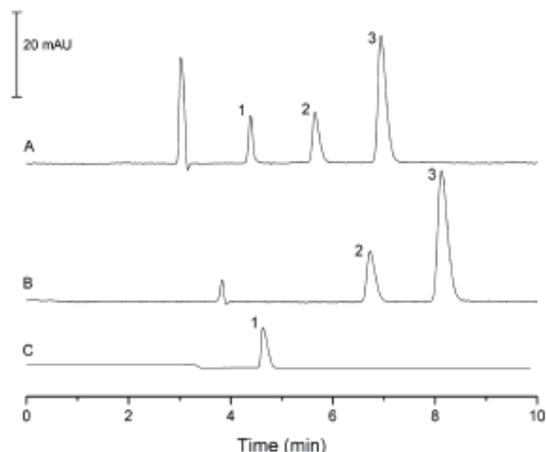


Fig. 6. Chromatograms of a test mixture containing propranolol, benzene and toluene in MeOH/water (70/30, v/v) realized on a SCX-RP multimodal biphasic capillary column. Length of the SCX segment: 1 cm; length of the reversed-phase segment: 9 cm. (A) methanol/water mobile phase (70/30, v/v) containing KCl (15 mg/ml); (B) methanol/water (70/30, v/v) mobile phase without KCl; (C) no injection, final elution using a methanol/water (70/30, v/v) mobile phase containing KCl (15 mg/ml). Detection at 214 nm, length from injection to detection $l=8.5$ cm; pressure drop \square $P=12$ bar. Peak identification: 1 propranolol, 2 benzene, 3 toluene.

peptides by reversed phase. The next paragraph provides a proof of concept of the ability of the as-developed click functionalization process to easily prepare such miniaturized multimodal columns.

3.2.1. Fractionation and subsequent separation of charged and neutral compounds

A 10 cm length multimodal biphasic (SCX-RP) capillary column containing a short 1 cm length SCX segment upstream a reverse-phased one was obtained by two successive photografting steps using a UV-mask to localize the reaction as detailed in the materials and methods section. A sample mixture composed of two neutral compounds (benzene and toluene) and an ionized compound (propranolol) was used to investigate the retention behaviour of this multimodal biphasic capillary column. A first separation was performed using a methanol/water (70/30, v/v) mobile phase containing 15 mg/ml of KCl (Fig. 6A).

In Fig. 6A the first peak corresponds to the column dead time, the three other peaks in order of increasing retention times are attributed to propranolol, benzene and toluene respectively. The high salt content is intended to suppress the cation-exchange retention of the first segment. With this composition of mobile phase, the separation relies only on a reversed phase mechanism in the ODT grafted segment of the multimodal capillary column. Propranolol is a more polar solute and elutes first compared to benzene and toluene. A second separation (Fig. 6B) is then conducted in the absence of KCl in the mobile phase. Only two peaks attributed to benzene and toluene are eluted in first instance, whereas propranolol is not eluted. Propranolol that is positively charged at neutral pH, strongly interacts with the sulfonate groups of the SCX segment. These conditions are well-adapted to the sample fractionation, since cations are retained or even preconcentrated in the short SCX segment at the inlet column while neutral compounds are eluted and separated in the ODT photografted segment. To elute propranolol, KCl (15 mg/ml) is added to the methanol/water (70/30, v/v) mobile phase (Fig. 6C). A baseline drop appears at the dead time and is indicative of the change in mobile phase composition. Only one

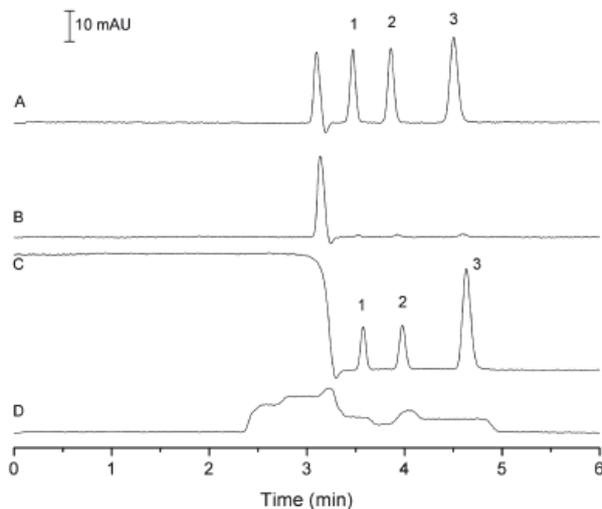


Fig. 7. Separation of β -blockers solubilized in MeOH/water (70/30, v/v) on a SCX-RP multimodal capillary column. Length of the SCX segment: 1 cm; length of the reversed-phase segment: 9 cm; mobile phase methanol/water (70/30, v/v) with KCl (15 mg/mL); length from injection to detection $l=8.5$ cm; pressure drop $\Delta P=12$ bar; Detection at 214 nm; Peak identification: 1 nadolol, 2 oxprenolol, 3 propranolol; (A) injection volume: 5 nL (β -blockers at 100 mg/L); (B) injection volume: 5 nL of the diluted (20-fold) mixture; (C) injection volume: 100 nL of the diluted (20-fold) mixture in methanol/water (70/30, v/v) without salt; (D) injection volume: 100 nL of the diluted (20-fold) mixture in the mobile phase.

peak is detected at the retention time of propranolol with respect to the first experiment (Fig. 6A).

3.2.2. On-line preconcentration and nano-LC separation of charged compounds

A set of 3 β -blockers (nadolol, oxprenolol and propranolol) solubilized in a methanol/water (70/30, v/v) solution was used as a sample. Fig. 7A, represents the separation of a 5 nL sample volume injected on the multimodal biphasic capillary column using a methanol/water (70/30, v/v) mobile phase containing 15 mg/mL of KCl. As shown previously, the presence of salt in the mobile phase shields the ion-exchange segment at the column inlet, the three β -blockers being afterwards essentially separated according to a reversed-phase mechanism.

After a 20-fold dilution of the sample with MeOH/Water (70/30, v/v) without salt, the 3 β -blockers are no longer detected because of their concentration being too low (Fig. 7B). In order to detect the diluted sample, a 20-fold increase in injection volume (100 nL) is performed. The column is preconditioned in MeOH/Water (70/30, v/v) without salt before the injection. The diluted sample is then continuously injected for 4 min at a pressure drop of 3 bars, corresponding to a 20-fold increase of the injected volume compared to the experiment Fig. 7A. The 1 cm length SCX segment, corresponding to a volume of about 40 nL, is 2.5 times smaller in volume than the injected volume (100 nL). Without salt in the sample mixture, β -blockers are intended to preconcentrate on the SCX segment. Their elution from the SCX segment is induced by the mobile phase that contains salt. They are then separated according to a reversed phase mechanism in the second segment. The baseline drop (Fig. 7C) is attributed to the mobile phase change and occurs at the column dead time. In order to highlight the preconcentration effect on the SCX segment, the same experiment was carried out after having diluted the sample in a mobile phase containing salt. The corresponding chromatogram is presented Fig. 7D. The addition of salt in the sample does not allow the preconcentration of the β -blockers anymore and the separation is impaired

by the extra-column dispersion brought by the increased injected volume.

4. Conclusion

A rapid, simple and versatile ene-thiol photografting process has been investigated for the preparation of fritless multimodal monolithic biphasic capillary columns. The photografting of different thiol monomers has been optimized and characterized sequentially. Whatever the monomer considered, the photografting is performed in less than 5 min of UV irradiation. The photoclick process keeps the intrinsic chromatographic column properties (efficiency and permeability) and improves retention properties. It is demonstrated that the same protocol can be directly applied whatever the nature of the monomer (for the 3 monomers tested), by choosing a solvent able to solubilize the new monomer and by switching from an organic solvent to a water soluble initiator if necessary. When compared to photopolymerization strategies, "ene-thiol" photo-click reactions avoid many direct drawbacks like loss of efficiency or column clogging. This UV-triggered grafting strategy is intended to allow miniaturized and complex sample analyses by direct hyphenation of different chromatographic modes without frit and extra-column dead volumes associated to the physical coupling of columns. A model study was thus investigated by elaboration of multimodal biphasic monolithic capillary columns; a short SCX monolithic segment was photografted upstream of a longer monolithic of ODT photoclicked segment. The potential of such miniaturized multimodal columns is illustrated by the fractionation and subsequent separation of a model mixture containing neutral and cationic compounds which is obtained by tuning the ionic strength of the mobile phase. The same type of multimodal biphasic column has been also successfully used to preconcentrate diluted β -blockers on the SCX segment before their elution and separation on the reversed-phase segment. The photografting strategy proposed in this study will be valuable for the development of new miniaturized tools and should find wide application in proteomic studies and more especially in MudPIT strategies. Indeed, starting from a unique monolithic column, photografting allows designing columns with as many zones as necessary. Moreover the permeability of the monolith ($4.6 \pm 1.1 \times 10^{-14} \text{ m}^2$) allows working with long columns to increase peak capacity. Future works will focus on the one-pot synthesis of hybrid silica monoliths with vinyl trimethoxysilane as co-precursor to simplify the overall process.

References

- [1] F.R. Mansour, N.D. Danielson, Multimodal liquid chromatography of small molecules, *Anal. Method.* 5 (2013) 4955–4972.
- [2] T. Tegeler, Z. El Rassi, On-column trace enrichment by sequential frontal and elution electrochromatography. II. Enhancement of sensitivity by segmented capillaries with α -cell configuration—application to the detection of dilute samples of moderately polar and nonpolar pesticides, *J. Chromatogr. A* 945 (2002) 267–279.
- [3] B. Fränzel, D.A. Wolfers, Advanced MudPIT as a next step toward high proteome coverage, *Proteomics* 11 (2011) 3651–3656.
- [4] W.H. McDonald, R. Ohi, D.T. Miyamoto, T.J. Mitchison, J.R. Yates III, Comparison of three directly coupled HPLC/MS/MS strategies for identification of proteins from complex mixtures: single-dimension LC-MS/MS, 2-phase MudPIT, and 3-phase MudPIT, *Int. J. Mass Spectrom.* 219 (2002) 245–251.
- [5] A. Moloyama, J.R. Yates III, Multidimensional LC separations in shotgun proteomics, *Anal. Chem.* 80 (2008) 7187–7193.
- [6] A. Moloyama, J.D. Venable, C.I. Ruse, J.R. Yates III, Automated ultra-high-pressure multidimensional protein identification technology (UHP-MudPIT) for improved peptide identification of proteomic samples, *Anal. Chem.* 78 (2006) 5109–5118.
- [7] R. El-Debs, A. Marechal, V. Dugas, C. Demesmay, Photopolymerization of acrylamide as a new functionalization way of silica monoliths for hydrophilic interaction chromatography and coated silica capillaries for capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 1326 (2014) 89–95.

- [8] Z. Zajickova, J. Luna, F. Svec, Surface modification of silica-based monolith with poly(pentafluoropropyl methacrylate) using single step photografting, *J. Liquid Chromatogr.* 33 (2010) 1640–1648.
- [9] R. El-Debs, V. Dugas, C. Demesmay, Photografting as a versatile, localizable, and single-step surface functionalization of silica-based monoliths dedicated to microscale separation techniques, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 993–1001.
- [10] Y. Chen, K. Wang, H. Yang, Y. Liu, S. Yao, B. Chen, L. Nie, G. Xu, Synthesis of sulfo/vinyl biphasic silica hybrid monolithic capillary column and its application to on-column preconcentration for capillary electrochromatography, *J. Chromatogr. A* 1233 (2012) 91–99.
- [11] A. Laaniste, A. Marechal, R. El-Debs, J. Randon, V. Dugas, C. Demesmay, Thiolene photoclick chemistry as a rapid and localizable functionalization pathway for silica capillary monolithic columns, *J. Chromatogr. A* 1355 (2014) 296–300.
- [12] O. Nunez, T. Ikegami, W. Kajiwara, K. Miyamoto, K. Horie, N. Tanaka, Preparation of high efficiency and highly retentive monolithic silica capillary columns for reversed-phase chromatography by chemical modification by polymerization of octadecyl methacrylate, *J. Chromatogr. A* 1156 (2007) 35–44.
- [13] K. Kimata, K. Iwaguchi, S. Onishi, K. Jinno, R. Eksteen, K. Hosoya, M. Araki, N. Tanaka, Chromatographic Characterization of Silica C18 Packing Materials. Correlation between a Preparation Method and Retention Behavior of Stationary Phase, *J. Chromatogr. Sci.* 27 (1989) 721–728.
- [14] K. Wang, Y. Chen, H. Yang, Y. Li, L. Nie, S. Yao, Modification of VTMS hybrid monolith via thiol-ene click chemistry for capillary electrochromatography, *Talanta* 91 (2012) 52–59.
- [15] Y. Chen, M. Wu, K. Wang, B. Chen, S. Yao, H. Zou, L. Nie, Vinyl functionalized silica hybrid monolith-based trypsin microreactor for on line digestion and separation via thiol-ene click strategy, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 7982–7988.
- [16] X.T. Peng, T. Liu, S.X. Ji, Y.Q. Feng, Preparation of a novel carboxyl stationary phase by thiol-ene click chemistry for hydrophilic interaction chromatography, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 2571–2577.
- [17] M.-L. Chen, J. Zhang, Z. Zhang, B.-F. Yuan, Q.-W. Yu, Y.-Q. Feng, Facile preparation of organic-silica hybrid monolith for capillary hydrophilic liquid chromatography based on thiol-ene click chemistry, *J. Chromatogr. A* 1284 (2013) 118–125.
- [18] H. Yang, Y. Chen, Y. Liu, L. Nie, S. Yao, One-pot synthesis of (3-sulfopropyl methacrylate potassium)-silica hybrid monolith via thiol-ene click chemistry for CEC, *Electrophoresis* 34 (2013) 510–517.
- [19] Y. Liu, Y. Chen, H. Yang, L. Nie, S. Yao, Cage-like silica nanoparticles-functionalized silica hybrid monolith for high performance capillary electrochromatography via one-pot process, *J. Chromatogr. A* 1283 (2013) 132–139.
- [20] A. Shen, Z. Guo, X. Cai, X. Xue, X. Liang, Preparation and chromatographic evaluation of a cysteine-bonded zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phase, *J. Chromatogr. A* 1228 (2012) 175–182.
- [21] T. Hara, S. Makino, Y. Watanabe, T. Ikegami, K. Cabrera, B. Smarsly, N. Tanaka, The performance of hybrid monolithic silica capillary columns prepared by changing feed ratios of tetramethoxysilane and methyltrimethoxysilane, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 89–98.
- [22] A. Marechal, R. El-Debs, V. Dugas, C. Demesmay, Is click chemistry attractive for separation sciences? *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 2049–2062.
- [23] A. Shen, Z. Guo, L. Yu, L. Cao, X. Liang, A novel zwitterionic HILIC stationary phase based on thiol-ene click chemistry between cysteine and vinyl silica, *Chem. Commun.* 47 (2011) 4550–4552.
- [24] J. Xia, P.J. Gilmer, Organic modifiers in the anion-exchange chromatographic separation of sialic acids, *J. Chromatogr. A* 676 (1994) 203–208.
- [25] P. Zakaria, G. Dicoski, M. Hanna-Brown, P.R. Haddad, Prediction of the effects of methanol and competing ion concentration on retention in the ion chromatographic separation of anionic and cationic pharmaceutically related compounds, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 6069–6076.
- [26] A. Bruchet, V. Dugas, C. Mariet, F. Goutelard, J. Randon, Improved chromatographic performances of glycidyl methacrylate anion-exchange monolith for fast nano-ion exchange chromatography, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 2079–2087.
- [27] D. Connolly, B. Paull, High-performance separation of small inorganic anions on a methacrylate-based polymer monolith grafted with [2(methacryloyloxy)ethyl] trimethylammonium chloride, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 2653–2658.
- [28] F. Wang, J. Dong, M. Ye, X. Jiang, R.a. Wu, H. Zou, Online multidimensional separation with biphasic monolithic capillary column for shotgun proteome analysis, *J. Proteome Res.* 7 (2007) 306–310.
- [29] K.J. Webb, T. Xu, S.K. Park, J.R. Yates III, Modified MuDPIT separation identified 4488 proteins in a system-wide analysis of quiescence in yeast, *J. Proteome Res.* 12 (2013) 2177–2184.

II. Préparation de supports d'affinité pour la préconcentration sélective de solutés cibles - Couplage avec l'électrophorèse capillaire

Dans la seconde partie, cette nouvelle approche de fonctionnalisation par « ene-thiol » photo-click a été étendue au greffage de biomolécules (anticorps et aptamères) pour la préparation de colonnes capillaires multimodales intégrant un support d'affinité couplé en ligne avec une étape de séparation. L'objectif est de purifier et de préconcentrer de façon extrêmement sélective, rapide et automatisée des composés cibles contenus à de faibles teneurs dans des matrices complexes.

Dans le cadre du greffage de biomolécules telles que les anticorps, la version « ene-thiol » permet un greffage « orienté » des protéines qui possèdent relativement peu de fonctions thiol (comparativement aux fonctions amine), alors que le grand nombre d'amines distribuées sur l'ensemble d'une protéine conduit à des greffages aléatoires, lorsque ces fonctions sont impliquées dans l'immobilisation sur un support.

Une première approche basée sur l'utilisation d'anticorps a d'abord été explorée. L'immobilisation d'anticorps par le biais de la chimie « ene-thiol » implique de fragmenter spécifiquement les anticorps au niveau de leur pont disulfure central, afin de pouvoir greffer les fragments d'anticorps « LH » via leur fonction thiol ainsi libérée, sur un support pré-fonctionnalisé vinyle. (**Figure 52**). Le greffage par cette fonction thiol est « orienté » et devrait garantir l'accessibilité du paratope situé en extrémité de chaîne, à l'issue du greffage.

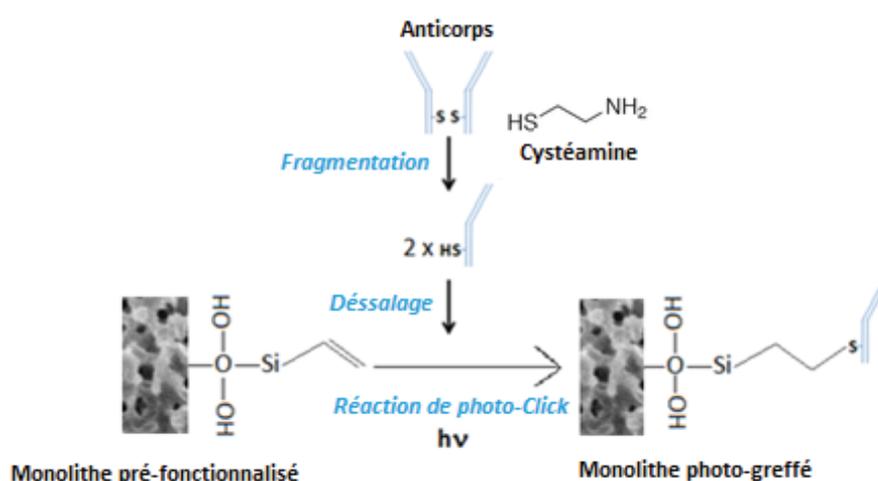


Figure 52: Présentation des différentes étapes de préparation du support d'immunoaffinité.

Pour des raisons de coût, les premiers essais de fragmentation spécifique ont été réalisés sur des anticorps de lapin non spécifiques. L'optimisation des paramètres de fragmentation, en présence de cystéamine, a permis d'obtenir majoritairement les fragments « LH » d'intérêt, le suivi de la fragmentation étant assuré par électrophorèse capillaire sur gel (CGE). Ces fragments, après dessalage et élimination de l'excès de cystéamine, ont ensuite été greffés avec succès sur le support monolithique. Le greffage a été suivi par une méthode de dosage permettant la quantification des amines sur le support (méthode au bleu de Coomassie). L'ensemble des résultats obtenus détaillés en **Annexe 3** démontre la validité de l'approche. Cependant, la transposition de l'étape de fragmentation avec des anticorps spécifiques anti-OTA a présenté des différences significatives par rapport aux anticorps non spécifiques de lapin. La fragmentation réalisée sur les anticorps anti-OTA n'est pas aussi spécifique et engendre la formation de nombreux autres fragments inactifs (destruction des paratopes). Ce type de fragmentation, anticorps-dépendant, nécessite donc une ré-optimisation plus poussée dans le cas des anticorps anti-OTA. Par manque de temps, la seconde approche plus innovante, basée sur l'utilisation d'aptamères (sondes oligonucléotidiques dans notre cas) a été privilégiée. Ces molécules présentent de nombreux avantages en termes de stabilité et d'activité, particulièrement dans le cas des colonnes multimodales. En effet, le couplage en ligne de colonnes d'affinité avec une étape de séparation (ici l'électrophorèse capillaire) nécessite une compatibilité totale entre les différentes étapes. A titre d'exemple, les conditions de séparation électrocinétique (nature de l'électrolyte, pH, flux électroosmotique...) doivent être compatibles avec les conditions de reconnaissance et de maintien de l'activité de l'immunoabsorbant, conditions qu'il est plus facile d'atteindre avec des aptamères qu'avec des anticorps. De plus, la qualité finale d'un support d'affinité est également liée à sa stabilité dans le temps et au temps de régénération qu'il requiert entre deux analyses. Déjà avantageux en termes de coût, de pureté et de reproductibilité de synthèse lot-à-lot, les aptamères sont plus stables que les anticorps et possèdent des temps de régénération plus rapides (quelques minutes contre quelques heures). De plus, les aptamères synthétisés à façon sont facilement modifiés à une de leurs extrémités par ajout d'une fonction réactive (comme un thiol ou une amine) ou d'un marqueur (biotine, fluorophore par exemple).

Ainsi, une colonne multimodale composée d'une première zone remplie de monolithe photogreffé avec des aptamères thiolés et une deuxième zone vide a été préparée pour la préconcentration/séparation électrocinétique en ligne de l'Ochratoxine A. Les résultats ont été publiés dans l'article « In-line coupling of an aptamer based miniaturized monolithic affinity preconcentration unit with capillary electrophoresis and Laser Induced Fluorescence detection », présenté dans la deuxième partie de ce chapitre. La qualité du photogreffage d'aptamères a d'abord été évaluée sur des colonnes monolithiques de 10 cm de longueur par chromatographie d'échange d'ions. L'étude des rétentions de β -bloquants a montré qu'un greffage efficace et répétable (variation inter-capillaires <

10%) était obtenu en seulement 5 min d'irradiation. La localisation du photogreffage a également été démontrée en utilisant un aptamère modifié par un marqueur coloré permettant de visualiser la zone irradiée de la colonne. Les conditions d'analyse pour la préconcentration/séparation en ligne ont ensuite été optimisées afin d'assurer une compatibilité entre les différentes étapes du protocole (percolation/rinçage/élution/séparation). Les résultats ont montré que le protocole était linéaire pour des quantités d'OTA percolées variant de 0,1 à 10 pg avec des taux d'extraction de $93 \pm 2\%$. De même, une répétabilité satisfaisante ($RSD < 10\%$) a été obtenue pour l'ensemble du protocole d'analyse. Enfin, ce dispositif a été appliqué pour la préconcentration/séparation en ligne de l'OTA présente dans du vin et de la bière à des concentrations de quelques ppb, avec un temps d'analyse total toujours inférieur à 30 min et ce de manière totalement automatisée.



In-line coupling of an aptamer based miniaturized monolithic affinity preconcentration unit with capillary electrophoresis and Laser Induced Fluorescence detection



A. Marechal, F. Jarrosson, J. Randon, V. Dugas, C. Demesmay*

Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon I, Institut des Sciences Analytiques, UMR CNRS 5280, 5, rue de la DOUA, 69100 Villeurbanne, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 March 2015

Received in revised form 26 May 2015

Accepted 29 May 2015

Available online 5 June 2015

Keywords:

Photo-click chemistry

Capillary electrophoresis

Silica monolith

Aptamer

Affinity

Preconcentration

In-line coupling

ABSTRACT

A composite 30-cm capillary was prepared. The head of the capillary was a 1.5-cm original and miniaturized aptamer-based monolithic affinity support that was in-line coupled to the end of the capillary used for capillary electrophoresis (CE) with laser induced fluorescence (LIF) detection. The device was used for the preconcentration, separation and quantification of ochratoxin A (OTA) as a test solute. The 1.5-cm preconcentration unit consists of a fritless affinity monolithic bonded with 5'-SH-modified oligonucleotide aptamers. A vinyl spacer was used for thiol-ene photoclick chemistry with a 5 min irradiation at 365 nm. Photografting allowed to confine the binding reaction to the desired silica monolithic segment, upstream the empty section of the CE capillary using an UV mask. The photografting procedure was optimized preparing 10-cm capillary monoliths for nano-LC. The retention factors of cationic solutes in ion-exchange nano-LC allowed to follow the aptamer binding on the monolith. The reproducibility of the photografting process was satisfactory with inter-capillary variation lower than 10%. The aptamer bonding density can be increased by successive graftings of 100 μ M aptamer concentration solution (5 pmol/cm/grafting). The optimal conditions to successfully perform the in-line coupling (preconcentration, elution and separation of OTA) with the composite capillary were adjusted depending on individual requirements of each step but also insuring compatibility. Under optimized conditions, OTA was successfully preconcentrated and quantified down to 0.1 pg (percolation of 2.65 μ L of a 40 ng/L OTA solution). A quantitative recovery of OTA (93 \pm 2%) was achieved in a single elution of 30 pg percolated OTA amount. The reproducibility of the overall process was satisfactory with a relative standard deviation lower than 10% with negligible non-specific adsorption. This device was applied for the preconcentration and analysis of OTA in beer and wine at the ppb level within a total analysis time of 30 min.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Affinity chromatography, introduced by Cuatrecasas more than 50 years ago [1,2], is a powerful technique for the purification and preconcentration of targeted compounds from a complex mixture. Antibodies were first used as ligands with high-affinity binding [3] and specific interactions [4–10] with target receptors. Recently, aptamers demonstrated their ability to recognize virtually any class of target molecules [11]. Aptamers are oligonucleotide or peptide molecules able to bind with high affinity and specificity to almost any target molecules. Aptamers were used in diverse fields of applications such as micro- and nanoscale biosensing [12], biomaterials [13,14], analytical [15], or medical techniques [16,17]. Compared to

antibodies, aptamers are easily produced via reproducible chemistry not depending on living animals [18,19]. They are stable to long-term storage. Also, they are easily adaptable to introduce specific functional moieties or labeling molecules [19,20]. The great specificity and affinity of aptamers is due to their flexible specific folding allowing them to form complex three-dimensional structures with target molecules. Furthermore, this binding process can be reversible. Unlike antibodies, once denatured, functional aptamers can be regenerated easily [11]. Another big advantage of aptamers compared to antibodies is their small size, allowing to load significant amounts in separation devices such as those used for affinity chromatography.

Analysis of complex mixtures at trace levels has pushed forward the development of integrated and/or miniaturized separation systems coupling the preconcentration and separation steps. Besides the “off-line” classical approach [21], two different coupling approaches, so-called “on-line” or “in-line” couplings, have been

* Corresponding author. Tel.: +33 437 423 552.

E-mail address: demesmay@univ-lyon1.fr (C. Demesmay).

proposed in the literature [22]. The distinction between on-line and in-line mode is often confusing. From our point of view, the on-line approach is referred as the physical coupling of columns through specific interfaces [23–25] like a 10-port valve. This approach is usually complex and band broadening, consecutive to the transfer of the sample from the preconcentration unit to the separation column, critical in miniaturized systems, may occur. With in-line coupling, the μ -SPE unit is part of the capillary column making its inlet [26–34]. In such integrated capillary electrophoresis (CE) system, the elution of the μ -SPE unit is achieved with few tens of nanoliters directly going to the separation zone without any dilution or band broadening effects. The scale shift from the injection volume (μ L) to the elution one (nL) allows a high preconcentration factor highly valuable for sensitivity improvement. For example, a μ -SPE-CE-MS method using a monolithic sol-gel preconcentrator for in-line SPE for the analysis of enkephalin neurotransmitters in biological samples at the ng/mL level was presented [32].

The integration of affinity columns in microsystems is difficult [37–41]. The pioneering works of the Phillips's group presented the grafting of antibodies in the head section of open-tubular capillary columns with the upstream empty sections dedicated to electrokinetic separation [42,43]. In a previous work, we reported the in situ preparation of an antibody-based immunoaffinity monolithic capillary section coupling in line with CE [38]. Such affinity-based μ -SPE units could be greatly improved replacing antibodies by aptamers. To the best of our knowledge, setting in-line an aptamer-based μ -SPE in a CE capillary has not been investigated yet. If aptamers present interesting features, they have specific requirements: mandatory presence of bivalent cations for the recognition step, specific pH for the binding buffer, pH compatibility with the subsequent separation step, and electroosmotic flow constraints. The extraction and separation steps must be optimized to be compatible.

We recently focused on the development of an original photo-functionalization process for rapid, localized and versatile surface modification of silica, by thiol-ene photo-click reaction [44]. This process allowed us to prepare multimodal silica monolithic columns inside capillary tubing [45]. In the present work, we propose to take advantage of this functionalization process to develop an in-line μ -SPE-CE analytical system using aptamers as recognition molecules and laser induced fluorescence (LIF) as the detection method. Such system will be designed, optimized and evaluated for the purification, preconcentration, detection and quantification of ochratoxine A (OTA) in diverse matrices. The elaboration of a silica monolithic segment with appropriate bonded aptamer at the inlet of a 75 μ m inner diameter fused silica capillary will be described. The μ -SPE monolith will be tested with OTA as a model compound in term of repeatability, linearity, overall recovery and limits of quantification. The fully automated method, obtained using the composite capillary, will be used to analyze OTA in spiked wines and beers.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and chemicals

All the reagents used were of analytical grade. Tetramethoxysilane (TMOS), methyltrimethoxysilane (MTMS), urea, polyethylene glycol (PEG, MW = 10,000), triethylamine (TEA), methanol (HPLC grade), thiourea, vinyltrimethoxysilane (VTMS), 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride (AIBA), atenolol, propranolol, ochratoxin A ($C_{20}H_{18}ClNO_6$, MW = 403.8, N-[[[(3R)-5-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-3,4-dihydro-1H-isochromen-7-yl]carbonyl]-L-phenylalanine, CAS 303-47-9),

Tris-HCl, Tris-base ($C_4H_{11}NO_3$, MW = 121.1, tris-(hydroxymethyl)-aminomethane), KCl, NaCl, $CaCl_2$, Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 were purchased from Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). Acetonitrile (ACN) (HPLC grade) was purchased from VWR (VWR, Fontenay-sous-bois, France). Acetic acid was from Riedel-de Haënn (Riedel-de Haënn, Seelze, Germany). All aqueous solutions were prepared using >18 M Ω cm water (Millipore, Molsheim, France). PTFE-coated fused-silica capillaries (TSU deep-UV Transparent Coating 75 μ m i.d.) were purchased from Polymicro Technologies (Polymicro Technologies, Arizona, USA). Synthetic oligonucleotides were purchased from Eurogentec (Angers, France). The sequence of the OTA aptamer was 5'-GATCGGGTGTGGGTGGCGTAAAGGGAGCATCGGACA-3', 5'-CY5 labeled poly(T)₁₀ oligonucleotide was used for the localization study. All oligonucleotides were modified at the 3' end by a C6-thiol linker and purified by RP-HPLC. The oligonucleotides are received dried and solubilized in 200 mM phosphate buffer (pH 8) and 5 mM $MgCl_2$.

2.2. Preparation of vinyl pre-functionalized capillary with a 2 cm-length monolith

2.2.1. Synthesis of silica monoliths

The silica monolith preparation followed our reported procedure [36]. Briefly, a 18 mL mixture of TMOS/MTMS (85/15, v/v) was added to 40 mL 0.01 M acetic acid solution containing 1.9 g PEG and 4.05 g urea. The sol mixture was stirred at 0 °C for 30 min. Then, the temperature was raised to 40 °C and the mixture was loaded into the 75- μ m fused-silica capillary. To prepare the μ -SPE unit at the head of the CE capillary, a 5-cm segment of a 40-cm capillary was filled by capillarity. Next, the partially filled and blocked capillary was kept at 40 °C overnight for gelification completion. Mesopores were formed by hydrolyzing urea gently raising the capillary temperature at 0.5 °C/min up to 120 °C maintained for 4 h. After cooling, the monolith was washed with methanol and the capillary was cut to desired lengths of the μ -SPE monolith side (about 1.5 cm) and the open tubular CE side (about 30 cm).

The 10-cm capillaries dedicated to SCX nano-LC characterization after photografting were prepared completely filling them with the sol mixture. The monolith preparation procedure was otherwise the same.

2.2.2. Silica surface activation by grafting of vinyltrimethoxysilane

Photo-click chemistry requires an anchor vinyl moiety onto the monolith surface. The silanization solution was composed of 5%, v/v, VTMS and 2.5%, v/v, triethylamine in a 95/5% (v/v) MeOH/water mixture. Silanization was performed at 80 °C for 3 h under hydrodynamic flow. After silanization, cooled monoliths were thoroughly rinsed with methanol using an LC pump (Shimadzu LC 10AD, Tokyo, Japan).

2.3. "Aptamer" photo-click functionalization of monoliths

The modified capillary with the vinyl-silanized monolith head and the open CE segment was filled with a 100 μ M aptamer solution also containing Na_2HPO_4 200 mM, $MgCl_2$ 5 mM, pH 8. A nanobaume packing system (Western Fluids, Wildomae, CA, sold by CIL-Cluzeau Info Labo SA, Ste Foy la Grande, France) was used to fill the capillaries with the different mixtures under nitrogen pressure. Localization of the photochemical reaction is carried out by masking the open portion of the capillary with PEEK tubing as UV-mask. The irradiation system used for photo-click reaction was a BioLink cross linker (VWR International, Strasbourg, France) equipped with five 8W 365 nm UV tubes.

The monolithic segment was photografted for 5 min at 365 nm. The capillary was then washed with methanol. In the case of multiple successive graftings, the operation was repeated as needed.

2.4. Instrumentation

CE and nano-LC experiments were carried out with an Agilent HP3D CE system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with a diode array detector and an external pressure device allowing to work up to 12 bar. System control and data acquisition were carried out using the Chemstation software (Agilent).

In-line coupling experiments were performed on a Beckman Coulter P/ACE MDQ system equipped with a LIF detector using a 410 nm diode laser (Opton laser international, Orsay, France) with a 450 nm longpass filter (Edmund, Lyon, France).

2.5. Protocol for percolation, elution and separation of ochratoxin A

The total capillary length was adjusted to about 30 cm, with a short monolith inlet of about 1–2 cm. The length from injection to detection was about 20 cm. In the first step, solutions of OTA (between 40 and 200 ng/L) solubilized in the binding buffer (Tris 10 mM, NaCl 120 mM, CaCl₂ 20 mM, KCl 5 mM, pH 8.5) were percolated through the column at a linear velocity of about 0.1–0.15 cm/s, which corresponds to a flow of about 0.2–0.4 μL/min and pressure drop of about 5–7 bar (70–100 psi) for 1–10 min depending on the volume to be percolated. Thiourea was injected at the beginning and at the end of the percolation step to determine accurately the linear flow velocity, hence the percolated volume. A washing step was then carried out by percolating 2 volumes of the whole capillary, i.e. about 3.3 μL, with the separation buffer (Tris–HCl 2.5 mM and CaCl₂ 5 mM at pH 8.5), at a driving pressure of 7 bar (100 psi).

The elution step could then be realized by injecting a desorbing plug of 75 nL (20 s at 3.5 bar or 50 psi for a linear velocity of 0.07 cm/s) of 30% ACN/70% Tris–base 10 mM, EDTA 2.5 mM pH = 8 buffer. Next, the electrokinetic separation was performed with an inlet buffer (monolith side) made of Tris 2.5 mM and CaCl₂ 5 mM at pH 8.5, and an outlet buffer made of Tris 10 mM and EDTA 2.5 mM at pH = 8. The separation was achieved by applying +15 kV assisted by a 1.4 bar (20 psi) driving pressure at the inlet side. Fluorescence detection was completed with the 410 nm diode laser.

3. Results and discussion

3.1. Principle of the in-line coupling

Fig. 1 is a sketch of the proposed in-line coupling method. Step 1, the sample containing OTA solubilized in a “binding buffer” (i.e. a divalent cation is required for aptamer recognition) is percolated through the column. Step 2, the μ-SPE monolith is washed with the separation electrolyte in order to eliminate non-retained compounds and to pre-condition the capillary before the separation step. Step 3, a short plug of “desorbing buffer” allows for disrupting the strong interactions between the aptamers and OTA releasing OTA in the open section of the capillary. Step 4, the electrokinetic separation is achieved with the separation electrolyte and applying voltage and pressure at the capillary inlet (CE assisted by pressure). Step 5, OTA is detected by Laser Induced Fluorescence at 410 nm (Fig. 1).

3.2. Preparation of the miniaturized affinity preconcentration unit

3.2.1. Preparation of the miniaturized aptamer-based affinity -SPE unit

As only a small monolith segment is required as the preconcentration unit at the capillary head, the sol mixture is introduced into the 75-μm UV-transparent silica capillary by simple capillarity just dipping for a few seconds the capillary head into the sol mixture. With our procedure, the synthesized monolith has large through-pores (about 2 μm) with a skeleton of about 1 μm [36]. Large through pores will facilitate the rapid percolation of large sample volume avoiding clogging issues, whereas a thin silica skeleton will ensure for rapid mass transfer kinetics. The boundary between the monolith section and the open tubular one is well defined by the synthesis protocol. The whole capillary column, monolithic and open section, was silanized with vinyltrimethoxysilane (VTMS) [35,45]. The photo-click reaction was however strictly limited to the monolith segment, the rest of the capillary being UV-masked with peek tubing during irradiation.

3.2.2. Testing the photo-grafted aptamer -SPE equipped capillary column

Based on our previous experience in photo-click chemistry and monoliths [35,45], we selected a concentrated aptamer solution (100 μM) in phosphate buffer (200 mM, pH = 8), with a water soluble initiator (AIBA, 0.3 wt%). Several void volumes of this solution were percolated through the column and the section to be grafted was exposed to UV-light for 5 min. In order to validate the localized photo-click reaction, a preliminary experiment was done with a labeled aptamer (5'-CY5 labeled poly(T)₁₀). A 5-cm vinylized monolithic capillary column was entirely filled with a 100 μM solution of the labeled aptamer (blue). Only a small section of the monolith was irradiated at 365 nm for 5 min and thoroughly washed with methanol. As illustrated on the photograph Fig. 2, the grafting can be directly visualized by the presence or the absence of blue coloration of the monolith. Moreover, the boundary between the grafted and non-grafted areas is well defined, thus indicating that the grafting is well localized.

3.2.3. Testing photo-grafted aptamers on 10-cm monolith capillary columns

To have a better idea of the effectiveness of the photo-grafting process, we prepared long monolithic capillary columns (about 10 cm in length). They were vinyl activated and photografted with anti-OTA-aptamers (100 μM aptamer solution, 5 min irradiation). These 10-cm columns were used to measure the retention factors of cationic test solutes in strong cation-exchange (SCX) chromatography, taking advantage of the aptamer phosphate anionic groups as cation-exchange sites. The separation of two cationic β-blockers (atenolol and propranolol), by varying the concentration of the eluent ions (potassium) added to the mobile phase will allow to estimate the aptamer bonding density on the silica monolith. Since organic cations can interact with the stationary phase through electrostatic exchanges as well as through hydrophobic interactions, an organic modifier (50% methanol) was added to the mobile phase to minimize hydrophobic interactions.

When an ion-exchange chromatographic mechanism is involved, the variation of the retention factor, k , versus the concentration of eluent ions, $[E^x]$, satisfies Eq. (1), where y is the charge of the analyte, and x is the charge of the eluent ion, K^+ , in our case, and the constant depends on the amount of ion-exchange sites [46–48].

$$\log k = \text{constant} - \frac{y}{x} \log[E^{x+}] \quad (1)$$

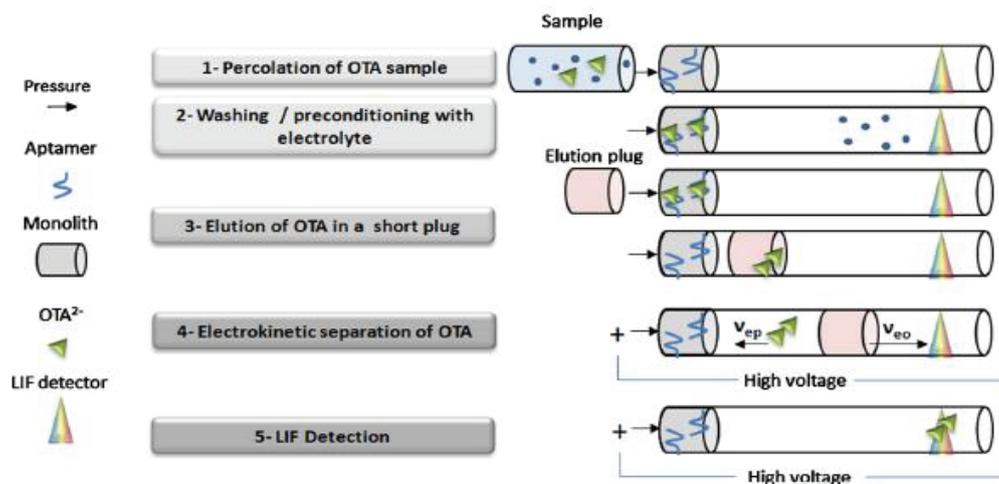


Fig. 1. Principle of the in-line coupling of preconcentration and CE separation of OTA.

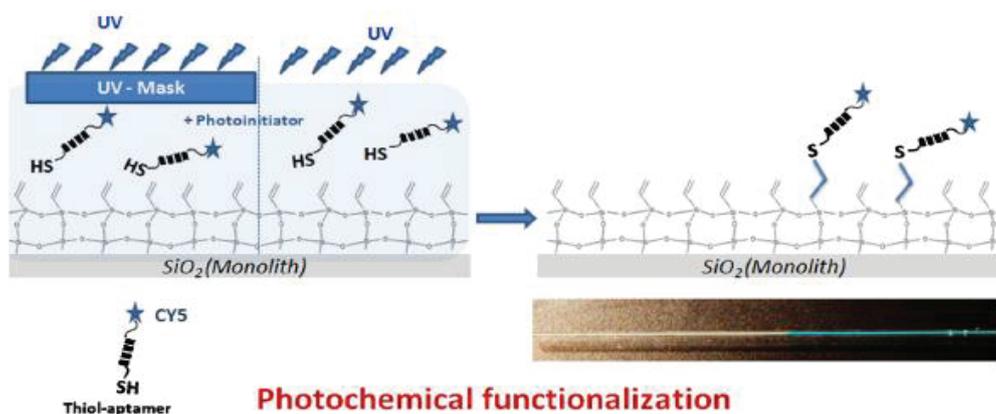


Fig. 2. Illustration of the localization of the photoclick reaction using UV photomask. Photograph of a capillary column after photografting of a thiol-modified and blue labeled oligonucleotides (poly(T)₁₀). The UV-masked monolith segment remains white after washing while the UV exposed segment colors in blue.

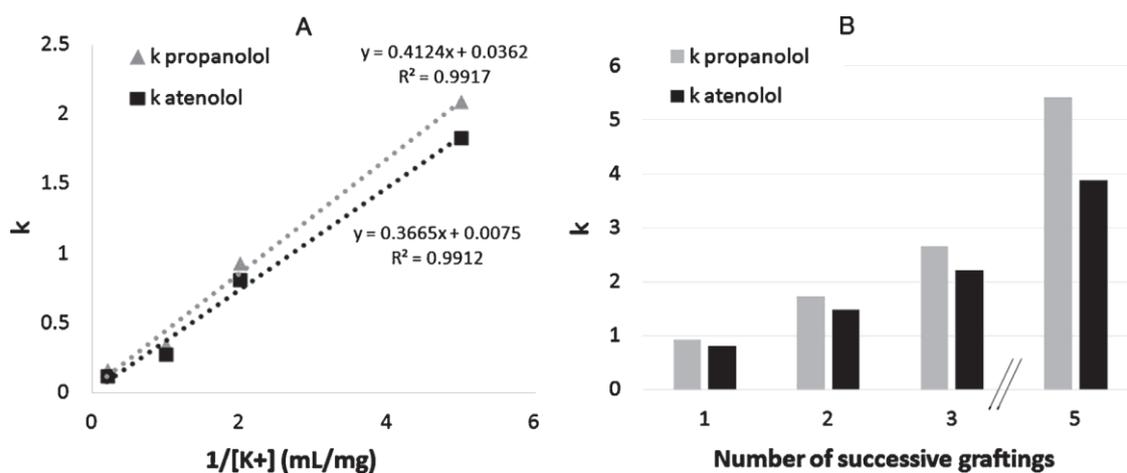


Fig. 3. (A) Relationship between retentions factors versus $1/[K^+]$ for 2 β -blockers on a single 10-cm photoclicked monolith column, mobile phase 50/50 (v/v) MeOH/water with KCl. (B) Diagram representing the evolution of the retention factors of 2 β -blockers with repeated grafting steps, mobile phase 50/50 (v/v) MeOH/water with 0.5 mg/mL KCl.

It was first verified (results not shown) that the plot of $\log k$ versus $\log [K^+]$ were linear, with a slope y/x close to unity (0.87 and 0.80 for atenolol and propranolol, respectively). This result is consistent with an exclusive ion-exchange mechanism with solutes and eluent ions both bearing the same charge ($x=y$). However the y/x slope slightly lower than unity may indicate an incomplete solute ionization so the value of the Eq. (1) constant may be biased and was not used. With a demonstrated ion exchange mechanism, it is possible to plot the retention factor of the test solutes versus the reciprocal of the eluent ion concentration (Fig. 3A). The zero-intercept and linear line confirmed the electrostatic interactions occurring with grafted oligonucleotide aptamers [47]. Indeed, at infinite eluent ion concentration, the residual retention (y -intercept) is due to non-ion-exchange mechanisms. It was checked that, with the same mobile phase (potassium concentration 1 mg/mL and 50% methanol), negligible retention factors (0.08 and 0.16, respectively, for propranolol and atenolol) were measured on the vinylized (but non-grafted) monolith capillary columns.

These retention measurements in ion-exchange chromatography were also used to check the reproducibility of the grafting on four 10-cm monolithic columns all grafted with a single 5 min irradiation. The coefficient of variation of the retention factors for the two test solutes were less than 10% with the 1 mg/L KCl and 50% MeOH mobile phase, thus demonstrating a reliable inter-capillary reproducibility.

Photografting was achieved with a 100 μ M aptamer solution that was the maximum concentration reported for aptamers in the literature [49]. This 100 μ M concentration was not optimal for maximum coverage of the vinylized monoliths. Indeed, we demonstrated in previous articles [35,45], that a 1 M concentration of short monomer (octadecanethiol, cysteine and sodium 2-mercaptoethanesulfonate) was required to reach the highest surface coverage within a single short irradiation time (5 min) and that multiple successive irradiations were greatly increasing the coverage. It was therefore decided to study the influence of several successive irradiations with aptamer solution renewals. Four 10-cm vinylized monolith capillaries were submitted to 1–5 successive 5-min graftings. It was first verified that, for each column, the retention factors varied linearly (correlation coefficients higher than 0.99) with $1/[K^+]$ and that all the y -intercepts were close to zero (less than 0.16). Fig. 3B illustrates the variation of the retention factors versus the number of successive graftings. An almost linear increase of the retention factors with the number of consecutive graftings is observed. It confirms the results obtained grafting alkyl-chains with ene-thiol photoclick chemistry [35]. The number of successive graftings was not further increased since the amount of aptamers grafted after five passes was high enough for preconcentration purposes: on a 1-cm length and 75 μ m i.d. monolith (~56 nL volume), an estimated 5 pmol of aptamers were grafted per irradiation of a 100 μ M monomer solution. Comparing our method with that developed by Brothier [23] for similar purposes (activation of an amino-monolith with glutaraldehyde and its subsequent reaction with amino-modified aptamers), the aptamer consumption is greatly reduced giving a similar grafting density much quicker.

3.3. Optimization of the coupling conditions for OTA preconcentration, separation and detection

For further experiments, a 30-cm composite capillary containing a 1–1.5 cm monolith μ -SPE unit aptamer modified with a single irradiation at its head was used. With the estimated 5 pmol of aptamer, the μ -SPE head should be able to capture up to 5 pmol of OTA, i.e. about 2000 pg of OTA. This μ -SPE maximum capacity is high enough according to the OTA concentrations expected in real samples that are below 2 μ g/L, i.e. 2 pg/ μ L).

3.3.1. Percolation and recognition step.

The conditions of percolation were directly adapted from the literature [23]. In the first step (Fig. 1-1), 1 μ L of a solution of OTA solubilized in the binding buffer is percolated through the column. The binding of OTA to aptamers requires the presence of divalent cations. Ca^{2+} cations at a concentration of 20 mM (5 mM in rinsing and separation steps), were selected to form and to stabilize the intermediate complex [50].

3.3.2. Washing and pre-conditioning step before elution and electrokinetic separation.

After the percolation step, unbound compounds as well as the binding buffer must be flushed away by a washing step with the separation buffer (Fig. 1-2). Preconditioning with the separation buffer is a required step to eliminate the highly conductive binding buffer that is not compatible with the application of a high voltage. 5 mM calcium ions are required to prevent the dissociation of the complex between OTA and aptamers. The 8.5 pH is compatible with both the aptamer-OTA complex formation and the electrophoretic separation.

3.3.3. Optimization of the composition of the elution-desorption plug

OTA desorption is realized by the injection of a small elution-desorption plug, in order to benefit from the highest preconcentration factor (Fig. 1-3). The elution-desorption plug length is adjusted to exceed by about 10% the monolith length. The composition of this elution plug was optimized to produce a fast and complete release of the aptamer bound OTA. The elution-desorption plug composition was 30% ACN/70% elution buffer (v/v) containing 10 mM Tris, 2.5 mM EDTA and adjusted at pH 8. The 30% acetonitrile modifier was required to quench undesirable hydrophobic interactions between released-OTA and ungrafted vinyl groups of the monolith. Acetonitrile also favored the disruption of the OTA-aptamer complex. The pH value of 8 ensured the ionization of OTA in the elution plug. In its anionic form, free OTA migrated counter-current out of the elution plug and further moved slower than the electroosmotic flow during the electrokinetic separation. The addition of EDTA in the elution plug is mandatory in order to complex the calcium ions that would not otherwise be released during the elution step. Indeed, without EDTA, the neutral released Ca^{2+} -OTA species would migrate with the EOF (chromatogram not shown). Finally, the total ionic strength of the elution-desorption plug is kept as low as possible to favor the stacking of OTA in this plug.

3.3.4. Optimization of the separation conditions

The electropherogram obtained with the above described conditions is illustrated Fig. 4.

Fig. 4A shows the Ca^{2+} -OTA peak at the neutral EOF marker time, in addition to the expected peak corresponding to “free” OTA when a desorption plug without EDTA was used. Since no signal was observed at the t_{eo} when a blank is ran. In order to avoid such Ca^{2+} -OTA complexation that impairs OTA quantification, the composition of the separation electrolyte used at the inlet of the capillary (monolith μ -SPE side) had to be modified as follows. The “inlet electrolyte” must not contain any calcium ions and EDTA is added at the same concentration than in the elution plug (2.5 mM) to complex residual calcium ions. Fig. 4B illustrates the electropherogram obtained with the EDTA optimized conditions. No peak is observed at the EOF time, which confirms that all “freed” OTA is detected in these conditions. A second elution-desorption plug was introduced after completion of Fig. 4B electropherogram returning no peak after the EOF time and confirming complete OTA desorption with the very small plug containing EDTA.

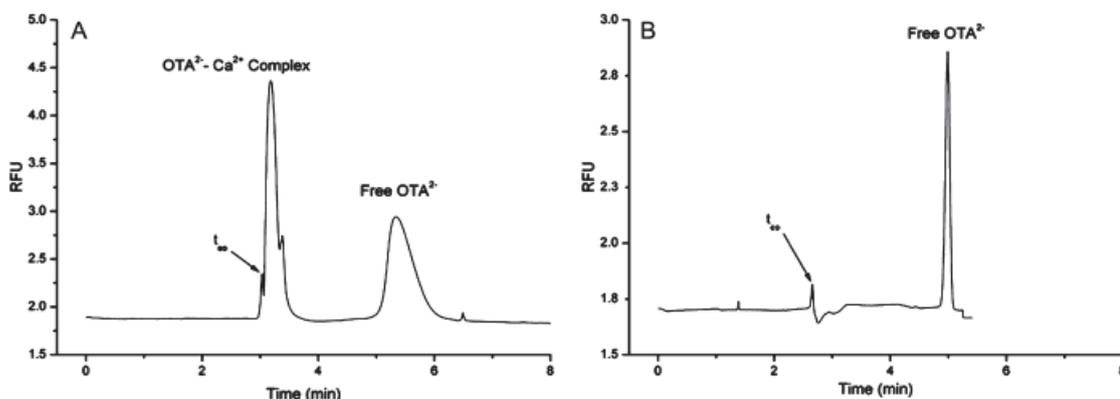


Fig. 4. In-line pre-concentration of OTA – influence of the composition of the elution-desorption plug electrolyte at the inlet side (monolith side); (A) Tris–HCl 2.5 mM, CaCl₂ 5 mM at pH = 8.5; (B) Tris–base 10 mM, EDTA 2.5 mM, pH = 8. 30-cm 75- μ m capillary with a μ -SPE head of 1.5 cm; length from injection to detection = 20 cm; percolated volume: 265 nL at 40 μ g/mL OTA; elution with 75 nL of 30% ACN/70% Tris–base 10 mM, EDTA 2.5 mM pH = 8; separation electrolyte at the detector side: Tris–HCl 2.5 mM, CaCl₂ 5 mM at pH 8.5. 15 kV with assisted 1.4 bar.

3.4. Evaluation of the performances of the μ -SPE unit

3.4.1. Study of non-specific interactions

A capillary containing a 1–1.5 cm vinylized monolith not grafted with aptamers was used to assess potential non-specific vinyl monomers/OTA interactions. Indeed, a significant proportion of vinyl groups may remain at the surface of the monolith in the case of a single irradiation photografting. OTA was percolated in the same conditions than those used in the recognition experiment, i.e. 1 μ L of 40 ng/mL OTA corresponding to 40 pg. No OTA peak was detected after the elution-desorption procedure. To ensure that the absence of peak was not related to a malfunction of the device, a 1.5 cm plug of OTA (40 pg) solubilized in the elution buffer was injected and further analyzed in the same separation conditions. In this case, a significant peak was well detected. This result clearly demonstrates that the OTA pre-concentration was only due to its specific recognition by the aptamers and not by any other hydrophobic interaction.

3.4.2. Extraction yields and linearity area

In order to assess the recoveries of the overall procedure, increasing amounts of OTA (from 0.1 to 154 pg) were loaded on the μ -SPE capillary head percolating volumes ranging from 768 nL to 2.65 μ L and concentrations ranging from 40 ng/L to 200 ng/mL. The calibration curve expressed as OTA peak area versus the amount of OTA percolated, is presented in Fig. 5. Two linear segments are observed. At low OTA loadings ranging from 0 to 30 pg, the OTA peak area increases linearly with a 0.375 slope. For higher amounts of OTA loaded (30–150 pmol), the peak area varies still linearly, but with a significantly lower 0.155 slope. This change in aptamer absorption may be attributed either to a non-quantitative capture of OTA due to an excess of OTA percolated in comparison to the capacity of the μ -SPE unit, or to a change in the OTA capture mechanism, or, at last, to a non-quantitative elution. Since we showed that vinyl-OTA non-specific interactions were excluded, it could be interaction with already formed OTA-aptamer complexes. For OTA amounts higher than 30 pg, the plug elution-desorption was incomplete hence non-quantitative as confirmed by the observation of a significant OTA peak seen after a second plug elution. As already mentioned, no OTA peak was observed after a second plug elution for loaded OTA amounts lower than 30 pg. Considering the OTA common concentrations in real samples, between 0 (uncontaminated) and 4 μ g/L, the 30 pg OTA amount corresponds to 7.5 μ L of a contaminated 4 μ g/L solution. This volume is almost too large

to load on the μ -SPE device described, so it was not considered to increase the elution plug length nor the aptamer density since OTA amounts higher than 30 pg would make little sense in highly diluted real samples.

In the 0.1–30 pg range, the amount of OTA recovered was calculated from the peak areas obtained after the percolation of large volumes of highly diluted solutions (from 1.325 μ L to 2.65 μ L) of OTA solutions ranging from 4 μ g/L to 40 ng/L. After the elution-desorption step, the quantity of eluted OTA was calculated using the OTA peak area according to the following equation [38]:

$$\text{Quantity}_{\text{OTA}} = \frac{\pi \pi d_{\text{cap}}^2}{4 \pi K_{\text{OTA}} \pi t_{\text{mig}}(\text{OTA})} \pi \text{Peak area} \quad (2)$$

where π is the effective length in cm, d_{cap} the capillary diameter in cm, $t_{\text{mig}}(\text{OTA})$ the migration time of OTA and K_{OTA} the response

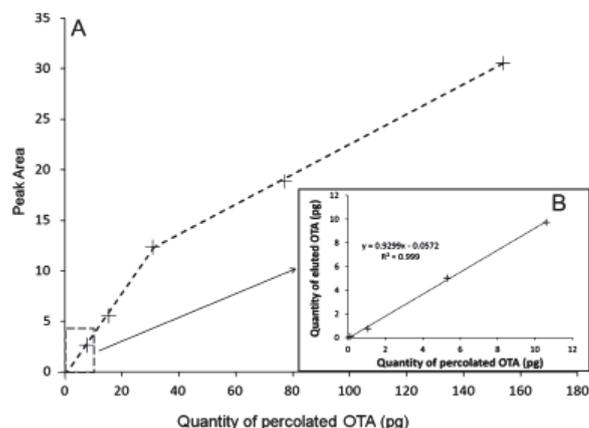


Fig. 5. Linearity of the in-line μ SPE-CE-LIF coupling. (A) Peak area versus quantity of percolated OTA (pg) percolating a constant 768 nL volume of OTA at concentrations ranging from 10 to 200 ng/mL. (B) Quantity of eluted OTA in pg versus the percolated quantity also in pg but with large volumes (from 1.325 μ L to 2.65 μ L) of highly diluted OTA solutions (from 4 μ g/L to 40 ng/L). Total capillary length: 30 cm; length from injection to detection: 20 cm, i.d.: 75 μ m; monolith length: 1.5 cm; elution-desorption with 75 nL of 30% ACN/70% Tris–base 10 mM, EDTA 2.5 mM pH = 8; separation electrolyte at the detector side: Tris–HCl 2.5 mM, CaCl₂ 5 mM at pH 8.5; separation electrolyte at the injector monolith side: Tris–base 10 mM, EDTA 2.5 mM pH 8.

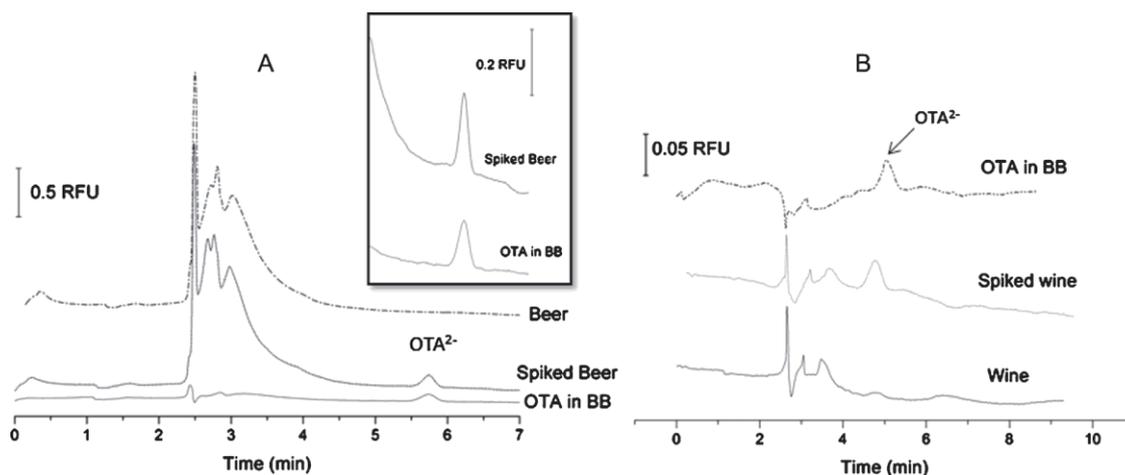


Fig. 6. In-line preconcentration, separation and LIF detection of OTA in (A) beer, top trace: raw beer, middle trace: beer spiked diluting with an equal volume of binding buffer with 4 ng/L OTA, and lower trace: binding buffer with OTA 2 ng/L; percolation volume: 768 nL. (B) White wine: top trace: Standard binding buffer with 0.5 ng/L OTA, middle trace: wine diluted twice with 1 ng/L binding buffer and pH raised to 9 with NaOH, and lower trace: unspiked wine diluted twice with binding buffer and pH raised to 9; percolation volume of 5023 nL. All other experimental conditions are listed in Fig. 5 caption.

factor of OTA. The response factor, K_{OTA} , in LIF mode was determined as $0.023 \text{ RFU mL ng}^{-1}$ by frontal analysis of 98.5–419 ng/mL OTA solutions prepared in the separation buffer (Tris–base 10 mM, EDTA 2.5 mM, pH=8), the height of the concentration step being directly proportional to the solution concentration (height of the concentration step = $K_{OTA} \cdot C_{OTA}$).

The results obtained are illustrated Fig. 5B. The slope of the curve representing the amount of recovered-OTA versus the amount of percolated-OTA represents the overall recovery yield of the method that is equal to $93 \pm 2\%$. The limit of quantification is estimated at about 0.1 pg (signal/noise = 15). Such a quantification limit was reached by percolating 2.65 μL (application of a 100 psi pressure drop during 10 min) of a 40 ng/L OTA solution with a coefficient of variation less than 10% ($n=3$). In order to further decrease the quantification limit (expressed in concentration), the volume of sample percolated might be further increased, at the expense of global analysis time.

According to these results, the overall method, is quantitative, reproducible, with limits of detection at the ppt level, provided that the amount of OTA percolated does not exceed 30 pg. Such a limitation in OTA amount is not a constraint when considering the analysis of highly diluted real samples.

3.4.3. Analyses of real samples

The developed combined capillary was tested with different beer and wine samples. The European legislation for white wine in Rule CE N° 123/2005 voted January 26, 2005 set the maximum tolerable OTA concentration in wine to 2 ppb (2 $\mu\text{g/L}$) without giving value for beer since barley and hops were already subject to legislation. The direct analysis of OTA in beer by CE-LIF requires solutions at concentrations higher than 1 $\mu\text{g/mL}$ (result not shown). A highly efficient preconcentration step is therefore required to reach the $\mu\text{g/L}$ concentration level. The potential of the in-line preconcentration/separation approach developed in this work was first evaluated for the analysis of beer spiked at an OTA concentration of 4 ng/mL. The spiked-beer was diluted twice with binding buffer giving the working OTA concentration of 2 ng/mL. About 768 nL of diluted spiked beer were percolated for 2.2 min under a pressure assistance of 7 bar or 100 psi on the $\mu\text{-SPE}$ capillary device. As illustrated by Fig. 6A electropherogram, OTA is readily detected with a signal/noise ratio of 30, whereas no peak is detected in the raw unspiked beer. In order to check the extraction efficiency of

OTA in beer, a standard 2 ng/L OTA in the binding buffer was preconcentrated and eluted in the same conditions. The similar corrected areas measured in beer and in the standard solution (respectively 0.20 and 0.22) valid the quantitative OTA extraction in a real sample.

Similar experiments were done with white wine spiked with OTA at a concentration of 1 ng/mL. After the twofold dilution in binding buffer, the final pH was about 5, a pH too low for OTA to bind with aptamers. Thus, the pH was raised to about 9 by drops of 2 M NaOH. The middle trace of Fig. 6B shows the OTA peak obtained after the percolation of 5023 nL at a pressure drop of 5 bar. No peak was detected in the non-spiked sample (lower trace in Fig. 6B). The areas measured for the 0.5 ng/mL standard solution (upper trace in Fig. 6B) and the wine spiked at the same concentration were similar (0.3 and 0.33, respectively). However, it was noted that the repeatability of OTA retention times obtained during successive white wine analyses were poorer than with beer. Both sets of results with beer and wine samples demonstrate that the proposed combined capillary allows for the determination of OTA at the ppb level in real samples in a fully automated and accurate way.

3.4.4. Stability and lifetime of the $\mu\text{-SPE}$ unit

The stability and lifetime of the aptamer-based monolith was very satisfactory: up to 100 analyses could be done on a unique monolith over a period of two weeks, even with real samples. The only issue was clogging of the monolith after long periods of use. This issue can be easily addressed by filtering all the solutions on 0.22 μm filter before percolation. Also, the clogging of the capillary was not a fatal issue: the inlet of the monolith could be 1 mm cut to eliminate the clogged section and to restore permeability, greatly extending the lifetime of the device.

4. Conclusion

This report describes the preparation of a composite capillary. The head of the capillary was an aptamer-photoclicked silica monolith for in-line enrichment and purification. The rest of the open-tube was used for the CE separation of OTA. First, it was demonstrated by nano-LC measurements that only few minutes are required to quantitatively graft aptamers by photoclick chemistry onto vinylized monoliths. Several successive graftings increase the amount of grafted aptamers onto the preconcentration unit. For

the desired applications, a single grafting was enough to meet the required capacity for real sample analyses saving highly valuable aptamers. Moreover, the ability to localize the grafting has been demonstrated and may be useful for tailoring the surface chemistry of the empty section of the capillary if required. Elution and separation conditions were optimized for the in-line coupling of the composite capillary combining affinity preconcentration with electrophoretic separation. This in-line coupling has been then successfully used for the in-line enrichment and separation of OTA in standard solutions. We demonstrated that OTA was quantitatively captured and eluted in a single elution, provided that the OTA amount does not exceed 30 pg with our particular device. This limitation was not a constraint with regard to the highly diluted real samples to be analyzed. The linearity and the repeatability of the OTA determinations were very satisfactory as well as the limit of quantification as low as 0.1 pg of OTA percolated.

As an example, standard solutions down to 40 ng/L (ppt range) could be quantitatively analyzed percolating 2.65 μ L on the miniaturized preconcentration unit, with a total analysis time below 30 min. Finally, the applicability of this in-line and fully automated analysis with our composite capillary, was demonstrated analyzing real samples of beer and wine at the ppb level of OTA, complying with the European legislation. The limits of detection could be further lowered by increasing the percolated volume during the μ -SPE extraction step and by using an optimized excitation wavelength for best fluorescence detection.

Acknowledgment

Special thanks go to A. Berthod for carefully and critically reading the article.

References

- [1] P. Cuatrecasas, M. Wilchek, Single-step purification of avidin from egg white by affinity chromatography on biocytin-Sepharose columns, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 33 (1968) 235–239.
- [2] P. Cuatrecasas, M. Wilchek, C.B. Anfinsen, Selective enzyme purification by affinity chromatography, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 61 (1968) 636–643.
- [3] M. Uhr, D. Simpson, K. Zhao, *Affinity Chromatography: General Methods*, Academic Press, 2009, pp. 417–438.
- [4] L.G. Berruex, R. Freitag, T.B. Tennikova, Comparison of antibody binding to immobilized group specific affinity ligands in high performance monolith affinity chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24 (2000) 95–104.
- [5] C. Faye, J. Chamieh, T. Moreau, F. Granier, K. Faure, V. Dugas, C. Demesmay, O. Vandenabeele-Trambouze, In situ characterization of antibody grafting on porous monolithic supports, *Anal. Biochem.* 420 (2012) 147–154.
- [6] K. Bonroy, F. Frederix, G. Reekmans, E. Dewolf, R. De Palma, G. Borghs, P. Declercq, B. Goddeeris, Comparison of random and oriented immobilisation of antibody fragments on mixed self-assembled monolayers, *J. Immunol. Methods* 312 (2006) 167–181.
- [7] W. Clarke, J.D. Beckwith, A. Jackson, B. Reynolds, E.M. Karle, D.S. Hage, Antibody immobilization to high-performance liquid chromatography supports: characterization of maximum loading capacity for intact immunoglobulin G and Fab fragments, *J. Chromatogr. A* 888 (2000) 13–22.
- [8] K.L. Brogan, K.N. Wolfe, P.A. Jones, M.H. Schoenfish, Direct oriented immobilization of F(ab') antibody fragments on gold, *Anal. Chim. Acta* 496 (2003) 73–80.
- [9] S. Zhang, J. Wang, D. Li, J. Huang, H. Yang, A. Deng, A novel antibody immobilization and its application in immunoaffinity chromatography, *Talanta* 82 (2010) 704–709.
- [10] W. Lee, B.K. Oh, W.H. Lee, J.W. Choi, Immobilization of antibody fragment for immunosensor application based on surface plasmon resonance, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 40 (2005) 143–148.
- [11] S.D. Jayasena, Aptamers an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics, *Clin. Chem.* 45 (1999) 1628–1650.
- [12] T. Nguyen, J. Hilton, Q. Lin, Emerging applications of aptamers to micro- and nanoscale biosensing, *Microfluid. Nanofluid.* 6 (2009) 347–362.
- [13] M.R. Battig, Y. Wang, *Nucleic Acid Aptamers for Biomaterials Development*, Elsevier, Oxford, 2014, pp. 287–299.
- [14] T. Šmuc, I.-Y. Ahn, H. Ulrich, Nucleic acid aptamers as high affinity ligands in biotechnology and biosensors, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 81–82 (2013) 210–217.
- [15] C.L.A. Hamula, J.W. Guthrie, H. Zhang, X.-F. Li, X.C. Le, Selection and analytical applications of aptamers, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 681–691.
- [16] W.Y. Pengkai Qia, Y. Yanga, Y. Lia, Y. Fana, J. Chena, Z. Yanga, Q. Tua, N. Huang, Immobilization of DNA aptamers via plasma polymerized allylamine film to construct an endothelial progenitor cell-capture surface, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 126 (2015) 70–79.
- [17] H.P. Jiang, J.X. Zhu, C. Peng, J. Gao, F. Zheng, Y.X. Xiao, Y.Q. Feng, B.F. Yuan, Facile one-pot synthesis of a aptamer-based organic-silica hybrid monolithic capillary column by thiol-ene click chemistry for detection of enantiomers of chemotherapeutic anthracyclines, *Analyst* 139 (2014) 4940–4946.
- [18] S.Y. Toh, M. Citartan, S.C.B. Gopinath, T.H. Tang, Aptamers as a replacement for antibodies in enzyme-linked immunosorbent assay, *Biosens. Bioelectron.* 64 (2015) 392–403.
- [19] E. Luzzi, M. Minunni, S. Tombelli, M. Mascini, New trends in affinity sensing: aptamers for ligand binding, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 810–818.
- [20] W. Kusser, Chemically modified nucleic acid aptamers for in vitro selections: evolving evolution, *Rev. Mol. Biotechnol.* 74 (2000) 27–38.
- [21] J.R. Veraart, H. Lingeman, U.A.T. Brinkman, Coupling of biological sample handling and capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 856 (1999) 483–514.
- [22] J. Pawliszyn, *Sampling and Sample Preparation in Field and Laboratory: Fundamentals and New Directions in Sample Preparation*, Comprehensive Analytical Chemistry, vol. 37, Elsevier, Amsterdam, 2002.
- [23] F. Brothier, V. Pichon, Immobilized antibody on a hybrid organic-inorganic monolith: capillary immunoelectroextraction coupled on-line to nanoLC-UV for the analysis of microcystin-LR, *Anal. Chim. Acta* 792 (2013) 52–58.
- [24] F.W.A. Tempels, W.J.M. Underberg, G.W. Somsen, G.J. de Jong, On-line coupling of SPE and CE-MS for peptide analysis, *Electrophoresis* 28 (2007) 1319–1326.
- [25] M. Cichna, P. Markl, D. Knopp, R. Niessner, On-line coupling of sol-gel-generated immunoaffinity columns with high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 919 (2001) 51–58.
- [26] J.M. Armenta, B. Gu, P.H. Humble, C.D. Thulin, M.L. Lee, Design and evaluation of a coupled monolithic preconcentrator-capillary zone electrophoresis system for the extraction of immunoglobulin G from human serum, *J. Chromatogr. A* 1097 (2005) 171–178.
- [27] J.M. Armenta, B. Gu, C.D. Thulin, M.L. Lee, Coupled affinity-hydrophobic monolithic column for on-line removal of immunoglobulin G, preconcentration of low abundance proteins and separation by capillary zone electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 1148 (2007) 115–122.
- [28] Á. Yone, M.L. Russell, M. Grasselli, N.M. Vizioli, Iron protoporphyrin-modified monolithic support for on-line preconcentration of angiotensin prior to CE analysis, *Electrophoresis* 28 (2007) 2216–2218.
- [29] E. Hernandez, F. Benavente, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa, Evaluation of on-line solid phase extraction-capillary electrophoresis-electrospray-mass spectrometry for the analysis of neuropeptides in human plasma, *Electrophoresis* 29 (2008) 3366–3376.
- [30] F. Benavente, M.C. Vescina, E. Hernández, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa, N.A. Guzman, Lowering the concentration limits of detection by on-line solid-phase extraction-capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1140 (2007) 205–212.
- [31] J.R.E. Thabano, M.C. Bredmore, J.P. Hutchinson, C. Johns, P.R. Haddad, Capillary electrophoresis of neurotransmitters using in-line solid-phase extraction and preconcentration using a methacrylate-based weak cation-exchange monolithic stationary phase and a pH step gradient, *J. Chromatogr. A* 1175 (2007) 117–126.
- [32] R. Ramautar, C.K. Ratnayake, G.W. Somsen, G.J. de Jong, Capillary electrophoresis-mass spectrometry using in-line solid-gel concentrator for the determination of methionine enkephalin in cerebrospinal fluid, *Talanta* 78 (2009) 638–642.
- [33] Y. Chen, K. Wang, H. Yang, Y. Liu, S. Yao, B. Chen, L. Nie, G. Xu, Synthesis of sulfo/vinyl biphasic silica hybrid monolithic capillary column and its application to on-column preconcentration for capillary electrochromatography, *J. Chromatogr. A* 1233 (2012) 91–99.
- [34] R. El-Debs, A. Marechal, V. Dugas, C. Demesmay, Photopolymerization of acrylamide as a new functionalization way of silica monoliths for hydrophilic interaction chromatography and coated silica capillaries for capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A* 1326 (2014) 89–95.
- [35] A. Laaniste, A. Marechal, R. El-Debs, J. Rando, V. Dugas, C. Demesmay, Thiol-ene photoclick chemistry as a rapid and localizable functionalization pathway for silica capillary monolithic columns, *J. Chromatogr. A* 1355 (2014) 296–300.
- [36] R. El-Debs, V. Dugas, C. Demesmay, Photografting as a versatile, localizable, and single-step surface functionalization of silica-based monoliths dedicated to microscale separation techniques, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 993–1001.
- [37] Y. Ladner, G. Crétier, K. Faure, Electrochromatography in cyclic olefin copolymer microchips: a step towards field portable analysis, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 8001–8008.
- [38] J. Chamieh, C. Faye, V. Dugas, T. Moreau, O. Vandenabeele-Trambouze, C. Demesmay, Preparation and full characterization of a micro-immunoaffinity monolithic column and its in-line coupling with capillary zone electrophoresis with ochratoxin A as model solute, *J. Chromatogr. A* 1232 (2012) 93–100.
- [39] N.A. Guzman, Immunoaffinity capillary electrophoresis applications of clinical and pharmaceutical relevance, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 37–39.
- [40] F. Benavente, E. Hernández, N.A. Guzman, V. Sanz-Nebot, J. Barbosa, Determination of Human Erythropoietin by On-line Immunoaffinity Capillary Electrophoresis: A Preliminary Report, Springer, Heidelberg, 2007.
- [41] E. Giménez, F. Benavente, C. de Bolós, E. Nicolás, J. Barbosa, V. Sanz-Nebot, Analysis of recombinant human erythropoietin and novel erythropoiesis

Conclusion générale et Perspectives

La miniaturisation des techniques séparatives est une tendance qui s'est amorcée dans les années 60. Actuellement, les efforts se focalisent sur l'intégration dans un même système de plusieurs étapes analytiques complémentaires. Un des challenges porte sur le développement de systèmes séparatifs intégrant plusieurs zones de fonctionnalités complémentaires. Dans cette optique, les procédés (rapides, polyvalents et localisables) de photofonctionnalisation de phases stationnaires monolithiques, semblent parfaitement adaptés pour la préparation de ces nouveaux outils. Ce travail de thèse s'est donc focalisé sur (1) l'étude et l'optimisation de différentes approches permettant de préparer des colonnes monolithiques multimodales au format capillaire et (2) l'illustration de leur potentiel à des fins analytiques.

Une première approche de fonctionnalisation basée sur la mise en œuvre de réactions de photopolymérisation a été étudiée. Ces travaux font suite à des premiers résultats encourageants présentés dans une précédente thèse au laboratoire. De façon à démontrer la polyvalence de cette approche, des colonnes chromatographiques monolithiques fonctionnalisées avec une couche de polyacrylamide ont été développées par photopolymérisation.

Les principaux paramètres (concentration en monomère et temps d'irradiation) ont été optimisés en suivant l'évolution des propriétés chromatographiques (rétention/sélectivité et efficacité) à partir de la séparation de nucléosides en mode HILIC. Les résultats ont montré qu'une irradiation de 5 min avec un pourcentage de monomère de 5% (massique) permet d'obtenir des rétentions élevées, sans altérer les propriétés intrinsèques initiales du monolithe de silice ($H_{\min} = 6 \pm 1 \mu\text{m}$ et perméabilité = $(4,6 \pm 1,1) \cdot 10^{-14} \text{ m}^2$). Bien que l'augmentation de la quantité d'acrylamide dans le mélange réactionnel conduise à une augmentation des rétentions, une augmentation excessive, au-delà de 10% (massique) s'accompagne d'une diminution de l'efficacité. Ce comportement a été attribué à la formation de couches de polyacrylamide suffisamment épaisses en surface qui altèrent l'accessibilité des mésopores et augmentent la résistance au transfert de masse. Cependant, en restant dans une gamme de concentration en acrylamide évitant de détériorer l'efficacité intrinsèque du monolithe, les rétentions des nucléosides sur ces monolithes photopolymérisés sont supérieures ou égales à celles obtenues sur des monolithes greffés déjà rapportés dans la littérature (monolithe greffé thermiquement avec le polyacrylamide et monolithe hybride portant une fonction acrylamide).

Ce revêtement acrylamide a également été utilisé pour recouvrir la paroi interne d'un tube vide d'électrophorèse capillaire dans le but de supprimer le flux électroosmotique et de réduire les

phénomènes d'adsorption en surface. Un flux de $(2,9 \pm 1,1) \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{V}/\text{s}$ a été obtenu à pH 8,3 (tampon Tris-borate 44,5 mM) contre plus de $4 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{V}/\text{s}$ en absence de revêtement. La stabilité du greffage a été vérifiée en milieu acide (pH 3,6) et basique (pH 8,3) et ce pour des temps d'exposition de plus de 90 heures. Enfin, le potentiel de cette approche pour la préparation des colonnes multimodales a été démontré à travers la réalisation d'une colonne intégrant un segment de monolithe photofonctionnalisé avec le lauryl acrylate (C12) dans un capillaire de silice recouvert d'un revêtement polyacrylamide photopolymérisé.

Ce système miniaturisé a été utilisé pour la préconcentration et la séparation en ligne de deux neuropeptides (la Met et Leu-enképhaline) suivies de leur détection par spectrophotométrie UV. Afin de réduire les limites de détection et de les rendre compatibles avec l'analyse d'échantillons réels, une dérivation sur support a été envisagée à l'issue de l'étape de préconcentration, pour effectuer une détection par fluorescence induite par laser (LIF). Si la dérivation des peptides sur support a été optimisée (choix de l'ordre de percolation des réactifs, concentrations..), le couplage en ligne de l'ensemble des étapes n'est aujourd'hui pas achevé. En effet, malgré de multiples essais, la spécificité de la détection par LIF ne s'est pas révélée suffisante pour identifier de façon fiable les produits et sous-produits de réaction. Le couplage avec la spectrométrie de masse récemment installée au sein du laboratoire (ESI-TOF) devrait permettre de finaliser cette étude. Cependant, les résultats obtenus en dérivation « off-line » sur support, ont été concluants et pourront être transposés pour d'autres applications (par exemple pour la dérivation sur des embouts de pipette remplis de monolithe).

Si cette approche par photopolymérisation a permis d'atteindre les objectifs en termes de rapidité, polyvalence et localisation, elle a néanmoins soulevé quelques difficultés pratiques liées au contrôle de la polymérisation (taille des polymères greffés, difficulté de rincer les colonnes après polymérisation) et de la disponibilité des groupements réactifs (acrylate/méthacrylate) sur des molécules biologiques par exemple.

De façon à s'affranchir de certaines de ces limitations une approche alternative de photofonctionnalisation par « click-chemistry » sans catalyseur a été étudiée. L'efficacité des réactions de photogreffage « thiol-ene » et « ene-thiol » (selon la nature respective des fonctions immobilisées sur le support ou présentes en solution) a d'abord été comparée en suivant la rétention de composés hydrophobes sur des colonnes photogreffées avec l'octadecanethiol (C18). Les résultats ont mis en évidence des rétentions plus élevées i.e des taux de greffage plus élevés avec la version ene-thiol, c'est à dire en greffant des composés thiolés sur des monolithes vinyliés. De plus, dans cette configuration, il ne peut y avoir de polymérisation en solution (polymères susceptibles de boucher la colonne) car les fonctions polymérisables sont fixées sur le support et les fonctions activables (thiols) sont présentes en solution. Cette approche a donc été préférée pour la suite des travaux. Les principaux paramètres

de cette photofonctionnalisation ont été étudiés (nature et teneur en photo-initiateur, durée d'irradiation et concentration en monomère) en suivant l'évolution de propriétés chromatographiques (rétention/sélectivité et efficacité). Il a été montré qu'une irradiation de 5 min avec une concentration en thiol de 0,8 M était suffisante pour obtenir des rétentions maximales. Les résultats démontrent également la possibilité d'obtenir des rétentions équivalentes en réalisant des irradiations successives avec des concentrations en thiol moins importantes, ce qui est particulièrement intéressant dans le cas de réactifs onéreux et/ou disponibles en faible concentration. Les mesures d'efficacité et de perméabilité obtenues sur les colonnes photogreffées prouvent que les propriétés intrinsèques du monolithe ne sont pas altérées après le photogreffage par chimie click ($N = 160\ 000$ ptx/m). Enfin, les mesures de sélectivité stérique (k triphenylene/ k O-terphenyl) ont montré que le greffage par « photo-click » était de type monocouche, similaire au greffage par silanisation classique.

La polyvalence du procédé a ensuite été démontrée à travers le greffage de différents réactifs thiolés : l'octadécane-thiol pour la phase inverse, la cystéine pour le mode HILIC ou encore le mercaptoéthanesulfonate de sodium pour l'échange d'ions. Il a été vérifié que la concentration en thiol préalablement optimisée de 0,8 M restait valable quelle que soit la nature du thiol utilisé. Une étude plus poussée réalisée sur une colonne photogreffée avec le mercaptoéthanesulfonate de sodium a mis en évidence un double mécanisme de rétention par phase inverse/échange d'ions selon le taux de greffage sur la colonne et la composition de la phase mobile. Enfin, l'intérêt de cette approche pour la préparation des colonnes multimodales a été démontré à travers différents exemples d'applications. Deux colonnes multimodales comprenant un segment d'échange de cations en amont d'un segment greffé C18 ont été préparées avec succès pour le fractionnement et la séparation sélective de cations et de composés neutres ainsi que pour la préconcentration et la séparation en ligne de β -bloquants.

Cette nouvelle approche de fonctionnalisation a ensuite été étendue au greffage de biomolécules pour la préparation de colonnes capillaires multimodales intégrant un support d'immunoaffinité couplé en ligne avec une étape de séparation. Ainsi, une colonne multimodale composée d'une première zone remplie de monolithe photogreffé avec des aptamères et une deuxième zone vide a été préparée pour la préconcentration/séparation électrocinétique en ligne de l'Ochratoxine A. La qualité du photogreffage d'aptamères a d'abord été évaluée sur des colonnes monolithiques de 10 cm de longueur par chromatographie d'échange d'ions. L'étude des rétentions de β -bloquants a montré qu'un greffage efficace et répétable (variation inter-capillaires < 10%) était obtenu en seulement 5 min d'irradiation. La localisation du photogreffage a également été démontrée en utilisant un aptamère modifié par un marqueur coloré permettant de visualiser la zone irradiée de la colonne. Les conditions d'analyse pour la préconcentration/séparation en ligne ont ensuite été optimisées afin d'assurer une

compatibilité entre les différentes étapes du protocole (percolation/rinçage/élution/séparation). Les résultats ont montré que le protocole était linéaire pour des quantités d'OTA percolées variant de 0,1 à 10 pg avec des taux d'extraction de 93 ± 2 %. De même, une répétabilité satisfaisante $< 10\%$ a été obtenue pour l'ensemble du protocole d'analyse. Enfin, ce dispositif a été appliqué pour la préconcentration/séparation en ligne de l'OTA présente dans du vin et de la bière à des concentrations de quelques ppb avec un temps d'analyse total toujours inférieur à 30 min.

En conclusion les deux voies de photofonctionnalisation explorées ont répondu à nos objectifs en termes de rapidité, d'efficacité, de polyvalence et de localisation dans une zone délimitée. De même leur potentiel respectif pour la préparation des colonnes multimodales a clairement été démontré.

A court terme, les essais de préconcentration/dérivation/séparation en ligne de la Met et Leu-enkephaline doivent être finalisés à l'aide d'une étude complémentaire utilisant une détection par spectrométrie de masse. D'autres applications combinant des zones de chimie différentes vont être explorées notamment celle permettant le fractionnement de digestat de protéines en mode d'échange d'ions, suivi d'une séparation en phase inverse. Si l'intérêt d'un tel couplage en ligne a d'ores et déjà été démontré avec des colonnes courtes et remplies de particules, il devrait prendre tout son sens en augmentant la capacité de pics de la seconde dimension par le biais de l'allongement de la zone de séparation en phase inverse, rendue possible par la perméabilité des monolithes. De plus, une stratégie 3D MudPit (combinant une première zone de phase inverse C18 pour le dessalage des échantillons, suivie des deux zones d'échange d'ions pour le fractionnement et de phase inverse pour la séparation) devient facilement envisageable compte tenu de la localisation de la photofonctionnalisation.

A moyen terme, l'approche du photografting ayant été validée, et les couples de fonctions photoactivables identifiés avec leurs avantages et inconvénients respectifs, il convient maintenant de développer un, voire des monolithes hybrides possédant directement à leur surface les fonctions polymérisables et/ou activables photochimiquement. Cet objectif pourra être atteint en développant une synthèse de type « one-pot process » d'un monolithe de silice hybride générique qui permettra de s'affranchir de l'étape de préfonctionnalisation utilisée au cours de ce travail.

ANNEXES

Annexe 1 : Préparation d'une solution de Met dérivée

Une solution de Met dérivée à 1 μM est préparée en ajoutant :

- 250 μL d'une solution de NDA à 2,9 mM dans un mélange 50/50 (ACN/eau)
- 50 μL de tampon phosphate 100 mM pH 7,2
- 50 μL de NaCN à 43 mM dans l'eau
- 100 μL de Met-Enk à 0,5 mg/mL dans l'eau.

La solution est ensuite placée dans l'obscurité pendant 15 min afin d'assurer la dérivation complète de la Met. La solution est ensuite diluée pour obtenir la concentration souhaitée.

Annexe 2 : Optimisation des conditions d'analyse de la Met dérivée en CZE

Afin d'optimiser les conditions d'analyse de la Met dérivée en CZE, plusieurs paramètres ont été étudiés : conditions de séparation, linéarité du signal de fluorescence en fonction de la concentration et temps maximal d'injection.

- **Conditions de séparation CZE de la Met dérivée**

Afin de s'assurer de la détection et de la séparation de la Met dérivée (du FEO) en tube vide, une solution de Met préalablement dérivée (**Annexe 1**) est préparée, diluée 200 fois dans l'eau puis injectée en CZE. Les paramètres opératoires (nature et pH du tampon, tension) ont été optimisés de façon à séparer la Met dérivée du flux électroosmotique. L'électrophorégramme obtenu après optimisation est présenté **Figure 53**.

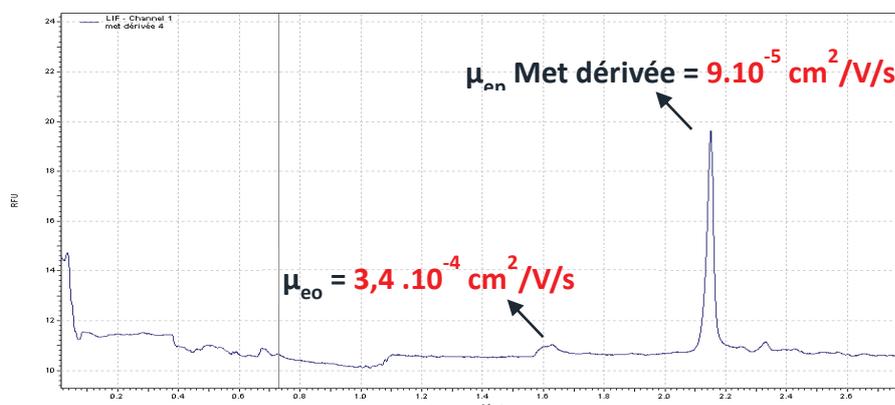


Figure 53: Analyse CZE de la Met préalablement dérivée à 5 nM. Tampon de séparation : Phosphate sodium 22,5 mM pH 7 avec 10% d'ACN. Tension +15 kV. Longueur totale du capillaire = 30 cm. Longueur Injection-Détection = 20 cm. Injection 0,1 psi 15 sec. Détection LIF ($\lambda_{ex} = 410 \text{ nm}$).

- **Linéarité de fluorescence**

La linéarité de la réponse de fluorescence en CZE est un paramètre clé à vérifier puisqu'il nous permettra de conclure sur la qualité de la dérivation sur support et de quantifier les résultats. Pour ce, un volume constant de Met préalablement dérivée en solution (**Annexe 1**) est injecté à différentes concentrations dans les conditions d'analyse optimisées précédemment en CZE. La **Figure 54** représentant l'aire du pic de Met dérivée en fonction de la concentration en Met dérivée, met en évidence la linéarité de la réponse de fluorescence pour des concentrations variant de 0,1 à 14,3 $\mu\text{g/mL}$ et ce jusqu'à des hauteurs de pics de 180 RFU.

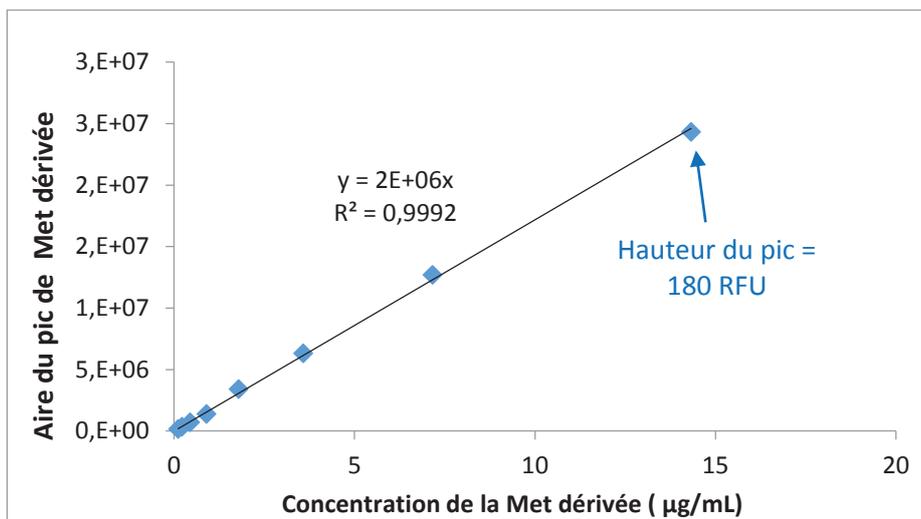


Figure 54: Aire du pic de Met dérivée en fonction de la concentration en Met dérivée. Tampon de séparation : Phosphate sodium 22,5 mM pH 7 avec 10% d'ACN. Tension +15 kV. Longueur totale du capillaire = 30 cm. Longueur Injection-Détection = 20 cm. Injection fixe à 0,1 psi 10 sec. Dilutions des solutions dans 50/50 MeOH/eau. Détection LIF ($\lambda_{ex} = 410 \text{ nm}$).

- **Injection maximale en CZE**

Afin d'augmenter le rapport signal/bruit du pic de Met dérivée, il est possible d'augmenter le volume d'injection en CZE (par le biais de la durée d'injection). Cependant, le volume injecté génère de la dispersion externe et au-delà d'un certain volume, l'élargissement du pic associé est non négligeable par rapport à la dispersion liée à la séparation. Le cas échéant, cet élargissement se fait au détriment de la hauteur des pics et le gain en hauteur de signal (conditionnant le rapport signal/bruit), n'est plus proportionnel à l'augmentation du volume injecté. Ce paramètre a donc été étudié en injectant à 0,1 psi pendant différents temps, une solution de Met préalablement dérivée à 100 ng/mL. Les hauteurs de pic obtenues en fonction du temps d'injection sont présentées **Figure 55**.

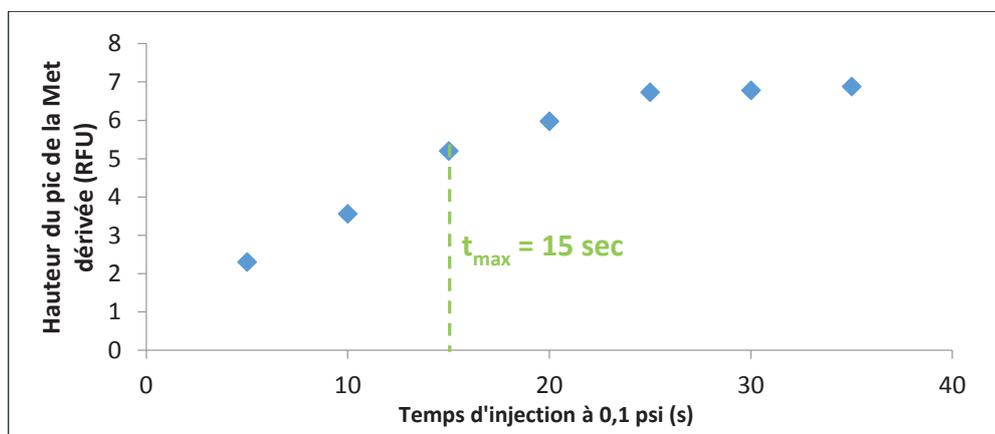


Figure 55: Etude du temps maximal d'injection en CZE à 0,1 psi. Solution de Met dérivée à 100 ng/mL dans 50/50 MeOH/eau. Tampon de séparation : Phosphate sodium 22,5 mM pH 7 avec 10% d'ACN. Tension +15 kV. Longueur totale du capillaire = 30 cm. Longueur Injection-Détection = 20 cm. Détection LIF ($\lambda_{ex} = 410 \text{ nm}$).

La courbe obtenue présente une première partie linéaire, pour laquelle le signal augmente de façon proportionnelle au volume injecté, puis atteint un palier à environ 15 secondes d'injection (25 nL injectés).

D'après la courbe, une injection de plus de 15 secondes à 0,1 psi ne permet plus d'augmenter la hauteur du pic. Une injection maximale de 0,1 psi 15 secondes a donc été choisie.

Annexe 3 : Préparation d'une colonne multimodale avec photo-greffage orienté de fragments d'anticorps

Cette annexe présente les essais réalisés pour la préparation d'une colonne multimodale avec photo-greffage orienté de fragments d'anticorps. L'objectif est de fragmenter spécifiquement les anticorps au niveau de leur pont disulfure central afin de pouvoir greffer les fragments d'anticorps « LH » par photo-click, via leur fonction thiol, sur le support monolithique pré fonctionnalisé avec des fonctions alcènes (Figure 56).

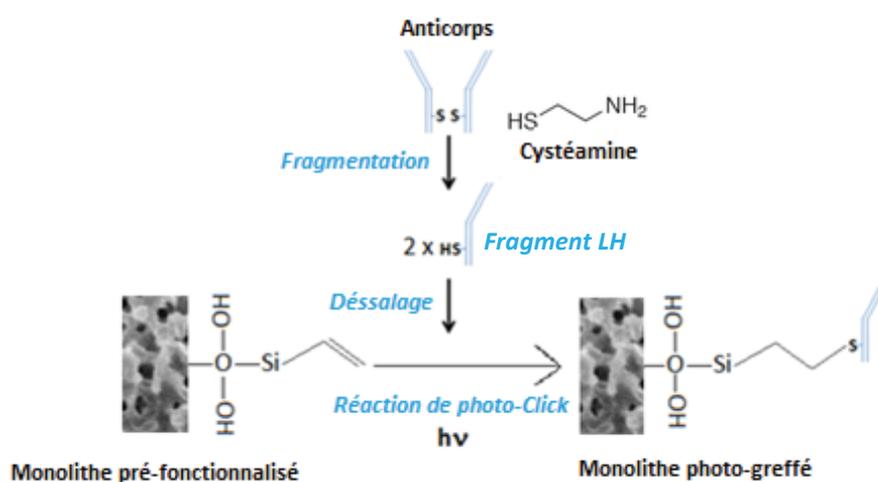


Figure 56: Présentation des différentes étapes de préparation du support d'immunoaffinité.

La première partie est consacrée à la préparation des anticorps (fragmentation, purification, étude de stabilité) et au greffage des fragments sur le monolithe de silice.

I. Optimisation des conditions de préparation et de greffage des anticorps avec des IgG non spécifiques de lapin

Pour des raisons de coût, toute l'optimisation de préparation et de greffage des anticorps a été réalisée en utilisant des IgG non spécifiques de lapin, bien moins onéreux. Une fois le protocole validé, l'objectif est de le transposer et de vérifier son efficacité sur des anticorps spécifiques anti-OTA.

I.1. Préparation des anticorps pour le greffage

i. Fragmentation des anticorps

Le greffage par « thiol-ene photoclick chemistry » implique la réaction d'un thiol avec un vinyle. Un monolithe de silice pré-fonctionnalisé vinyle sera utilisé comme support chromatographique tandis que les fonctions thiols seront apportées par les anticorps après réduction sélective de leur pont

disulfure central. En effet, la réduction du pont disulfure central permet de garder intacts les sites de reconnaissance qui assurent l'activité des fragments d'anticorps. Parmi les nombreux modes de fragmentation existants, la fragmentation par la cystéamine conduit aux fragments rIgG répondant spécifiquement à ces critères (**Figure 57**). Chaque fragment possède un site de reconnaissance (un paratope) et pourra se lier avec une molécule cible (rapport Paratope/Cible = 1/1).

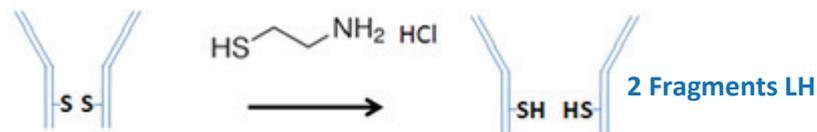


Figure 57: Réaction de fragmentation des anticorps par la cystéamine

Caractérisation de la fragmentation par Electrophorèse Capillaire sur Gel (CGE) :

La nature des fragments obtenus après fragmentation est vérifiée en analysant la solution de fragmentation par Electrophorèse Capillaire sur Gel (CGE), qui permet de séparer rapidement les protéines en fonction de leur taille, reliée à leur poids moléculaire. La CGE permet, par rapport à l'électrophorèse sur gel au format classique, de travailler sur de faibles volumes d'échantillon et, pour une sensibilité comparable, de réduire les temps d'analyse. La méthode est basée sur la dénaturation et la complexation des protéines par le laurylsulfate de sodium (ou SDS pour *Sodium Dodécyl Sulfate*), tensioactif chargé négativement, qui se lie aux protéines selon un ratio constant (environ 1 molécule de SDS pour 2 acides aminés). Cette complexation confère à toutes les protéines un rapport (taille/charge) constant. La migration sous champ électrique et en présence d'un gel (jouant le rôle de tamis) permet ainsi la séparation des protéines uniquement en fonction de leur poids moléculaire (les protéines ayant un poids moléculaire plus faible (taille plus petite) migreront plus rapidement).

Afin de pouvoir déterminer la masse des fragments, un échantillon contenant des standards de taille (8 protéines de 10 000 à 250 000 Da) est d'abord analysé par CGE (Détails dans le **Protocole 1**). Cette analyse permet d'obtenir un électrophorégramme présentant 8 pics (**Figure 59**) compris entre 3 et 8 minutes. Les temps de migration permettent de calculer la mobilité apparente pour chaque marqueur de taille grâce à la formule suivante : $\mu \text{ (cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}) = \frac{l \times L}{t \times V}$ avec l la longueur injection-détection, L la longueur totale du capillaire, V la tension appliquée et t le temps de migration. Une courbe de calibration est obtenue en traçant la masse de la protéine (en Dalton) en fonction de l'inverse de la mobilité (**Figure 58**). L'équation de la courbe polynomiale permet ensuite de donner une approximation de la taille de fragments inconnus à partir de leur temps de migration.

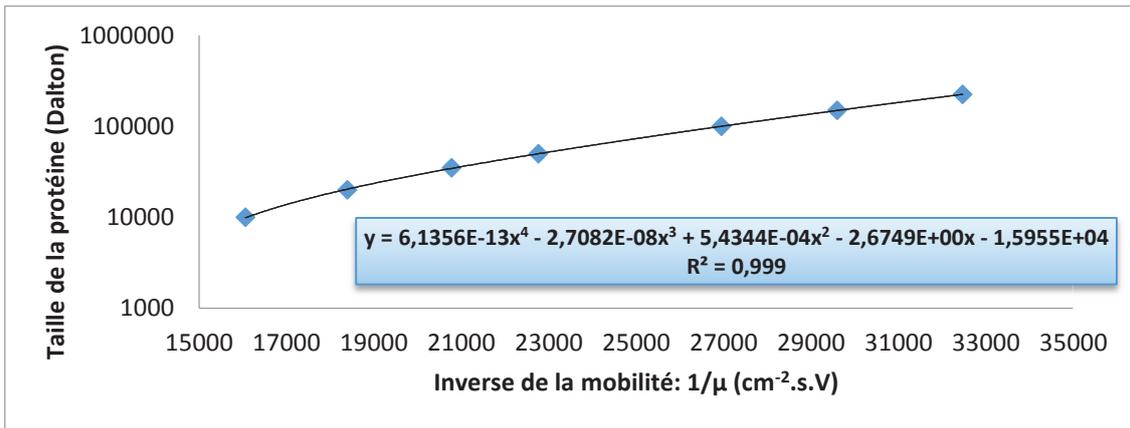


Figure 58: Courbe de calibration CGE obtenue à partir des standards de taille

Conditions d'analyse CGE : l=8,5 cm, L=33 cm, U=+25kV, Injection : SI (+5kV, 5 sec), Standards (+5 kV, 45 sec), $\lambda = 254$ nm
Préparation de la solution pour l'analyse CGE : 10 μ L de standards de taille (kit Beckman), 85 μ L SDS (1%), 2 μ L SI ,5 μ L Cystéamine, chauffés 3 min à 100°C

Pour s'assurer de la cohérence de l'analyse par CGE, une solution d'anticorps de lapin totalement fragmentés au *Tris*(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) est également préparée. Seuls les fragments L et H sont obtenus au cours de cette fragmentation. Ainsi, l'analyse par CGE de cette solution permettra de vérifier si l'on obtient bien deux pics correspondant à des fragments d'environ 25 kDa (pour les fragments L) et 50 kDa (pour les fragments H). Un standard interne (SI) de 14 kDa est injecté à chaque analyse pour vérifier que les temps de migration ne varient pas au cours du temps. Les différents électrophorégrammes présentés **Figure 59** mettent en évidence la présence d'un seul pic de taille comprise entre 150 kDa et 225 kDa pour l'analyse de l'anticorps entier et de deux pics d'environ 21 kD et 52 kD dans le cas de la fragmentation au TCEP.

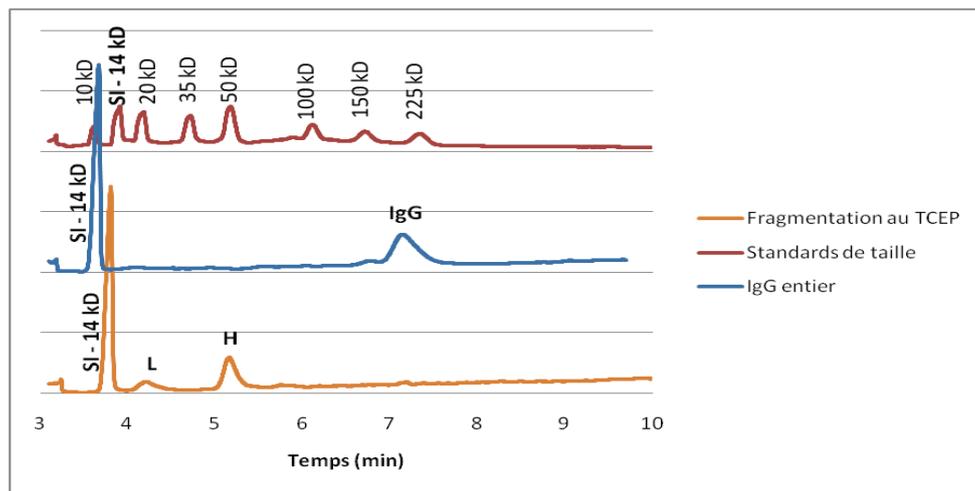


Figure 59: Electrophorégrammes (obtenus par CGE) des standards de taille, de l'anticorps entier et de la solution d'anticorps fragmentés au TCEP

Conditions de la fragmentation au TCEP : 8,4 mg d'IgG lapin + 8 mg de TCEP dans 1 mL d'eau, chauffé 15 minutes à 70°C
Conditions d'analyse CGE : l=8,5 cm, L=33 cm, U=+25kV, Injection : SI (+5kV, 5 sec), Echantillon (+5 kV, 45 sec), $\lambda = 254$ nm
Préparation des solutions pour l'analyse CGE :
 Courbe rouge: 10 μ L de standards de taille (kit beckman), 85 μ L SDS (1%), 2 μ L SI ,5 μ L Cystéamine, chauffés 3 min à 100°C
 Courbe bleue : 10 μ L de solution d'IgG lapin (3,8mg/mL), 90 μ L SDS (1%) chauffés 3 min à 100°C
 Courbe orange : 10 μ L de solution d'IgG lapin fragmentés au TCEP (3,8mg/mL), 90 μ L SDS (1%), chauffés 3 min à 100°C

Les anticorps non spécifiques de lapin ont ensuite été fragmentés à la cystéamine en suivant le protocole décrit par le fournisseur Thermo Scientific [1] qui préconise d'ajouter de la cystéamine dans 1 mL d'une solution d'anticorps en proportions massiques 10/6 (Anticorps/Cystéamine) et d'agiter 90 minutes à 37°C.

L'électrophorégramme obtenu dans ces conditions ([IgG] = 3,9 mg/mL, fragmentation 90 min à 37°C, rapport massique Anticorps/Cystéamine de 10/6) présente un pic majoritaire au temps de migration de l'anticorps entier et met en évidence l'apparition d'un second pic minoritaire correspondant au fragment d'intérêt rIgG (ou LH). Par conséquent, les conditions « standard » du protocole ne réduisent que très partiellement les anticorps. Pour que la réaction soit plus complète, les conditions expérimentales « standard » ont été modifiées en augmentant d'une part la température (à 40°C) et d'autre part le temps de réaction (à 2h). L'électrophorégramme obtenu après fragmentation dans les nouvelles conditions met en évidence la disparition du pic de l'anticorps entier et l'apparition du pic majoritaire des fragments LH (taille calculée d'environ 81 kDa). Cependant, la présence en minorité de pics correspondants aux fragments L et H, montre un début de fragmentation partielle des fragments LH. Des conditions plus fortes de fragmentation ne peuvent donc être envisagées.

Par conséquent, la suite des essais a été réalisée avec ces nouvelles conditions de fragmentation qui conduisent à une réduction totale des anticorps de départ, tout en limitant la production des fragments L et H.

ii. Purification des fragments rIgG

A l'issue de la fragmentation, une étape de purification est nécessaire afin d'éliminer l'excès de cystéamine qui contient également une fonction thiol et qui pourrait par conséquent se greffer au support au détriment des fragments d'anticorps. Cette purification est réalisée par chromatographie d'exclusion stérique sur des colonnes commerciales dites de « dessalage ». Le protocole consiste à déposer 1 mL de la solution d'anticorps fragmentés dans la colonne remplie de résine. L'élution se fait ensuite par centrifugation à 4700 tours/min pendant 2 min. Les petites molécules telles que la cystéamine pénètrent dans les pores de la résine alors que les grosses molécules telles que les fragments d'anticorps sont exclues (seuil > 7000 Da) et donc éluées dès la première fraction d'élution. Les fractions suivantes sont obtenues par rinçages successifs de la colonne avec 2,5 mL d'un tampon phosphate (Na₂HPO₄ 71 mM + NaCl 150 mM + EDTA 5 mM). Chaque élution est réalisée à 4700 tours/min pendant 2 min.

Afin de déterminer le rendement et la pureté des fragments récupérés en solution après purification, des mesures d'absorbances à 280 nm (longueur d'onde d'absorption spécifique de la liaison peptidique des protéines) et un test colorimétrique spécifique des fonctions thiol (test d'Ellman [2]) ont été réalisés avant et après l'étape de dessalage. Le test d'Ellman consiste à introduire le réactif d'Ellman (5,5'-dithio-bis-[2-nitrobenzoic acid] ou DTNB) incolore dans les différentes fractions d'élution. En présence de thiols libres en solution, le réactif d'Ellman réagit avec les thiols pour former un produit coloré jaune (le 2-nitro-5-thiobenzoic acid ou TNB) dosé à 412 nm (**Figure 60**).

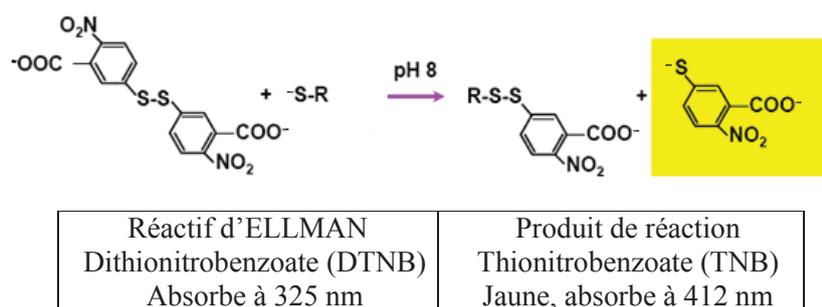


Figure 60: Principe de la réaction d'Ellman.

La quantification en thiol de chaque fraction est obtenue à l'aide d'une droite d'étalonnage (Détails dans le **Protocole 2**). La **Figure 61** représente l'évolution de l'absorbance à 280 nm et de la quantité de thiols présente dans les 3 premières fractions d'élution.

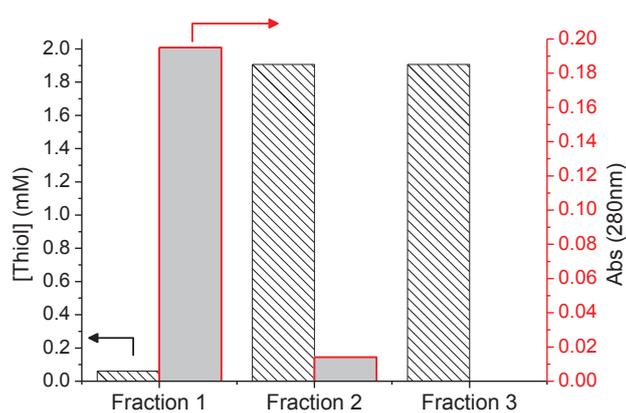


Figure 61: Concentrations en thiols et mesures d'absorbances à 280 nm des fractions après purification d'une solution d'anticorps fragmentés à la cystéamine (C=1,5mg/mL et V=1mL).
Conditions de la fragmentation à la cystéamine : 2h, 40°C avec proportion massique Anticorps/Cystéamine de 10/6

L'absorbance à 280 nm proche de 0,2 pour la première fraction chute d'un facteur supérieur à 10 dans la fraction suivante et est négligeable dans la troisième fraction récupérée. A l'inverse, la quantité de

thiols libres en solution est très faible dans la première fraction et augmente fortement dans les fractions suivantes. Ces résultats montrent que la majorité des anticorps fragmentés se trouve dans la fraction 1 (forte absorption à 280 nm) alors que l'excès de cystéamine est récupéré dans les fractions suivantes (forte concentration en thiol).

La comparaison des absorbances à 280 nm de la solution d'anticorps fragmentés avant et après purification permet de calculer un taux de récupération de l'ordre de 88% dans la première fraction à l'issue de la purification. Seule la première fraction sera conservée pour la suite des essais.

La stabilité des solutions de fragments rIgG obtenus a ensuite été étudiée. En effet, alors que l'étape de greffage ne requiert que quelques microlitres de solution d'anticorps fragmentés, ces étapes de réduction et de purification sont réalisées, pour des raisons pratiques, sur des volumes supérieurs à 500 μ L, qu'il serait souhaitable de pouvoir conserver (pour des raisons économiques liées au coût des anticorps).

Afin de vérifier la stabilité de la solution d'anticorps fragmentés à la cystéamine, un aliquot est analysé à intervalle de temps régulier, par CGE, pour vérifier la nature des fragments. Quelques électrophorégrammes sont présentés **Figure 62**.

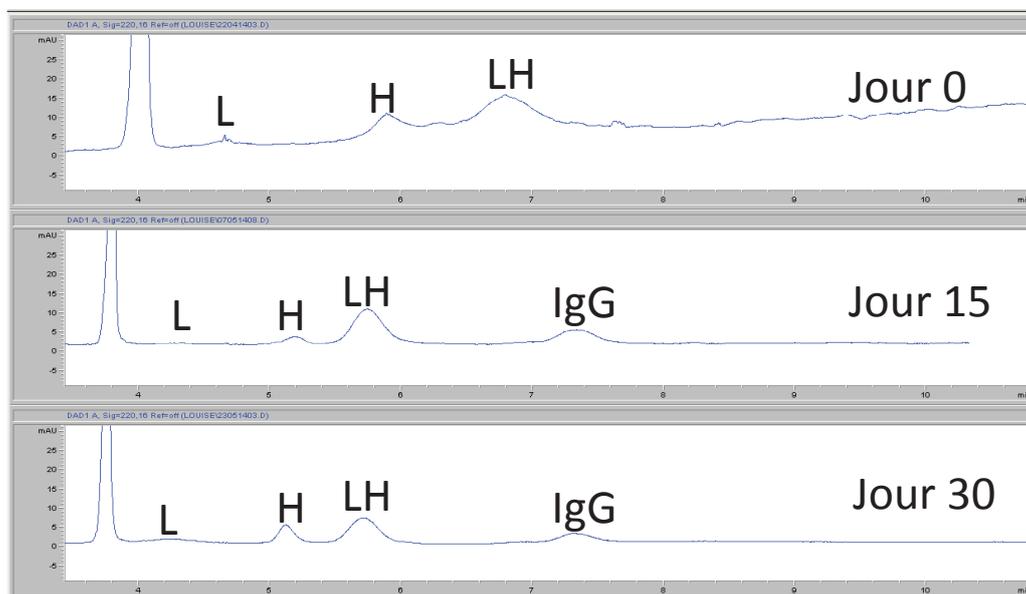


Figure 62: Etude de la stabilité des anticorps fragmentés en solution dans le temps
Solution purifiée d'anticorps fragmentés à la cystéamine (C=3,9mg/mL) analysée le jour de la fragmentation, 15 jours et 30 jours après.

Conditions d'analyse CGE : l=8,5 cm, L=33 cm, U=+25kV, Injection : SI (+5kV, 5sec), Echantillon (+5 kV, 45 sec), λ = 254 nm

Conditions de la fragmentation à la cystéamine : 2h, 40°C avec proportion massique Anticorps/Cystéamine de 10/6

D'après les résultats présentés **Figure 62**, les anticorps fragmentés et purifiés peuvent être conservés à -18°C pendant une durée maximale d'un mois. Au-delà de cette durée, l'analyse par CGE montre une

recombinaison partielle des deux fragments rIgG (ou LH) ainsi qu'une augmentation des signaux des fragments L et H, traduisant une dégradation partielle des fragments LH.

I.2. Greffage orienté des fragments d'anticorps par photo-click chemistry

L'utilisation de la photo-click chemistry devrait permettre le greffage orienté des fragments rIgG via leur fonction thiol centrale. Les différentes étapes de préparation du support d'immunoaffinité sont présentées **Figure 56**. Bien que la photo-click ait été préalablement optimisée pour des petites molécules chimiques (Résultats présentés dans le chapitre 2), il est nécessaire de réétudier les conditions du photogreffage en raison de certaines spécificités : la taille importante des anticorps réduits, les faibles concentrations des solutions d'anticorps disponibles et la nécessité de travailler dans un milieu aqueux non dénaturant qui impose d'utiliser un initiateur photochimique soluble dans l'eau.

Pour chaque condition étudiée, l'efficacité du greffage a été évaluée par la méthode au bleu de Coomassie (CBB). Cette technique, adaptée du test de Bradford, permet d'évaluer le nombre total de fonctions amines greffées sur le support et d'en déduire ensuite la quantité de protéine correspondante. Elle peut être extrapolée pour la quantification des anticorps greffés sur le monolithe, sachant qu'un anticorps contient en moyenne 140 fonctions amines réparties sur les différents acides aminés soit environ 70 fonctions amines par fragment rIgG.

La méthode au bleu de Coomassie se décompose en trois étapes (**Figure 63**, Détails dans le **Protocole 3**) :

- **1^{ère} étape** : Les amines greffées sur le support solide sont protonées à l'aide d'un tampon acide, appelé T₁.
- **2^{ème} étape** : Le bleu de Coomassie, solubilisé en milieu acide, est ajouté en excès afin de former des liaisons non covalentes entre les groupes SO₃⁻ et les amines protonées par interactions électrostatiques et hydrophobes.
- **3^{ème} étape** : Une fois l'excès de bleu éliminé par lavage en condition acide, les amines sont déprotonées par passage en milieu basique en présence de méthanol (tampon de décoloration T₂), détruisant ainsi les interactions électrostatiques et hydrophobes. La quantité de bleu piégée par les fonctions amines est alors libérée dans la solution et sa concentration peut être mesurée par absorbance. Il est ensuite possible de quantifier le nombre d'amines greffées sur le support (il a été démontré qu'une fonction amine piège une molécule de bleu).

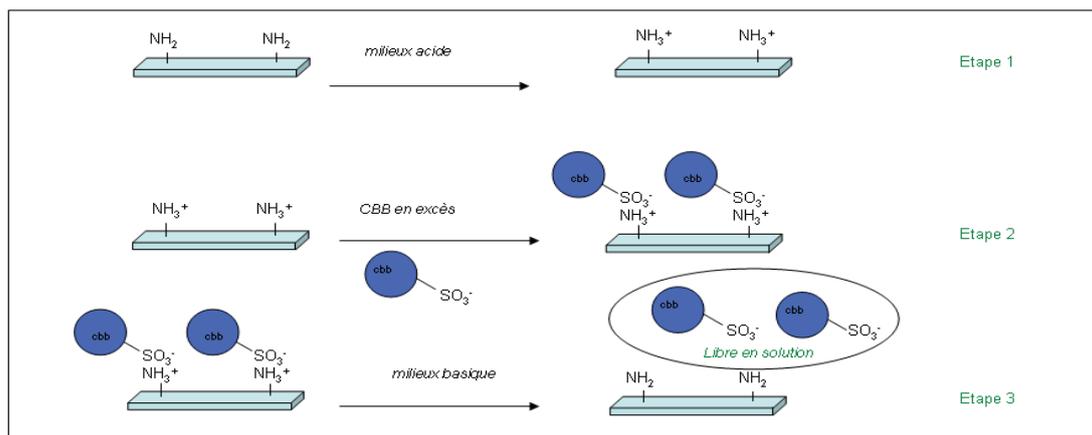


Figure 63: Méthode de dosage au bleu de Coomassie d'amines greffées sur support solide.

La quantification du nombre d'anticorps greffés sur support est réalisée en modifiant légèrement la méthode classique de coloration/décoloration au bleu de Coomassie présentée précédemment. Des courbes de percée sont réalisées en percolant en continu la solution de CBB sur une colonne monolithique de silice greffée avec les fragments d'anticorps (**Figure 64**). La quantité de CBB fixée est déterminée à partir du volume de CBB nécessaire pour saturer la colonne. Ce volume de CBB est calculé en comparant l'écart de temps entre le temps mort et le temps de détection du signal de bleu. La préparation des différentes solutions utilisées pour la méthode CBB est détaillée ci-dessous.

Le transfert de la méthode CBB sur support de silice a nécessité une optimisation des conditions. En effet, il est indispensable dans ce cas d'éliminer l'adsorption non spécifique du CBB sur le support. Ainsi, différents pourcentages de solvant, méthanol et/ou acétonitrile, ont été ajoutés à la solution de CBB de façon à éliminer l'adsorption non spécifique sur le monolithe vinyle (sans anticorps), tout en évitant de dégrader les interactions spécifiques. Après optimisation des conditions de percolation du CBB (30 % acétonitrile et 7 % méthanol), le signal obtenu en percolant le CBB sur un monolithe vinyle est observé au temps mort (t_m), ce qui montre qu'il n'y a plus d'interactions non spécifiques sur le support non greffé. A l'inverse, sur une colonne monolithique photogreffée avec des fragments d'anticorps, la détection du signal lié au CBB est bien différée par rapport au temps mort et démontre la présence d'anticorps greffés. Cette différence de temps (et par conséquent de volume DV) entre le temps mort et l'augmentation de l'absorbance liée à la détection du CBB (temps à mi-hauteur du palier) permet de calculer la quantité de CBB fixée et donc le nombre de fonctions amines greffées sur le monolithe et de remonter à la quantité de fragments greffés.

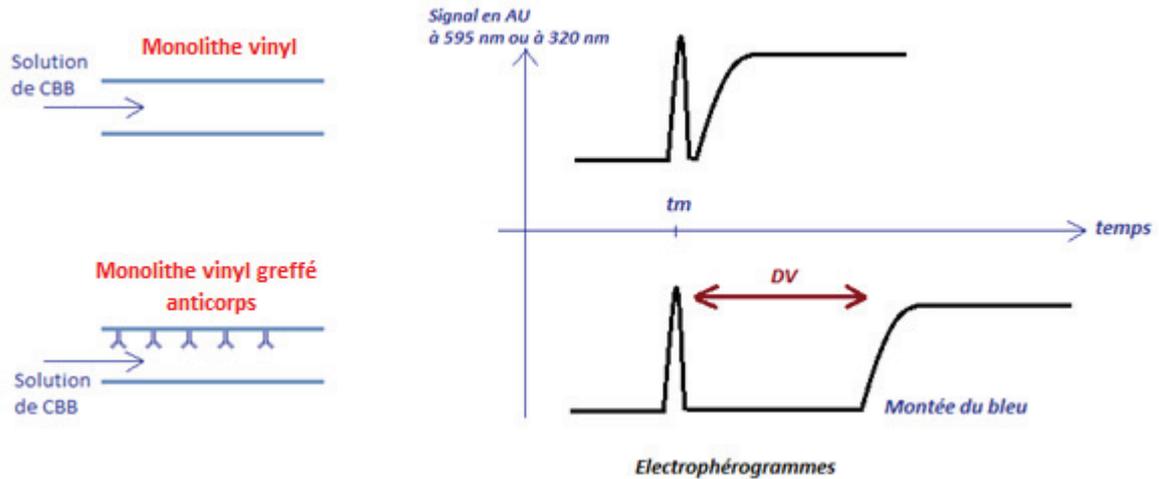


Figure 64: Représentation schématique du protocole de dosage des fonctions amines (anticorps) par coloration au CBB.

La quantité de CBB adsorbée est calculée à partir de la formule ci-dessous :

$$\text{Quantité de bleu adsorbée (ng)} = DV * [c]_{CBB}$$

Avec $DV = \text{Débit} \times (\text{temps d'arrivée du palier du bleu} - tm)$ et $[c]_{CBB}$: concentration de la solution de CBB.

Une fois les colonnes capillaires monolithiques greffées avec les fragments d'anticorps, 2 cm sont coupés et raccordés à des capillaires vides pour réaliser la mesure au CBB (contraintes liées à l'appareillage). Le schéma du montage est présenté **Figure 65**.

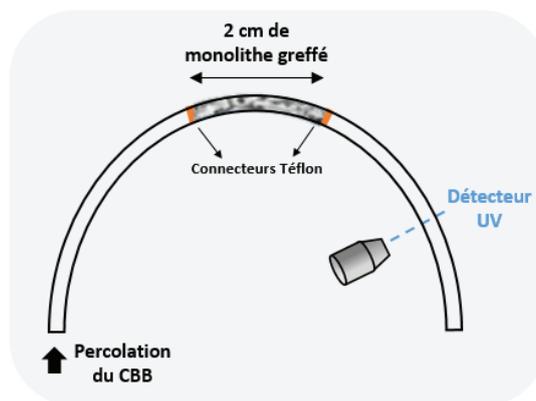


Figure 65: Représentation schématique du montage réalisé pour la mesure au CBB de colonnes capillaires monolithiques greffées avec des fragments d'anticorps.

Cette méthode peut être extrapolée pour la quantification des anticorps greffés sur les monolithes, sachant qu'un anticorps contient en moyenne 140 fonctions amines réparties sur les différents acides aminés soit environ 70 fonctions amines par fragment IgG. Elle présente néanmoins l'inconvénient de dénaturer les anticorps, rendant les supports inutilisables pour des études ultérieures de

reconnaissance antigène – anticorps (d'où l'intérêt d'utiliser des anticorps non spécifiques de lapins moins coûteux pour les essais préliminaires).

Un premier criblage des conditions de photogreffage a été réalisé avec des anticorps totalement réduits au TCEP pour des raisons pratiques. Premièrement, cette réduction totale ne nécessite pas d'étape de purification avant photogreffage et deuxièmement, elle permet d'obtenir une quantité de fonctions thiols plus importante (obtention des fragments L et H uniquement, tous deux présentant une fonction thiol). Une fois les conditions ciblées, les essais de greffage ont été réalisés sur des anticorps de lapin réduits à la cystéamine.

Etude de la réaction de photogreffage d'anticorps de lapin réduits au TCEP

Une des spécificités de l'immobilisation de molécules biologiques (comme les anticorps) concerne leur faible concentration dans les solutions de greffage, de l'ordre du mg/mL (ou μM), nettement inférieure aux concentrations utilisées (0,2 à 1M) pour le photogreffage en mode statique de petites molécules. Pour compenser cette faible concentration, un greffage en mode dynamique (percolation en continu de la solution d'anticorps fragmentés dans le capillaire pendant l'irradiation) a été envisagé (Détails dans le **Protocole 4**).

Les premiers tests de photogreffage ont porté sur l'influence du temps d'irradiation. La **Figure 66** représente l'évolution de la quantité de CBB mesurée après différents temps de photogreffage. Ces tests ont été réalisés en dynamique, c'est-à-dire en percolant en continu (Vitesse d'environ 0,1 cm/s) une solution d'anticorps totalement fragmentés au TCEP à environ 8,4 mg/mL.

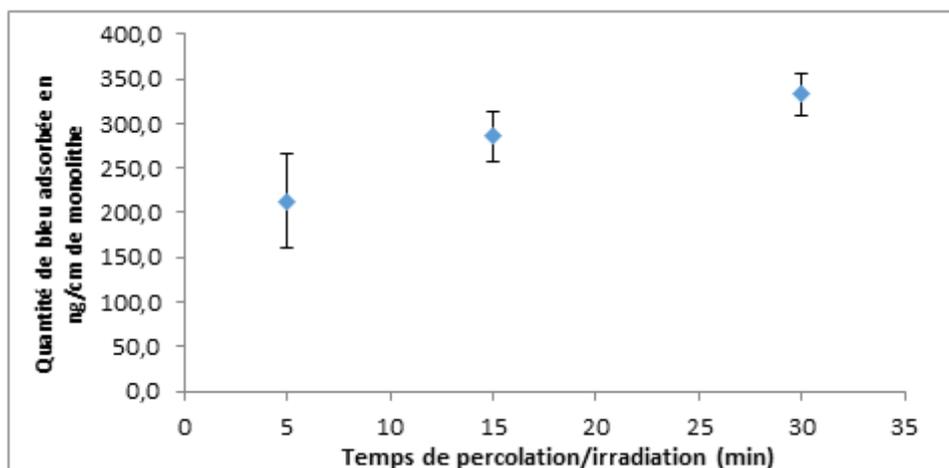


Figure 66: Evolution du signal de CBB mesuré sur des capillaires monolithiques de 2 cm photogreffés avec une solution d'anticorps totalement fragmentés à 8,4 mg/mL en fonction du temps de percolation /irradiation.

Conditions de la fragmentation au TCEP : 8,4 mg d'IgG + 8 mg de TCEP dans 1 mL d'eau, chauffés 15 minutes à 70°C
Percolation des solutions T1, CBB et T3 à 0,2 cm/s, n=4 répétitions pour chaque point

La quantité de CBB fixée/cm de monolithe augmente de façon régulière avec le temps de percolation/irradiation). Les valeurs obtenues pour des temps de percolation/irradiation de 5 à 30 min témoignent de l'efficacité du greffage malgré les faibles concentrations utilisées. Un palier d'environ 300 ng de CBB adsorbés par centimètre de monolithe est atteint pour une percolation/irradiation d'environ 15 min. Il n'est donc pas nécessaire de greffer (en dynamique) plus de 15 minutes pour atteindre le taux maximum de greffage avec une concentration initiale en anticorps de 8,4 mg/mL.

Afin de vérifier si la concentration en anticorps est un facteur limitant, la solution d'anticorps fragmentés utilisée précédemment (8,4 mg/mL) a été diluée par 10. Les résultats obtenus grâce à la méthode au CBB sont comparables à l'issue de 15 minutes d'irradiation (263 ng CBB/cm de monolithe).

Ce point est important pour la suite des essais car les solutions d'anticorps spécifiques anti-OTA qui seront utilisées pour le couplage en ligne seront préférentiellement à des concentrations < 1 mg/mL. Les conditions de greffage déterminées sur des anticorps totalement réduits au TCEP ont ensuite été transposées à des anticorps réduits à la cystéamine (fragments rIgG).

Etude de la réaction de photogreffage des anticorps de lapin réduits à la cystéamine

Les premiers tests de greffage d'anticorps fragmentés au TCEP ont permis de valider que la réaction de photo-click permettait de fixer des fragments à partir d'une solution diluée et ce en peu de temps (15 min en greffage dynamique). Cependant, les conditions déterminées précédemment doivent être vérifiées/adaptées pour les fragments rIgG d'intérêt.

Influence du temps de greffage

Le greffage en mode dynamique des anticorps fragmentés à la cystéamine a révélé des problèmes récurrents de bouchage des capillaires qui n'étaient pas apparus avec les anticorps fragmentés au TCEP. Le volume de solution d'anticorps percolé est alors faussé et varie d'une percolation à l'autre. Le greffage en mode dynamique a été remplacé par un greffage dit « séquentiel » qui consiste à remplir la colonne avec la solution d'anticorps, fermer les extrémités et irradier la colonne pendant 10 minutes (Détails dans le **Protocole 4**). L'opération est ensuite répétée plusieurs fois avec à chaque fois renouvellement de la solution d'anticorps dans la colonne. Par exemple, un greffage de 30 min correspond en réalité à 3 greffages séquentiels successifs de 10 min.

Il a été vérifié qu'une quantité maximale de CBB de l'ordre de 500 ng/cm (correspondant à une quantité maximale de paratopes de 8,4 pmol/cm dans le cas d'une fragmentation 100% spécifique) est

atteinte à partir de trois greffages séquentiels successifs (3×10 minutes) (Concentration en anticorps fragmentés dans la solution de greffage de 3,6 mg/mL).

Pour confirmer la nature covalente du greffage, deux capillaires ont été photogreffés de façon similaire (3×10 min) à l'exception de la présence/absence du photoinitiateur dans la solution d'anticorps fragmentés. Les colonnes photogreffées ont ensuite été lavées 2 heures au SDS (1%) à 80°C puis 2 heures à l'eau de façon à discriminer les fragments adsorbés des fragments fixés de façon covalente. Dans le cas du capillaire exposé aux anticorps en absence initiateur, la quantité de CBB fixée par le monolithe après lavage au SDS est comparable à celle du blanc. Dans le cas du greffage avec initiateur, la quantité de CBB retenue par le monolithe reste équivalente avant et après lavage au SDS, ce qui confirme la covalence du greffage.

Tous les essais réalisés jusqu'alors sur des anticorps non spécifiques de lapins ont dû être ensuite transposés aux anticorps spécifiques anti-OTA en vue de l'analyse en ligne de l'OTA.

II. Adaptation du protocole de préparation et greffage des anticorps sur des IgG spécifiques anti-OTA

II.1. Vérification de la fragmentation par CGE

Dans un premier temps, la fragmentation des anticorps anti-OTA par la cystéamine a été réalisée dans les conditions préalablement optimisées avec les anticorps de lapin (2h à 40°C avec un rapport massique Anticorps/Cystéamine 10/6). Cependant, à l'issue de cette fragmentation, l'analyse par CGE de la solution d'anticorps fragmentés a mis en évidence la présence d'un pic unique d'anticorps entier « IgG » (**Figure 67**, courbe orange). Le protocole de fragmentation semble donc anticorps-dépendant. Une modification du rapport massique Anti-OTA/Cystéamine a conduit aux électrophorégrammes présentés **Figure 67**.

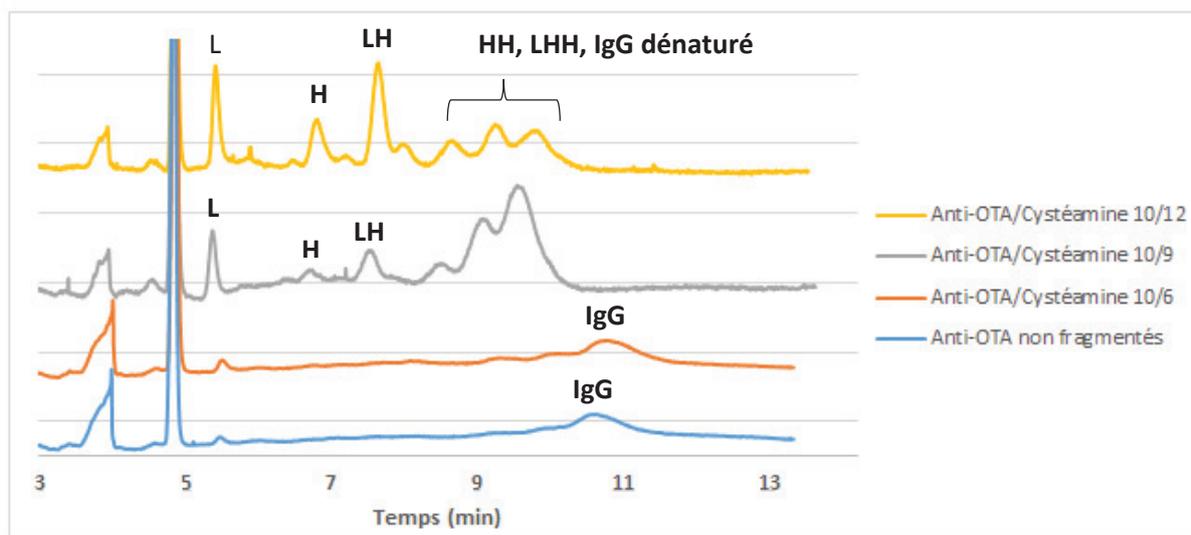


Figure 67: Electrophorogrammes de solutions d'Anti-OTA fragmentés à la cystéamine avec différentes proportions massiques Anticorps/Cystéamine.

Conditions d'analyse CGE : l=8,5 cm, L=33 cm, U=+15kV, Injection : SI (+5kV, 5 sec), Echantillon (+5 kV, 45 sec), $\lambda = 254$ nm

Conditions de la fragmentation à la cystéamine : 2h, 40°C avec différentes proportions massiques Anti-OTA/ Cystéamine

Préparation des solutions pour l'analyse CGE : 10 μ L de solution d'Anti-Ota fragmentés à la cystéamine (750 μ g/mL), 90 μ L SDS (1%), chauffés 3 min à 100°C

L'utilisation d'un rapport massique Anticorps/Cystéamine de 10/12 semble le plus adapté pour obtenir le plus de fragments LH d'intérêt (**Figure 67**, courbe jaune). Cependant, contrairement à la fragmentation des anticorps non spécifiques de lapin, la fragmentation obtenue sur les anticorps anti-OTA est loin d'être aussi spécifique, puisque de nombreux pics associés aux autres fragments sont visibles sur l'électrophorogramme (HH, LHH...). De plus, la présence des fragments L et H en proportions non négligeables (au vu des intensités sur l'électrophorogramme) représente un problème potentiel pour le greffage ultérieur sur support. En effet, ces fragments pourront se greffer au détriment des fragments LH alors qu'ils ne permettent pas la reconnaissance de l'OTA.

Pour la suite des essais, les solutions d'anti-OTA fragmentés ont été purifiées selon le protocole présenté partie I.1.ii.

II.2. Taux d'activité dans la solution d'Anti-OTA fragmentés à la cystéamine

Dans le cadre du développement de supports d'immunoaffinité, il est important de s'assurer de l'activité des anticorps/fragments d'anticorps qui sera synonyme d'une reconnaissance efficace avec l'antigène. La présence des fragments L et H, en quantité non négligeable (mais non quantifiée)

implique forcément une diminution de l'activité dans la solution puisque que leur formation conduit à la destruction d'un paratope.

La technique de quantification des anticorps/fragments d'anticorps actifs repose sur l'utilisation des interactions anticorps-antigène. Ainsi, pour connaître le taux d'activité d'une solution d'anticorps/fragments d'anticorps, des solutions contenant des quantités relatives variables d'OTA et d'anticorps/fragments d'anticorps ont été préparées (qté OTA > qté de paratopes) et analysées en CZE-LIF. La quantité d'OTA libre (non fixée sur les sites de reconnaissance des anticorps ou des fragments) est quantifiée en CZE-LIF. Elle permet de calculer la quantité d'OTA fixée (quantité d'OTA introduite – quantité d'OTA libre) sur les anticorps et par suite d'évaluer le taux d'activité de la solution :

Taux d'activité =

$$\frac{\text{Quantité d'OTA fixée (mol)}}{\text{Quantité de paratopes introduits (mol)}} \times 100$$

Conditions d'analyse CZE-LIF de l'OTA libre :

L'analyse de l'OTA en électrophorèse capillaire nécessite l'utilisation d'un électrolyte de séparation basique de pH > pKa_s de l'OTA (4,4 et 7,1) afin que la molécule d'OTA soit chargée et puisse migrer sous champ électrique. L'électrolyte de séparation choisi est un tampon borate pH 9,3 à 10 mM.

Les conditions d'analyse (injection, tension et détection) ont été optimisées de façon à séparer l'OTA du flux électroosmotique. Un exemple d'électrophorégramme est présenté **Figure 68**.

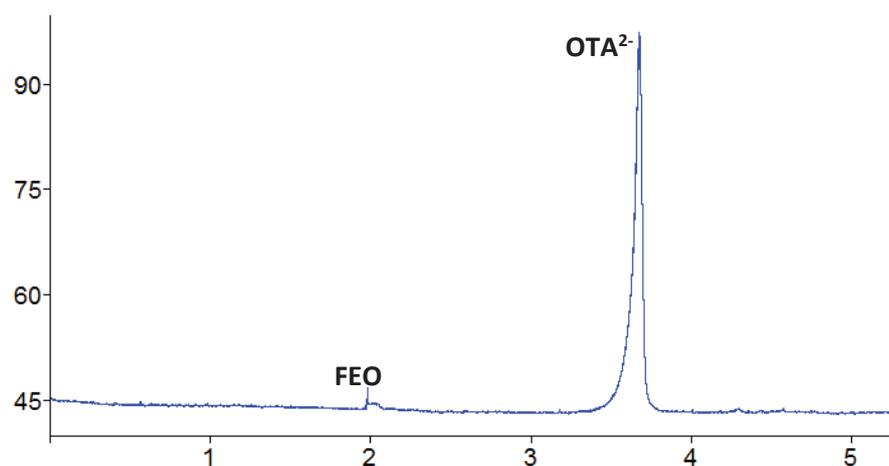


Figure 68: Analyse CZE-LIF d'une solution d'OTA à 30µM. Electrolyte borate pH 9,3 à 10 mM, tension = +20kV, l = 35 cm, L=50 cm, Injection= 20 mbar 5 secondes, Détection LIF (λ_{ex} = 410 nm), FEO = flux électroosmotique.

Evaluation du taux d'activité d'une solution d'anti-OTA fragmentés à la cystéamine :

Une première série d'expériences réalisées sur anticorps entiers (avant fragmentation) a permis de montrer que le taux initial d'anticorps actifs était voisin de 100% (quantité d'OTA libre nulle quand on mélange en proportion équimolaire (Paratope/OTA) les anticorps Anti-OTA entiers avec l'OTA.

Le taux d'activité de la solution d'anti-OTA fragmentés à la cystéamine a ensuite été évalué. Pour cela, deux solutions contenant les anticorps fragmentés et l'OTA en proportions molaires (Paratope/OTA) de 1/1 et 1/2 ont été préparées. Un taux d'activité d'environ 53 % a été déterminé pour les deux solutions étudiées.

Ces résultats mettent en évidence une perte d'activité importante de la solution à l'issue de la fragmentation des anticorps qui n'est pas assez spécifique. Un greffage des supports avec ces fragments d'anticorps conduira à une capacité de reconnaissance d'autant plus faible que la perte d'activité est importante.

II.3. Evaluation du nombre total d'anticorps greffés par la méthode au bleu de Coomassie

Les essais réalisés sur les anticorps de lapin réduits à la cystéamine ont montré qu'un greffage de 3×10 min avec renouvellement de la solution (à 3,6 mg/mL) entre chaque irradiation permettait d'atteindre un palier en termes de quantités maximales d'anticorps greffés. Ces conditions ont ainsi été retenues pour le greffage des anticorps spécifiques anti-OTA fragmentés à la cystéamine. Les résultats de la méthode au bleu de Coomassie (réalisée dans les mêmes conditions que celles présentées partie I.2. de cette annexe) obtenus sur la colonne monolithique ainsi photogreffée ont montré que 390 +/- 30 ng de CBB (n=3) sont capturés par centimètre de monolithe, ce qui correspondrait au maximum à (6,5 +/- 0,5) pmol de paratopes/cm (dans le cas où seuls des fragments actifs rIgG seraient greffés). Cette valeur est probablement très surestimée dans la mesure où des fragments L ou H ne présentant pas de site de reconnaissance ont probablement été greffés.

II.4. Conclusion

Les différents essais réalisés sur les anticorps anti-OTA ont montré des différences significatives par rapport aux anticorps non spécifiques de lapin. Dans un premier temps, l'analyse par CGE a révélé la présence de nombreux fragments autres que les fragments LH d'intérêt. La fragmentation à la cystéamine ne semble donc pas aussi spécifique pour les anticorps anti-OTA que pour les anticorps de lapin pour lesquels le fragment LH était majoritaire. Ce type de fragmentation anticorps-dépendant

nécessiterait une optimisation plus poussée dans le cas des anticorps anti-OTA. La mesure du taux d'activité dans la solution d'anticorps fragmentés a confirmé la désactivation (destruction) de nombreux paratopes puisque seulement 53% d'activité résiduelle a été mesurée. Ceci peut s'avérer problématique lors du greffage des fragments sur le support monolithique car certains fragments secondaires inactifs (L ou H) sont susceptibles de se greffer à la place des fragments LH. La reconnaissance avec la molécule cible ne serait donc plus assurée ou dans une moindre mesure.

III. Préconcentration/séparation en ligne de l'OTA

La préconcentration/séparation en ligne de l'OTA a été réalisée dans une colonne capillaire ($d_i = 75\mu\text{m}$) présentant une partie monolithique (1,5 cm) photogreffée avec des fragments d'anti-OTA (obtenus après réduction à la cystéamine) couplée en ligne avec une étape de séparation électrocinétique en tube vide (31 cm).

Les anticorps anti-OTA ont été fragmentés et greffés d'après les conditions déterminées dans les sections précédentes :

- **Fragmentation des anticorps anti-OTA par la cystéamine** : 2h, 40°C, rapport massique Anticorps/Cystéamine 10/12
- **Greffage des fragments anti-OTA sur le monolithe** : 3×10 min en greffage séquentiel. Solution de greffage : 50 μL d'anticorps fragmentés à 3,6 mg/mL + 3 μL de solution aqueuse d'AIBA à 110 mg/mL.

III.1 Protocole de préconcentration/séparation en ligne de l'OTA

Les différentes étapes du protocole de préconcentration/élution de l'OTA sont présentées **Figure 69 [3]**. Une solution aqueuse d'OTA est d'abord percolée dans la colonne pendant un temps déterminé. Une étape de rinçage est ensuite réalisée avec l'électrolyte de séparation afin de préconditionner le capillaire avant l'étape de séparation. Un créneau d'élution de la taille du monolithe et composé de 100% de méthanol est ensuite injecté dans la colonne afin de rompre les interactions antigène/anticorps. Enfin, l'étape de séparation est réalisée électrocinétiquement en appliquant une tension de +20 kV aux bornes du capillaire.

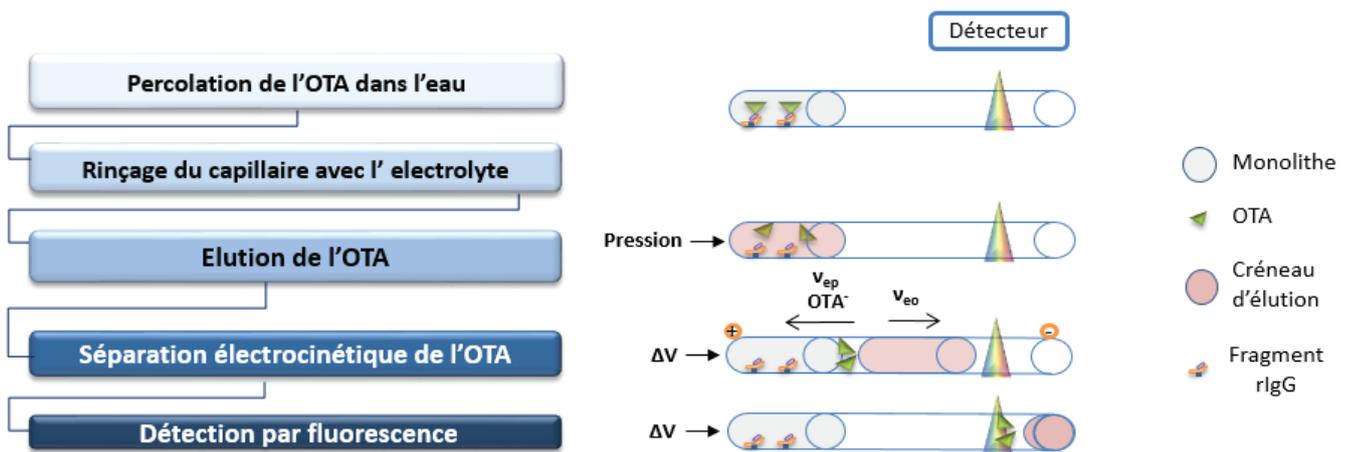


Figure 69: Représentation schématique des différentes étapes de préconcentration/séparation en ligne de l'OTA.

III.2. Résultats expérimentaux

Les nombreux essais réalisés en ligne n'ont malheureusement pas permis de préconcentrer et séparer l'OTA comme attendu. Il est probable que le support d'immunoaffinité préparé à partir des fragments d'anti-OTA ne reconnaisse pas l'OTA ce qui pourrait s'expliquer par la diversité des fragments d'anti-OTA obtenus après fragmentation à la cystéamine (près de 50% de sites détruits et de nombreux fragments thiolés sans paratope). En effet, les fragments de type L et H, produits au cours de la fragmentation par la cystéamine, ont pu se greffer sur le support au détriment des fragments LH, rendant le support faiblement voire totalement inactif. L'étude s'est arrêtée sur ces points par manque de temps, mais il serait intéressant de réoptimiser la fragmentation des anticorps anti-OTA de façon à obtenir spécifiquement les fragments LH d'intérêt comme cela a été possible pour les anticorps non spécifiques.

PROTOCOLES

Protocole 1 : Méthode d'analyse par Electrophorèse Capillaire sur Gel (CGE)

Préparation des différentes solutions :

- **Solution tampon SDS :**

Pour 100 mL de tampon: 1,22 g de Trizma Base + 1 g de SDS + 100 mL d'eau
Le pH est ajusté à 9 avec une solution concentrée de HCl.

- **Etalon interne 14 kDa :**

6,8 mg de Lysozyme + 1 mL de tampon SDS

- **Préparation des échantillons :**

- **Standards de taille:**

10 µL de standards de taille (Kit Beckman)
+ 85 µL de tampon SDS
+ 2 µL de l'étalon interne
+ 5 µL de Cystéamine

Chauffage 3 min dans
un bain d'eau à 100°C

- **Etalon interne :**

10 µL d'étalon interne
+85 µL de tampon SDS
+5 µL de Cystéamine

Chauffage 3 min dans
un bain d'eau à 100°C

- **Echantillon à analyser:**

Cas d'une protéine non réduite	Cas d'une protéine déjà réduite
10 µL de la solution à analyser	10 µL de la solution à analyser
5 µL de 2-Mercaptoéthanol	90 µL de Tampon SDS
85 µL de tampon SDS	5 µL d'agent alkylant IAM (40mg/ml)

+ Chauffage 3 min dans un bain d'eau à 100°C.

Conditions d'analyse :

- **Protocole de pré-conditionnement et nettoyage du capillaire:**

Rinçages	Base	50 psi	10 min	
	Acide	50 psi	5 min	
	Eau	50 psi	2 min	
	Gel SDS	40 psi	10 min	
Pré-conditionnement	15 kV	Polarité Normale	10 min	Rampe de 5 min

- **Conditions de séparation (l=8,5 cm, L = 33 cm) :**

Longueurs d'ondes	214 et 254 nm		
Mouillage	Eau	0 min	
	Eau	0 min	
Injection de l'étalon interne	5 kV	5 sec	Polarité normale
Injection de l'échantillon	5 kV	45 sec	Polarité normale
Séparation	+15 à +25 kV		30 min Rampe de 1 min

Protocole 2 : Purification des anticorps fragmentés

Protocole utilisé pour le test d'Ellman :

- Solutions pour le test d'Ellman

- Tampon pour test d'Ellman :

Pour 250 mL de tampon: 2,99 g de Phosphate de Sodium (Na_2HPO_4) 0,1 M + 73 mg d'EDTA 1 mM, pH = 8

- Solution d'Ellman :

4,1 mg du réactif d'Ellman + 1 mL de tampon pour test d'Ellman

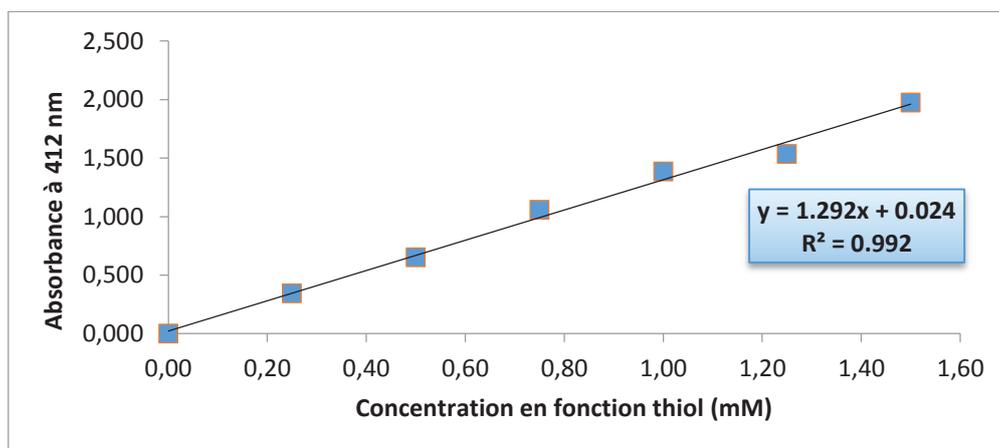
- Préparation des standards

7 solutions de concentrations connues en cystéine (molécule thiolée) sont d'abord préparées comme décrit ci-dessous :

Standard	Volume de Tampon	Quantité de Cystéine	[C] finale (mM)
A	100 mL	18,2 mg	1,5
B	5 mL	25 mL de Standard A	1,25
C	10 mL	20 mL de Standard A	1,0
D	15 mL	15 mL de Standard A	0,75
E	20 mL	10 mL de Standard A	0,5
F	25 mL	5 mL de Standard A	0,25
G	30 mL	-	0

Les standards pour le test d'Ellman sont ensuite préparés en mélangeant 250 μL de chaque solution (A à G) avec 50 μL de solution d'Ellman et 2,5 mL de tampon pour test d'Ellman. L'absorbance à 412 nm de chaque standard est ensuite mesurée pour réaliser la droite d'étalonnage.

- Droite d'étalonnage



- Préparation de l'échantillon à analyser

L'échantillon à analyser est préparé de la même façon que les standards en mélangeant 50 μL de solution d'Ellman, 2,5 mL de tampon pour test d'Ellman et 250 μL de l'échantillon.

Protocole 3 : Méthode au bleu de Coomassie

Préparation des solutions pour la méthode au CBB :

- **Solution acide T_1 :**

Dans une fiole jaugée de 100 mL : 5 mL d'acide acétique glacial + 7 mL de méthanol + 30 mL d'acétonitrile. Eau qsp 100 mL.

- **Solution de bleu de Coomassie à 200 mg/L :**

Dans une fiole de 100 mL, 19,9 mg de CBB sont introduits auxquels sont ajoutés 5 mL d'acide acétique. Cette solution est placée dans un bain à ultrasons pendant 10 secondes. 7 mL de méthanol et 30 mL d'acétonitrile sont ensuite introduits dans la fiole puis la solution est placée une seconde fois dans un bain à ultrasons pendant 10 secondes. Eau qsp 100 mL.

On place la solution dans un bain à ultrasons jusqu'à complète dissolution du CBB.

- **Solution basique T_3 :**

Une solution de NH_4OH 1M est préparée à partir d'une solution NH_4OH à 25% de NH_3 ($d=0,901-0,910$). Pour cela, 74,6 mL de NH_4 25% sont introduits dans un litre d'eau. La solution T_3 est obtenue en mélangeant 50% de NH_4OH 1M et 50% de méthanol.

Protocole 4 : Greffage des anticorps fragmentés

- *Greffage dynamique :*

Le capillaire contenant le monolithe vinyllisé est d'abord rincé avec un mélange 95:5 MeOH /Eau puis avec de l'eau. La solution de greffage contenant 50 µL d'anticorps fragmentés et 3 µL de solution d'AIBA (110mg/mL) est ensuite percolée dans la colonne placée sous irradiation. Le temps de percolation/irradiation est fixé selon l'essai.

- *Greffage séquentiel :*

Le capillaire contenant le monolithe vinyllisé est d'abord rincé avec un mélange 95:5 MeOH /Eau puis avec de l'eau. Le capillaire est ensuite rempli avec la solution de greffage contenant 50 µL d'anticorps fragmentés et 3 µL de solution d'AIBA (110mg/mL) puis irradié pendant 10 minutes sous lampe UV. L'opération est répétée x fois selon le temps de greffage souhaité.

Références bibliographiques

- [1]. Protocole de Thermo Scientific. Disponible sur:
<https://www.funakoshi.co.jp/data/datasheet/PCC/20408.pdf>. (consulté en juin 2013)
- [2]. G.L. Ellman, A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans, Arch. Biochem. Biophys. 74 (1958) 443-450.
- [3]. J. Chamieh, C. Faye, V. Dugas, T. Moreau, O. Vandennebeele-Trambouze, C. Demesmay, Preparation and full characterization of a micro-immunoaffinity monolithic column and its in-line coupling with capillary zone electrophoresis with Ochratoxin A as model solute, J. Chromatogr. A 1232 (2012) 93-100.