



HAL
open science

Boronate affinity monolithic columns for miniaturized separation techniques

Maria Betzabeth Espina Benitez

► **To cite this version:**

Maria Betzabeth Espina Benitez. Boronate affinity monolithic columns for miniaturized separation techniques. Analytical chemistry. Université de Lyon, 2018. English. NNT: 2018LYSE1178 . tel-01919931

HAL Id: tel-01919931

<https://theses.hal.science/tel-01919931>

Submitted on 12 Nov 2018

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 NNT :
2018LYSE1178

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 206
Chimie de Lyon

Spécialité de doctorat : Chimie
Discipline : Chimie Analytique

Soutenue publiquement le 08/10/2018, par :
Maria Betzabeth ESPINA BENITEZ

**Développement et mise en œuvre de
colonnes monolithiques d'affinité
boronate pour des techniques
séparatives miniaturisées**

Devant le jury composé de :

Mr PEYRIN, Eric

Professeur des Universités, Université Grenoble Alpes

Rapporteur

Mme PICHON, Valérie

Professeure des Universités, ESPCI Paris

Rapporteur

Mme DEMESMAY, Claire

Professeure des Universités, Université Claude Bernard Lyon 1

Examinatrice

Mr CHAMIEH, Joseph

Maître de Conférences, Université de Montpellier

Examineur

Mr DUGAS, Vincent

Maître de Conférences - HDR, Université Claude Bernard Lyon 1

Directeur de thèse

RESUME en français

Une partie des recherches actuelles dans le domaine de l'analyse chimique concerne la miniaturisation et l'intégration d'étapes analytiques afin de répondre, entre autres, à des besoins de portabilité, d'automatisation mais aussi d'apporter des solutions pour analyser des échantillons de plus en plus petits. Le développement et la mise en œuvre de colonnes monolithiques d'affinité boronate (μ BAMC) couplées « in-line » à des techniques séparatives miniaturisées s'inscrit dans cette démarche. Ce travail de thèse s'est focalisé sur (1) une compréhension des mécanismes de rétention en chromatographie d'affinité boronate (interactions spécifiques avec les composés cis-diols, conditions de reconnaissance, interactions secondaires), (2) le développement de supports monolithiques d'affinité boronate miniaturisés et (3) leur couplage « in-line » avec une séparation électrocinétique et détection conventionnelle dans un format capillaire. Différentes voies d'élaboration de colonnes monolithiques ont été comparées (en termes d'affinité, de nombre de sites boronate actifs et de stabilité). La faisabilité du couplage en ligne de ces supports μ BAMC avec une étape de séparation électrophorétique (par CZE et CIEF) a été démontrée vis-à-vis de la purification/préconcentration et séparation de 3 catécholamines contenant des groupements cis-diols (Adrénaline, Noradrénaline et Dopamine) dans l'urine. Les couplages ont été optimisés avec succès permettant l'analyse automatisée et miniaturisée de ces neurotransmetteurs dans l'urine (volume échantillon < 10 μ L) avec des limites de détection de l'ordre de la dizaine de ppb et des taux de récupération proches de 100 %.

MOTS-CLES en français : monolithe, chromatographie d'affinité boronate, électrophorèse capillaire de zone, focalisation isoélectrique capillaire, couplage « in-line », neurotransmetteurs, fonctionnalisation.

TITRE en anglais : Boronate affinity monolithic columns for miniaturized separation techniques

RESUME en anglais

Part of the current research in the field of chemical analysis concerns the miniaturization and the integration of analytical steps in order to meet, among other things, the need of portability and automation but also to provide solutions for analyzing small samples. The development and implementation of monolithic boronate affinity columns (μ BAMC) in-line coupled to miniaturized separation techniques is part of this approach. This thesis work focused on (1) an understanding of the retention mechanisms in boronate affinity chromatography (specific interactions with cis-diol compounds, recognition conditions and secondary interactions), (2) the development of miniaturized boronate affinity monolithic supports and (3) their in-line coupling with electrokinetic separation and conventional detection in a capillary format. Different ways of elaboration of monolithic columns were compared (in terms of affinity, number of active sites and stability). The feasibility of in-line coupling of these μ BAMC supports with an electrophoretic separation step (by CZE and CIEF) has been demonstrated in terms of purification / preconcentration and separation of 3 catecholamines containing cis-diol groups (adrenaline, noradrenaline and dopamine) in urine. The couplings have been successfully optimized allowing the automated and miniaturized analysis of these neurotransmitters in urine (sample volume <10 μ l) with limits of detection of about the tens of ppb and recovery yields close to 100 %.

MOTS-CLES en anglais : monolith, boronate affinity chromatography, capillary zone electrophoresis, capillary isoelectric focusing, in-line coupling, neurotransmitters, functionalization.

DISCIPLINE: Chimie Analytique

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 d'abord mes remerciements à M. Eric PEYRIN et Mme Valérie PICHON pour avoir accepté de rapporter ce travail et à M. Joseph CHAMIEH pour avoir accepté de faire partie de ce jury en tant qu'examineur. Je tiens à remercier également toutes les personnes avec qui j'ai pu collaborer lors de ce projet : Mme Anne BONHOMME, M. Sébastien VIDAL et M. Lei DONG. Je vous remercie pour votre temps et les connaissances apportées.

Mes plus sincères remerciements s'adressent également à l'équipe TECHSEP pour m'avoir sélectionnée en tant que candidate pour l'obtention du doctorat malgré la distance à ce moment-là, merci de votre confiance. A mon arrivée en octobre 2015, Gilles m'avait avertie de la sympathie et de la bonne ambiance de l'équipe, et il avait bien raison, je me sens chanceuse d'« être tombée » chez vous. Et plus particulièrement, merci à mes encadrants de thèse, M. Vincent DUGAS et Mme Claire DEMESMAY, pour votre accompagnement, votre disponibilité et vos conseils autour de ce projet de thèse. Également, merci de votre patience, de votre soutien et de votre compréhension notamment dans les moments d'adversité aux niveaux personnel et professionnel que se sont présentés au cours de ces trois années.

Un grand merci à tous les collègues et amis qui ont été présents lors de mes trois années au laboratoire : Audrey, Racha, Meriem, Lucile, Huian, Fabienne, Emeline, Mickael, Antonin, Clément, Shanice, Loïc, Léa, Sarah, Cindy, Thomas, Mostafa, Elodie et Théo. Merci pour votre compagnie, vos rires, et la bonne ambiance. Et plus généralement, je remercie également les collègues de l'ISA : Mai, David, Léa, Marie, Marion, Fériel, Morgan, et tous ceux qui font partie d'ISATOPE et du deuxième étage de l'ISA, pour les discussions sympathiques, leur accueil et leur bonne humeur.

Je remercie aussi mes collègues d'enseignement lors du monitorat : Julie, Cathy, Didier, Sophie, Florence. Merci d'avoir rendu les heures de TP plus courtes et plus agréables.

J'ai une pensée toute particulière pour Alex que je remercie énormément pour sa patience, son amour et pour m'avoir fait garder le sourire dans les moments plus difficiles.

Mes remerciements les plus chaleureux sont destinés à mes parents, mes frères, Rafa et ma famille en général, pour votre amour et votre soutien malgré les circonstances et la distance. A mes parents plus particulièrement, tout ce que j'ai accompli et la personne que je suis aujourd'hui, c'est grâce à vous, merci de m'avoir guidée et d'avoir cru en moi (A mis padres, todo lo que he logrado y la persona que soy hoy día es gracias a ustedes. Gracias por guiarme y crear en mí).

Un grand merci à la France, pays où je suis arrivée pour obtenir un doctorat et qui m'a donné beaucoup plus que ça jusqu'à aujourd'hui : des amis, mon amour, une deuxième opportunité à ma santé, les apéros, les beaux paysages et un enrichissement personnel, culturel et une grande ouverture d'esprit.

Enfin, je souhaiterais dédier cet ouvrage à mon pays, le Venezuela, qui a occupé une place spéciale dans mes pensées depuis mon départ, car les réalisations de tes enfants sont toujours de bonnes nouvelles, surtout dans les moments de crise. Et maintenant que j'achève mon rêve de vivre des aventures et des défis à l'étranger, mon nouveau rêve est de pouvoir te retourner tout ce que tu m'as donné sans peur et en liberté.

Principaux acronymes

AAPBA: Acide 3-acrylamidophénylboronique

APBA: Acide 3-aminophénylboronique

ACN: Acétonitrile

AIBN: 2,2-azobisisobutyronitrile

ATRP : Polymérisation radicalaire par transfert d'atomes

BAC : Chromatographie d'affinité boronate

BME: Benzoin Methyl Ether

CE: Electrophorèse capillaire

CZE : Electrophorèse Capillaire de Zone

CI EF : Focalisation isoélectrique capillaire

DFFPBA : Acide 2,4-difluoro-3-formylphénylboronique

EDA : Ethylène diamine

EDMA : Ethylène diméthacrylate

FEO : flux électroosmotique

GC : Chromatographie Gazeuse

GMA : Glycidyl methacrylate

γ -MAPS : 3-méthacryloxypropyltriméthoxysilane

μ BAMC : Colonne monolithique d'affinité boronate

MEB : Microscopie Electronique à Balayage

MeOH : Méthanol

MPBA : Acide 4-mercaptophénylboronique

MPPBA : Acide 3-(3-mercapto)propanamide)phénylboronique

MS Spectrometri de masse

Nano-LC : Nanochromatographie Liquide

PEI : Polyéthylèneimine

SPE : Extraction sur phase solide

TEA : Triéthylamine

TCEP : Tris(2-carboxyéthyl)phosphine

VTMS : Vinyltriméthoxysilane

Sommaire

Introduction générale et contexte.....	1
Chapitre I : Etat de l'art sur la chromatographie d'affinité boronate.....	27
1. Introduction.....	29
2. The specific PBA-cis-diol interaction: from a theoretical point of view.....	31
3. Hydrophobic and π - π interactions.....	32
4. Lewis acid-base interactions.....	34
5. Electrostatic interactions.....	37
6. Hydrogen Bonding interactions.....	40
7. Boronate affinity with saccharides, glycans and glyconjugates.....	41
8. Conclusion.....	51
Chapitre II : Elaboration de colonnes d'affinité boronate miniaturisées.....	59
Introduction.....	61
1. Les critères de performances des colonnes d'affinité boronate.....	65
2. Les méthodes de caractérisation des supports boronate.....	68
3. Stratégie d'élaboration des colonnes miniaturisées.....	72
4. Partie Expérimentale.....	75
4.1. Synthèse des monolithes.....	75
4.2. Fonctionnalisation des monolithes de silice.....	77
4.3. Fonctionnalisation des monolithes organiques.....	80
4.4. Evaluation des performances des monolithes fonctionnalisés.....	81
5. Résultats.....	83
5.1. Synthèse et évaluation de colonnes monolithiques de silice d'affinité boronate.....	83
5.2. Synthèse et évaluation de colonnes monolithiques organiques poly(GMA-co-EDMA) d'affinité boronate.....	97
6. Conclusion sur les procédés de fonctionnalisation de monolithes.....	109
Chapitre III : Couplage « in-line » de supports μ BAMC à des techniques séparatives miniaturisées.....	119
Introduction.....	121

I.	Development and application of a new in-line coupling of a miniaturized boronate affinity monolithic column with capillary zone electrophoresis for the selective enrichment and analysis of cis-diol-containing compounds.....	125
1.	Introduction.....	129
2.	Materials and methods.....	131
3.	Results and discussion.....	136
3.1.	Preparation of the miniaturized boronate affinity monolithic column (μ BAMC).....	136
3.2.	Optimization of the operating conditions of the μ BAMC unit.....	141
3.3.	Application of the in-line coupling for catecholamines purification/preconcentration, separation and detection.....	145
3.4.	Linearity and limits of detection.....	147
3.5.	Recovery yield of catecholamines using the in-line coupling.....	148
3.6.	Proof of feasibility: Application of the in-line coupling to urine real sample analysis.....	148
3.7.	Stability and lifetime of the μ -SPE unit.....	149
4.	Conclusion.....	150
5.	Supplementary Material.....	151
II.	Evaluation of boronate affinity solid-phase extraction coupled in-line to capillary isoelectric focusing for the analysis of catecholamines in urine.....	163
1.	Introduction.....	166
2.	Materials and methods.....	167
3.	Results and discussion.....	172
3.1.	Catecholamines (adrenaline, noradrenaline and dopamine) CIEF separation.....	172
3.2.	Feasibility study of the in-line coupling.....	174
3.3.	Determination of the maximum loading volume.....	179
3.4.	Recovery study.....	180
3.5.	Linearity, repeatability and limit of detection.....	180
3.6.	Stability of the composite capillary.....	181
3.7.	Analysis of catecholamines in urine.....	181
4.	Conclusion.....	183
5.	Supplementary material.....	184
	Conclusion générale et perspectives.....	191

VERS LA MINIATURISATION DES SYSTEMES ANALYTIQUES...

Une grande partie des recherches menées dans le domaine des sciences analytiques vise à repousser les limites en termes de performances. Une des évolutions, dans ce cadre, concerne la miniaturisation des techniques analytiques avec pour objectif de travailler sur des échantillons de plus en plus petits, de proposer des systèmes d'analyse autonomes, voire de limiter l'exposition des opérateurs à des agents chimiques dangereux.

Si le volume d'échantillon est une contrainte analytique, il est nécessaire, dans certains cas particuliers, d'avoir recours à des techniques ultra-miniaturisées et ultra-sensibles pour obtenir une information de plus en plus précise et pertinente. La figure ci-dessous (Figure 1), illustre le développement d'une approche analytique miniaturisée permettant de cibler l'analyse sur une cellule particulière.

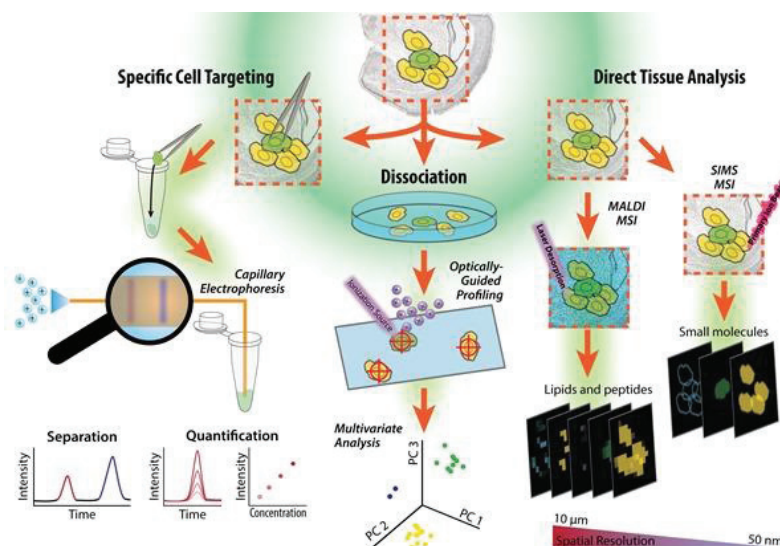


Figure 1. Illustration du diagramme d'analyse complet d'un échantillon de tissu, de l'isolation cellulaire aux mesures monocellulaires basées sur l'imagerie tissulaire, le profilage monocellulaire et le couplage de l'électrophorèse capillaire à la spectrométrie de masse [1].

Il est intéressant de noter que l'analyse, dans cet exemple, repose sur un ensemble de techniques adaptées aux petits échantillons et permettant de cribler une large gamme de composés (petites molécules, lipides, peptides), voire de quantifier des analytes à partir d'une cellule unique. Il devient alors possible d'avoir un résultat d'analyse discrète (sur un seul individu) et non plus sur une population entière, de façon à pouvoir différencier la contribution de chaque individu sur la réponse de la population. On pourrait citer à titre d'exemple, le suivi de certaines espèces « sentinelles » (gammare) en raison de leur forte interaction avec l'environnement.

La miniaturisation est également une réponse aux exigences de portabilité et d'autonomie. Certains de ces outils doivent être conçus pour fonctionner dans des environnements non conventionnels en totale autonomie comme par exemple les outils destinés à l'exploration extraterrestre ou plus proche de nous, au suivi analytique personnalisé (Figure 2).

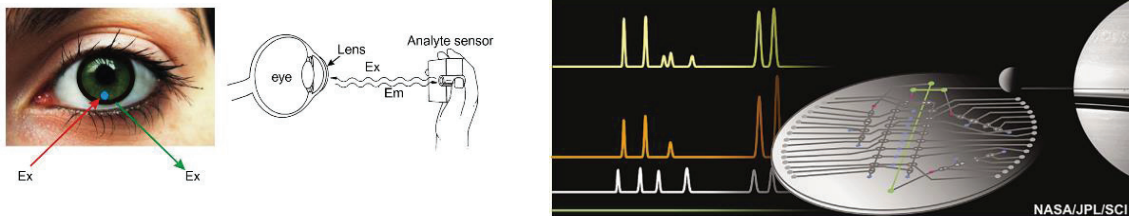


Figure 2. Surveillance continue du glucose lacrymal à l'aide de lentilles de contact dopées (gauche). Le dispositif à main fonctionne en faisant clignoter une lumière dans l'œil (Ex) et en mesurant l'intensité d'émission (Em). Représentation schématique du dispositif de détection du glucose lacrymal (à gauche) adapté de [2] et Figure à droite illustrant le développement d'un microsystème d'analyse autonome destiné à l'analyse in-situ extraterrestre [3].

La miniaturisation des systèmes d'analyse permet également d'implanter des outils analytiques de suivi en ligne au cœur de procédés industriels afin de réduire la quantité d'échantillon nécessaire par analyse. Cela revêt une importance stratégique dans les domaines où l'échantillon est dangereux comme par exemple dans le domaine du nucléaire où la réduction de l'exposition des opérateurs et de la quantité de déchet liée à l'analyse est un véritable enjeu [4,5].

Les techniques séparatives n'ont pas échappé à cette évolution avec une réduction des géométries des systèmes analytiques. La chromatographie en phase gazeuse avec l'avènement des analyses au format capillaire il y a plusieurs décennies est l'exemple le plus abouti de réduction du volume de colonne. En effet, les appareils commerciaux utilisés en routine dans les laboratoires d'analyse intègrent des systèmes d'injection et de détection parfaitement bien adaptés pour conserver les performances de ces colonnes miniaturisées. L'utilisation d'un gaz comme phase mobile en association avec un tube vide (très perméable) simplifie énormément la mise en œuvre de ce type d'analyse et explique son succès par rapport aux analyses en phase liquide. La réduction des dimensions de colonne en chromatographie en phase liquide, passant de l'échelle conventionnelle (diamètre interne (d.i.) de colonne > mm, débit de l'ordre du mL/min) à l'échelle nano (d.i. < 100 μ m et débit de l'ordre de la centaine de nL/min), est plus difficile à mettre en œuvre en raison, entre autres, des pressions plus importantes à contrôler, de l'adaptation des systèmes d'injection et de détection nécessaires pour préserver les performances des colonnes. En parallèle, le développement rapide des techniques électrocinétiques dans les années 90 est une preuve de l'intérêt porté à la miniaturisation. A l'instar de la GC, les techniques électrocinétiques au format capillaire représentent déjà une version avancée de systèmes analytiques séparatifs miniaturisés et constituent la miniaturisation ultime de ce

qui se fait en séparation en phase liquide, notamment avec les systèmes de séparation électrocinétiques sur puce. Les séparations électrocinétiques regroupent un large panel de méthodes complémentaires (électrophorèse capillaire de zone, électrophorèse capillaire sur gel, focalisation isoélectrique, isotachophorèse etc..) offrant une grande diversité de mécanismes de séparation souvent associée à des performances séparatives (pouvoir de séparation) accrues. Au regard de l'ensemble de ces critères, notre choix concernant le développement de systèmes séparatifs miniaturisés s'est porté sur l'utilisation de ces techniques électrocinétiques.

Un point commun à la miniaturisation des systèmes séparatifs concerne l'adaptation du volume injecté par rapport au volume du système de séparation. En ne considérant que le changement d'échelle, la réduction du volume de séparation s'accompagne d'une réduction proportionnelle du volume d'injection.

Par ailleurs, le couplage de ces systèmes séparatifs miniaturisés à un système de détection nécessite de limiter les sources d'élargissement de pic liées à cette étape de détection. Dans ce cadre, les systèmes de détection *in-situ* dans le canal ou capillaire de séparation sont privilégiés. Différentes méthodes de détection sont disponibles comme la spectrométrie d'absorption UV/visible, la spectrométrie d'émission de fluorescence ou la mesure de conductivité sans contact. Ces systèmes de détection *in-situ* apportent un niveau d'intégration supplémentaire par rapport aux systèmes couplés comme par exemple la spectrométrie de masse. Bien que la détection par mesure d'absorbance UV/Visible reste une méthode de choix, la sensibilité reste un point critique de cette technique. En effet, la sensibilité est reliée à la longueur du trajet optique. Cette longueur de trajet optique est ainsi réduite aux dimensions du canal ou du capillaire de séparation (< 100 μm). La réduction des volumes injectés qui accompagne cette miniaturisation des systèmes séparatifs est donc susceptible d'entraîner des problèmes de détection. Pour compenser ces effets et diminuer les limites de détection, différentes stratégies de préconcentration en ligne des échantillons ont été développées. En effet, afin de proposer des systèmes simples d'utilisation et limiter les étapes de traitement et préparation d'échantillon en amont de l'analyse, il est indispensable de proposer des solutions intégrées à l'analyse. On peut classer ces solutions de préconcentration en ligne selon deux grandes catégories : les méthodes de préconcentration électrocinétiques et les méthodes de préconcentration chromatographiques.

Indépendamment de la méthode de détection, la sensibilité globale de la méthode en CE peut être améliorée en réalisant une étape de préconcentration en ligne basée sur des techniques électrocinétiques. Ces techniques sont bien adaptées à la CE puisqu'elles ne nécessitent pas de modification de l'appareillage, ni de détecteurs coûteux et qu'elles sont facilement automatisables. Différentes approches électrocinétiques permettent d'obtenir un effet de préconcentration. L'ensemble de ces techniques de préconcentration repose sur la création, dans le capillaire, de zones dans lesquelles les ions analytes sont soumis à des gradients de vitesse d'électromigration. Ces zones de gradient conduisent à un effet d'accumulation rapide des analytes (préconcentration). De telles zones de gradients de vitesse d'électromigration peuvent être générées en créant un gradient de champ électrique (techniques dites de « stacking ») ou un gradient de mobilité électrophorétique (techniques basées sur le déplacement d'équilibre chimique).

Les techniques dites de « stacking », ou « préconcentration par amplification du champ électrique », utilisent la propriété de conductivité des solutions pour contrôler la répartition du champ électrique dans le capillaire. Dans un tube capillaire rempli de deux solutions de conductivités différentes, la condition de continuité de courant entre les deux électrodes impose que la valeur du champ électrique se répartit de façon inversement proportionnelle à la conductivité de la solution. Ainsi, le champ électrique dans la zone de faible conductivité (zone échantillon) est plus important que dans la zone de forte conductivité (électrolyte de séparation). Sachant que la vitesse électrophorétique est directement proportionnelle au champ électrique, les ions dans la zone échantillon migrent rapidement en direction de l'interface puis ralentissent et s'accumulent à la frontière avec la zone de séparation (forte conductivité). Cette accumulation (ou effet de stacking) permet d'injecter de grands volumes d'échantillon (soit par injection hydrodynamique (« field amplified sample stacking » (FASS)) (Figure 3 à gauche), soit par injection électrocinétique (« field amplified sample injection » ou « field enhanced sample injection » (FASI ou FESI)). Différentes variantes basées sur ce mécanisme ont été développées pour augmenter le volume d'injection, comme par exemple la technique dite de « Large Volume Sample Stacking » (LVSS) qui combine un effet de stacking entre la zone échantillon et la zone de séparation avec un flux électroosmotique inversé par rapport à la migration électrophorétique des solutés (Figure 3 à droite). Ces techniques permettent d'améliorer la sensibilité d'un facteur entre 10 à 10 000 en fonction de la nature des composés et de la matrice des échantillons [6,7].

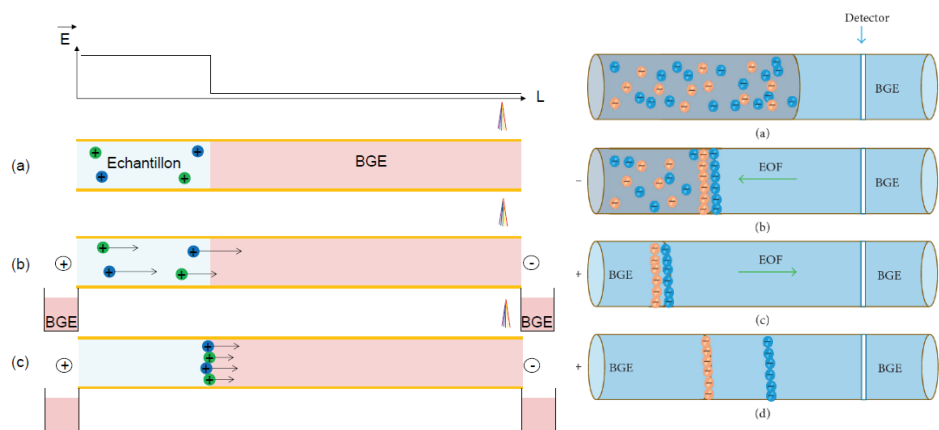


Figure 3. Schéma de principe de la préconcentration par FASS (à gauche) (a) Injection hydrodynamique de l'échantillon (matrice de faible conductivité, grand volume d'injection). (b) Application de la tension : les analytes dans la zone échantillon sont soumis à un fort champ électrique. (c) Accumulation des analytes quand ils entrent dans le BGE (chute brutale de leur vitesse de migration électrophorétique) adapté de [7] et préconcentration LVSS (à droite).

Les techniques de « stacking » précédemment mentionnées s'adressent plus particulièrement aux espèces chargées présentes dans des matrices faiblement conductrices et dont la conductivité est maîtrisée. Dans le cas d'échantillons conducteurs ou d'échantillon de conductivité variable, une préparation d'échantillon (dessalage) est indispensable [7] pour obtenir des résultats fiables et reproductibles. L'isotachophorèse (ITP) est une méthode de préconcentration électrophorétique permettant de s'affranchir de cette dépendance de la méthode vis-à-vis de la conductivité de l'échantillon [8]. Son couplage avec l'EC fait appel à une méthode dite d'isotachophorèse en régime transitoire (t-ITP). L'ITP, au contraire de l'EC, ne repose pas sur la migration de solutés ionisés supportée par un électrolyte de fond. Dans ces conditions les différentes espèces migrant sous l'effet du champ électrique se répartissent en bandes contigües de mobilité croissante. De façon simplifiée, la valeur du champ électrique dans chaque bande s'adapte à la mobilité des ions de façon à équilibrer la vitesse électrophorétique sur l'ensemble du capillaire. A l'équilibre, toutes les bandes migrent à la même vitesse (d'où le nom d'isotachophorèse). Ce mode de séparation électrophorétique fait appel à un système d'électrolytes discontinu (comparé à l'EC pour laquelle l'électrolyte de fond assure une continuité sur l'ensemble du capillaire de séparation). Une description de l'ensemble de l'ITP et du couplage avec l'EC est donnée dans les articles de reviews suivants [9–11]. Si des facteurs préconcentration pouvant atteindre un million ont été rapportés [12], des facteurs de 100 à 15 000 sont plus couramment observés avec des échantillons complexes (matrices biologiques par exemple) [6,9]. Ces techniques, outre leurs facteurs de préconcentration et leur robustesse vis-à-vis notamment de l'échantillon, offrent l'avantage de pouvoir éliminer certaines interférences. En ITP, le mélange échantillon est injecté entre des zones d'électrolytes appelées « leader » et « terminal ». Les co-ions

(ions de l'électrolyte de même charge que les analytes) constituant ces deux systèmes d'électrolyte ont des mobilités effectives encadrant celle des analytes cibles. Lorsque le champ électrique est appliqué, les ions analytes s'accumulent et se préconcentrent entre les zones d'électrolyte « Leader » et « Terminal ». Une focalisation effective en ITP est donc possible en choisissant judicieusement les ions des électrolytes « leader » et « terminal » dont les mobilités encadrent celles des analytes cibles et non celles d'autres espèces interférentes. Il n'est pas surprenant que cette approche soit une des techniques de préconcentration préférées en système microfluidique grâce à sa polyvalence exceptionnelle [6,13]. Par contre, une sélection appropriée des systèmes d'électrolyte selon la mobilité et la concentration du co-ion est nécessaire, spécialement pour les échantillons contenant des macromolécules, afin d'éviter une dispersion de pics [6,8,10,14].

La deuxième classe de techniques de préconcentration fait appel à l'établissement dans le système d'un gradient de mobilité électrophorétique. Ce gradient de mobilité est obtenu en créant les conditions nécessaires au déplacement des équilibres chimiques. Différentes approches ont été développées dont les plus classiques sont la préconcentration par « dynamic pH junction » et la préconcentration par extraction dynamique par une phase micellaire aussi appelée « Sweeping » [15]. La première approche repose sur le déplacement de l'équilibre acido-basique (changement du degré d'ionisation) des groupements ionisables portés par les analytes. Ceci est réalisé en créant dans le capillaire des zones de pH différentes. Dans la deuxième approche, il s'agit d'un déplacement d'équilibre de partage entre les analytes et des micelles.

Les gains en sensibilité de ces dernières techniques sont très variables, en effet leur efficacité dépend fortement d'autres variables telles que les conditions opératoires (concentration en sel, pH des différentes zones, nature des espèces, etc.) pour le « dynamic pH junction », et l'affinité des analytes vis-à-vis des micelles introduites dans les systèmes de « sweeping ».

Ces techniques de préconcentration sont puissantes mais leur utilisation n'est pas généralisable à tout type d'analyse. En effet, la conductivité des échantillons (notamment pour les matrices biologiques pour lesquelles les concentrations en sels peuvent être importantes et différentes d'un échantillon à l'autre perturbe les analyses) et la complexité en termes de gamme de concentration et de diversité des molécules interférentes nécessitent en amont de la séparation électrophorétique de pouvoir purifier l'échantillon.

Dans le cas d'analyses impliquant une étape de purification (allant de la déplétion à l'extraction sélective) il est nécessaire d'intégrer dans le système séparatif un élément de purification basé sur de l'extraction solide-liquide. A l'échelle classique, ce type d'étape de purification et de préconcentration est réalisé sur des cartouches SPE (Solid-phase extraction). L'intégration d'un support miniaturisé d'extraction (μ SPE) au sein d'un canal de séparation électrocinétique implique d'un point de vue expérimental de localiser/intégrer une zone présentant une fonctionnalité de surface particulière. L'approche la plus directe pour insérer une unité de μ SPE dans un canal de séparation électrocinétique est de modifier chimiquement la paroi à l'entrée de la colonne séparation (Open-tubular column ou OTC). Ces systèmes en tube ouvert garantissent une facilité d'utilisation notamment en ce qui concerne l'écoulement des phases liquides à travers le système. Cependant le faible rapport surface / volume développé par la paroi des tubes capillaires n'est pas avantageux en terme de capacité de charge [16]. Il a donc été envisagé d'augmenter les capacités en créant des couches superficiellement poreuses sur la paroi (Porous layer open tubular column ou colonne PLOT) voire en insérant une phase stationnaire poreuse à l'intérieur de la colonne (colonne remplie).

Quel que soit le format, le couplage d'une étape d'extraction en ligne avec une séparation électrocinétique peut être schématisé selon la Figure 4 ci-dessous :

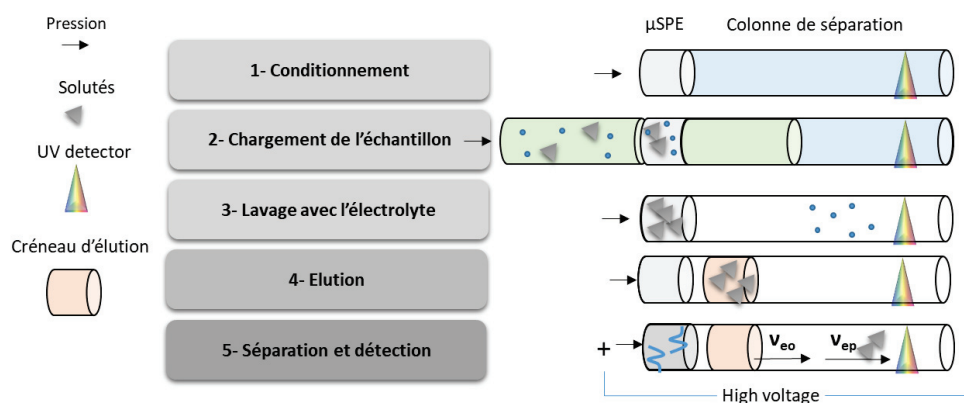


Figure 4. Représentation schématique de l'utilisation d'un système intégré μ SPE-séparation électrocinétique avec détection UV in-situ.

La première étape concerne le conditionnement de la zone de μ SPE en vue du chargement de l'échantillon (étape 2). Après lavage et conditionnement de l'ensemble du système (étape 3), les solutés préconcentrés et purifiés sont élués (étape 4) et injectés dans la zone dédiée à la séparation électrocinétique. L'échantillon est ensuite analysé et détecté (étape 5).

La conception d'une méthode d'analyse sur un système intégré doit prendre en compte certaines contraintes dont la compatibilité entre les étapes d'extraction et de séparation. Le point critique concerne l'étape de lavage (étape 3) qui doit permettre (i) de laver le support et l'ensemble

du capillaire de séparation, (ii) de limiter l'élution des échantillons préconcentrés dans la zone de μ SPE et (iii) de conditionner le capillaire pour l'étape de séparation et détection.

Le champ de mise en œuvre et d'application du couplage en ligne d'étapes de préconcentration avec une séparation électrophorétique est très large et la littérature abondante. L'état de l'art sur l'ensemble des points soulevés déborde du cadre de cette introduction. Il est possible de se référer aux reviews suivantes [17–21] pour avoir une vision d'ensemble plus complète sur ces évolutions depuis une dizaine d'années. Quelques exemples d'application de couplage « in-line » sont présentés afin d'illustrer, de façon non exhaustive, la diversité des approches :

➤ *Colonne ouverte (OTC)*

Le couplage en tube ouvert présente l'avantage de ne pas réduire la perméabilité. Cependant, bien que cette approche permette d'augmenter le volume d'échantillon injecté par rapport à l'électrophorèse de zone conventionnelle avant séparation, ces supports sont rapidement saturés [16]. Il est donc nécessaire de coupler ces approches à des détections très sensibles comme la fluorescence induite par laser (LIF). Shimura et Nagai ont par exemple combiné en ligne une étape de préconcentration par chromatographie d'immunoaffinité (IAC) avec une séparation par focalisation isoélectrique (CIEF) [22] pour l'analyse de fragments d'anticorps recombinants (rFAb) porteurs d'un tag marqué à la rhodamine (E-tag)(Figure 5). L'IAC (25 cm de long sur une longueur totale de 60 cm (d.i. 50 μ m)) comprend un anticorps anti-E-tag immobilisé sur la paroi à l'entrée du capillaire. Le reste du capillaire a été recouvert d'un polymère neutre (polydiméthylacrylamide) nécessaire pour supprimer le flux électroosmotique pour l'étape de focalisation isoélectrique. L'analyse d'un échantillon (sérum à 50 %) dopé avec le fragment d'anticorps fluorescent à 16 pM et 400 pM est présentée Figure 5. Le volume d'échantillon injecté (6 cm min^{-1} pendant 1 h) représente l'équivalent de 360 cm du capillaire de séparation (cela représente 7 μ l d'échantillon soit 6 volumes de capillaire entier).

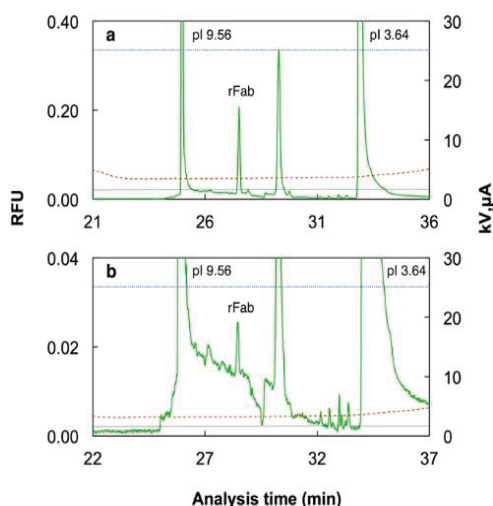
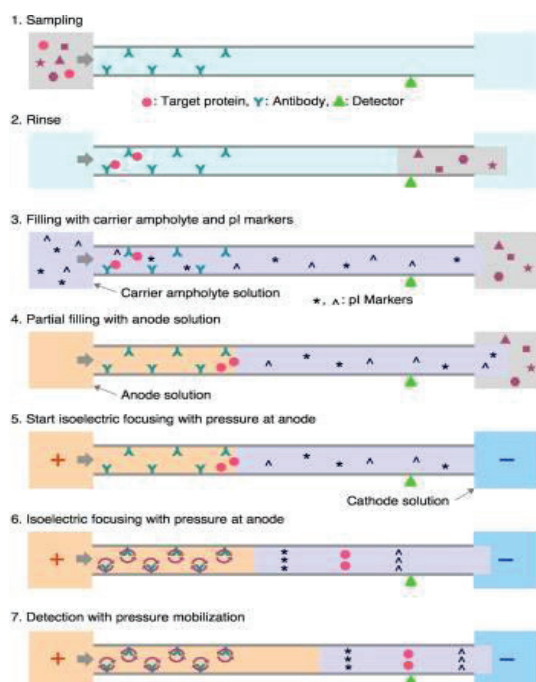


Figure 5. Procédé étape par étape du couplage direct en capillaire de la chromatographie d'immunoaffinité à la focalisation isoélectrique (à gauche) et résultats de la séparation de fragment par couplage IAC-CIEF dans un échantillon contenant 50% de sérum. La concentration de rFab dans 50% de sérum est de 400 pM (a) et de 16 pM (b). Lignes pleines vertes, fluorescence; lignes pointillées bleues, tension (kV); lignes discontinues rouges, courant (μA); lignes noires, pression à 0,2 psi. Adapté de [22].

De façon à augmenter la capacité de l'unité de préconcentration, la paroi de la colonne peut être modifiée de façon à créer une couche poreuse plus épaisse. Le groupe de Sanz-Nebot [23] a ainsi élaboré des microcartouches de préconcentration fonctionnalisées avec des chaînes C_{18} en synthétisant des couches de silice monolithique (quelques dizaines de micron d'épaisseur) à la surface de capillaires de silice de 250 μm de diamètre interne (Figure 6). Dans ces conditions, des volumes d'injection allant jusqu'à 75 μl d'échantillon sont percolés dans le système et permettent d'améliorer les limites de détection d'un facteur 7,5 à 50 par rapport à une analyse sans préconcentration « in-line ».

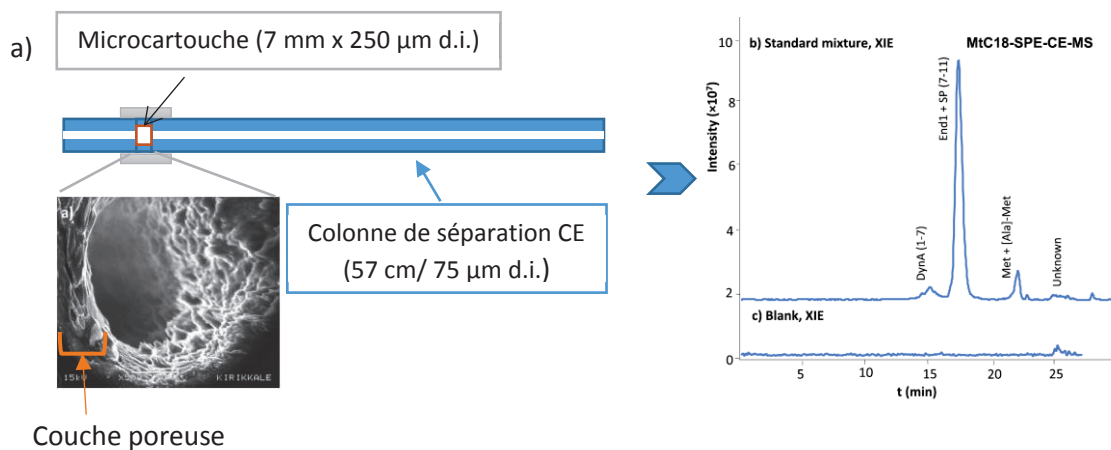


Figure 6. Illustration du couplage SPE-CE en utilisant des colonnes PLOT (a) et résultats du couplage SPE-CE-MS, somme des ions extraits de l'électrophorégramme (XIE (434.8 - 868.8 m/z)) pour un mélange de 5 neuropeptides (dynorphin A (1–7), substance P (7–11), endomorphin 1, methionine enkephalin and [Ala]-methionine enkephalin) à 1 mg mL⁻¹ (DynA (1–7), 611.3 m/z (End1), 613.3 m/z (SP (7–11)), 574.2 m/z (Met) and 588.2 m/z ([Ala]-Met) et somme des XIEs sur blanc (c). Adapté de [23].

Cet article est intéressant car les résultats obtenus sont comparés à une méthode précédemment décrite impliquant une microcartouche (tube capillaire de 250 μm de diamètre interne et 7 mm de long) remplie de phase stationnaire C₁₈ Sep-Pak [24]. Les limites de détection atteintes avec une microcartouche remplie de phase stationnaire sont significativement plus faibles. La rétention ainsi que la capacité de chargement des phases particulières utilisées expliquent ce résultat.

➤ SPE-CE avec colonnes remplies

- Spécificités liées à la mise en œuvre de colonnes remplies

La mise en œuvre de colonnes remplies implique de disposer de colonnes SPE suffisamment perméables et/ou de pressions suffisantes (quelques bars) pour réaliser les étapes de percolation/lavage/élution dans un temps raisonnable. Néanmoins, dans certains cas, l'échantillon peut être introduit et/ou élué par voie électrocinétique comme dans l'exemple illustré ci-dessous (Figure 7). Les acides aminés sont introduits électrocinétiquement dans le capillaire dans un électrolyte de faible force ionique favorisant leur injection et leur adsorption sur le support échangeur de cations. A l'issue de l'adsorption les acides aminés sont élués par un électrolyte fort introduit dans le capillaire par électroosmose [25].

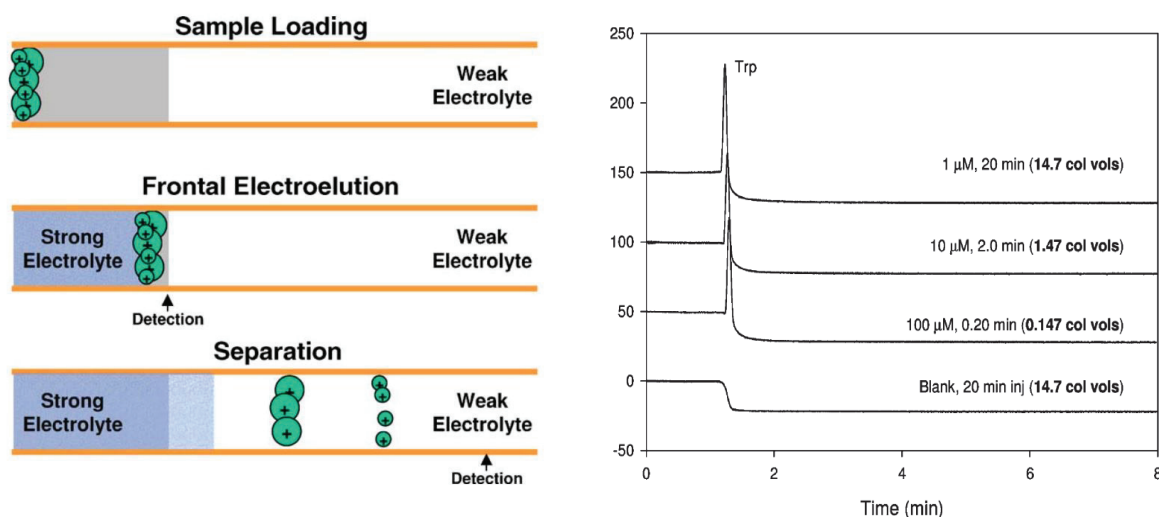


Figure 7: A- représentation schématique du processus impliqué en couplage « in-line » SPE (échange d'ions)-CE : échantillon d'acides aminés chargé électrocinétiquement dans un électrolyte faible (Acide sulfurique dilué pH = 2,9) et électro-élution frontale (mobilisation par EOF) dans un mélange (60/40) acétonitrile/électrolyte fort (éthylène diamine 62,5mM, acide sulfurique pH 2). Séparation par CZE après élution de la zone SPE. B- électroélution de solutions de Trp solubilisés dans l'électrolyte faible (variation de la durée d'injection et de la concentration en Trp) [25].

- Micro-cartouches SPE particulières

Dans le cas de particules, tout l'éventail de phases stationnaires disponibles commercialement peut être utilisé mais la difficulté réside dans le remplissage des tubes de faible diamètre et dans le maintien de la phase stationnaire dans une zone délimitée. Si des frittés peuvent être fabriqués *in-situ* (essentiellement par chauffage de particules de silice) ils restent fragiles et sources d'inhomogénéité de perméabilité et de chimie de surface (interactions secondaires). Cette configuration présente néanmoins l'avantage de pouvoir insérer la zone SPE directement dans le capillaire de séparation afin de s'affranchir des connections délicates entre capillaires sources de dispersion externe et de fuites.

Des alternatives ont été proposées pour insérer une colonne SPE sans frittés, en jouant sur les diamètres respectifs des zones de préconcentration/séparation et ou/ sur la taille des particules/canal de séparation (Figure 8) [26].

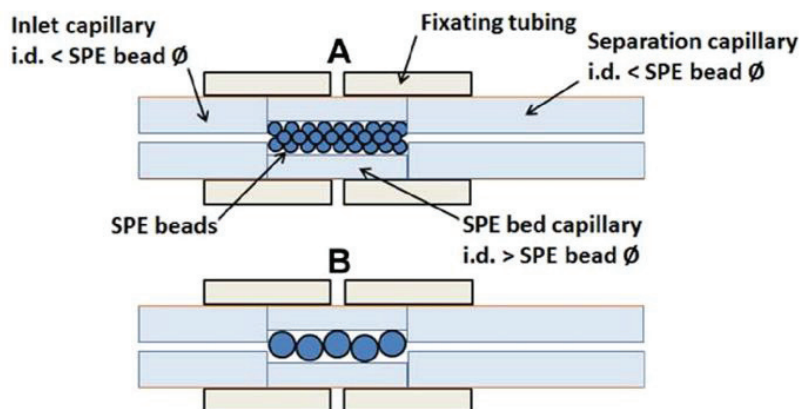


Figure 8: Deux configurations de colonnes sans frittés (fritless columns) pour le couplage en ligne SPE-CE ; (A) lit multi-couches dans un capillaire (colonne SPE) de diamètre interne très élevé par rapport au diamètre moyen des particules ; (B) lit simple de particules dans une colonne SPE de diamètre interne légèrement supérieur au diamètre des particules [26].

Par ailleurs, pour limiter la restriction de débit entre zone vide (zone de séparation) et zone remplie (zone SPE) à l'origine de la formation de bulles et de chute de courant, des particules de diamètre élevé sont généralement utilisées (40-100 μm).

Un exemple de couplage en ligne SPE-CE-MS [27] utilisant une restriction de diamètre entre cartouche de préconcentration et capillaire de séparation est illustré (Figure 9).

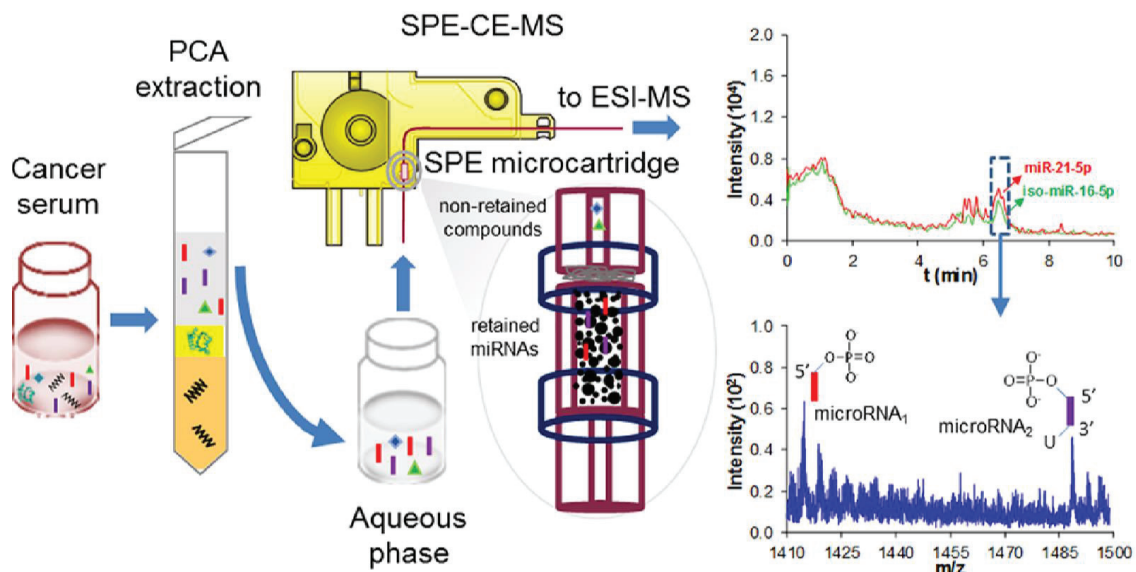


Figure 9 :SPE-CZE-MS pour la purification, préconcentration séparation et caractérisation de micro-ARNs et de leurs modifications post-traductionnelles dans le sérum [27].

Ce couplage a été mis en œuvre pour préconcentrer et analyser en ligne de courts brins d'ARN et suivre leurs modifications post-traductionnelles. La microcartouche SPE (0,7 cm x 250 μm d.i.), préalablement remplie de particules de carbure de silicium SiC, est connectée, en entrée et en sortie au capillaire de séparation (d.i. 75 μm) par des manchons en polymère. Un filtre en coton (épaisseur 1

mm) est inséré entre la cartouche et le capillaire de séparation et empêche la fuite des particules source d'instabilité/rupture de courant de courant. Ce dispositif, directement inséré dans une cassette classique d'électrophorèse capillaire (SPE-CE-MS) a permis un gain de sensibilité d'un facteur 5 à 100 par rapport au couplage direct CE-MS avec préconcentration électrocinétique à l'injection.

Un deuxième exemple de couplage SPE-CE-MS utilisant une microcartouche SPE remplie de particules est illustré ci-dessous (Figure 10).

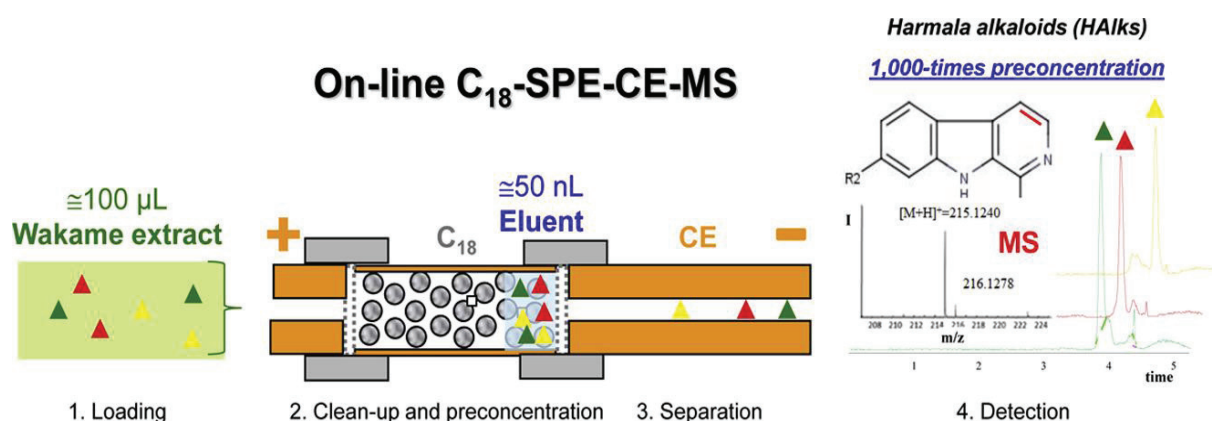


Figure 10 : Couplage C₁₈-SPE-CE-MS pour l'analyse d'alkaloïdes dans des extraits végétaux. Cartouche de préconcentration 7 mm x 250 µm d.i. remplie de particules C₁₈ (dp=55-105 µm), capillaire de séparation 60 cm x 75 µm d.i. Adapté de [28]

La microcartouche de SPE remplie de matériau particulaire C₁₈ (d_p=40µm) est constituée d'un segment de quelques millimètres de capillaire de diamètre élevé (7 mm x 250 µm d.i.), confiné entre deux zones vides de plus faible diamètre [28]. Plus de 100 µL sont percolés (20 minutes à 1 bar) et préconcentrés sur la microcartouche, puis élués dans un volume d'environ 50 nL avant séparation et détection. Avec une telle configuration, les auteurs quantifient par C₁₈-SPE-CE-MS des alcaloïdes dans des extraits de plantes avec un facteur de préconcentration de 1000 par rapport à un couplage classique CE-MS.

Comme le notent les auteurs, la configuration utilisée en couplage SPE-CE avec des colonnes remplies, n'est pas idéale car il serait préférable que la cartouche de préconcentration soit placée juste à l'entrée du capillaire pour éviter l'élargissement du créneau d'élution avant son arrivée sur la zone de préconcentration pour désorber les analytes. A titre d'exemple, dans le cas d'un appareillage Agilent, la zone de SPE est localisée à une distance minimale de 8 cm de l'extrémité du capillaire.

Une dernière alternative pour les colonnes particulaires consiste à utiliser des particules magnétiques comme support d'extraction. Une telle option a été mise en œuvre avec un appareil commercial d'électrophorèse capillaire de zone [29]. Deux aimants, placés à l'intérieur de la cassette maintiennent les particules magnétiques à une distance d'environ 10 cm de l'extrémité du capillaire (Figure 11).

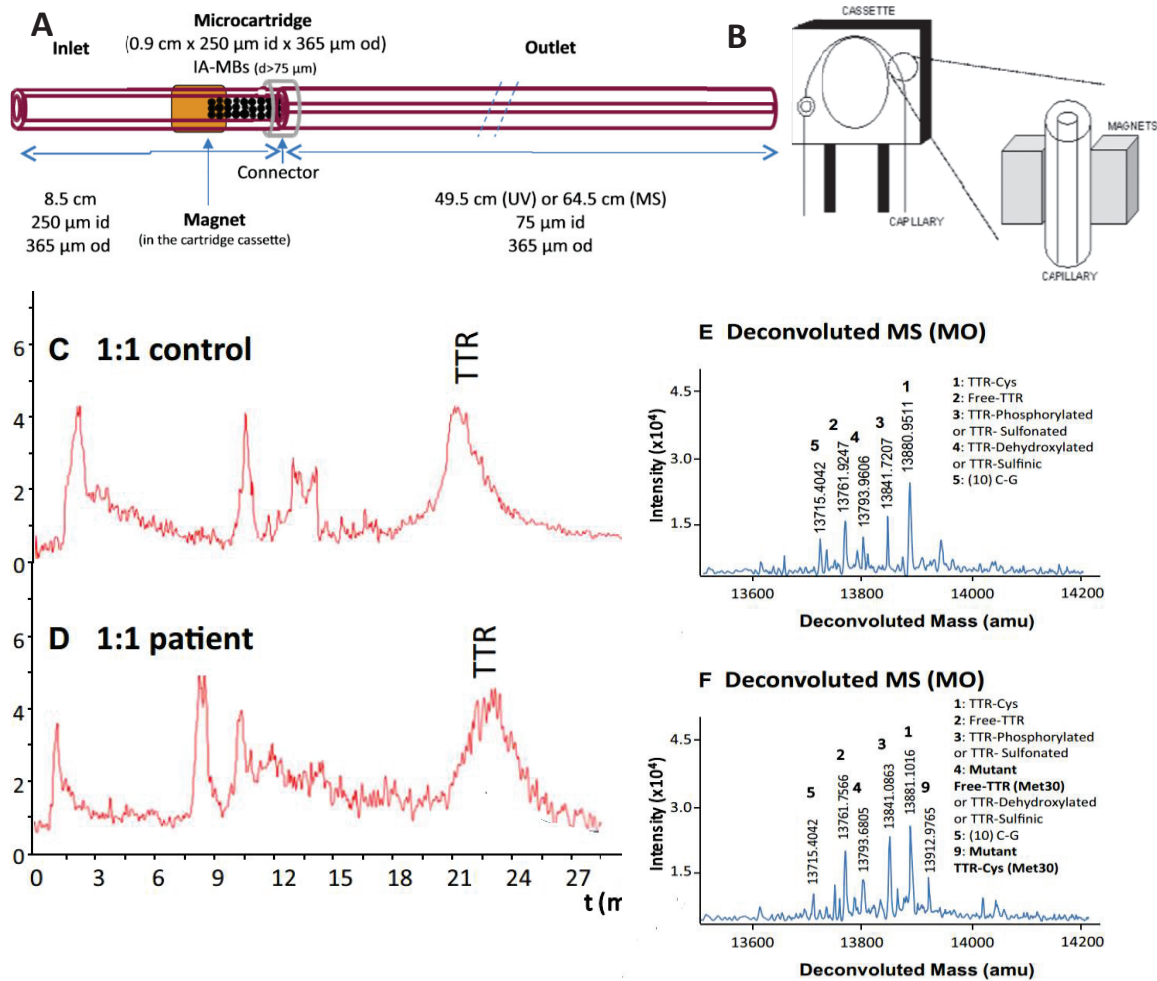


Figure 11. A) configuration de la colonne IA-SPE-CE, B) dispositif cassette pour colonne avec billes magnétiques ; C) électrophorogrammes en couplage IA-SPE-CE-MS d'un échantillon de serum déprotéinéisé de contrôle et de patient sain ; E et F) spectres de masse après déconvolution [29].

Des particules magnétiques greffées de Proteine A ont été utilisées pour capturer des anticorps polyclonaux anti-Transsthyrétine (TTR) et obtenir un support d'immunopréconcentration anti-TTR. Dans les conditions optimales, le couplage IA-SPE-CE-MS a permis, après une simple précipitation des protéines les plus abondantes de l'échantillon, de disposer d'une méthode de dépistage de la polyneuropathie amyloïdotique familiale de type I par comparaison d'échantillons de témoins sains et de patients atteints de FAP1.

- Micro-cartouches SPE monolithiques

Pour s'affranchir de la préparation assez délicate des colonnes remplies particulières, les monolithes synthétisables *in-situ* et de façon localisable directement à l'intérieur du capillaire de séparation électrophorétique, constituent une alternative intéressante. Ils permettent non seulement

de s'affranchir de tous les aspects délicats liés aux connectiques et, contrairement aux microcartouches SPE particulières, peuvent être localisés juste en entrée de capillaire. Les monolithes organiques ou inorganiques sont utilisés pour de telles applications. Les premiers, dont la synthèse peut être localisée et très rapide si elle est réalisée par voie photochimique, présentent une résistance chimique élevée mais une surface spécifique faible (de l'ordre de la dizaine de $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$) [30] limitant leur capacité. Les monolithes inorganiques à base de silice, dont la synthèse par procédé sol-gel est relativement longue, offrent quant à eux des surfaces spécifiques très élevées (plusieurs centaines de m^2/g) mais une résistance chimique moindre. Selon les applications, et plus particulièrement les conditions de capture et de relargage des analytes, les uns ou les autres seront privilégiés.

Dovici et al ont synthétisé un monolithe de silice hybride (1 cm x 50 μm d.i.) greffé sulfonate (échangeur de cations SCX) à l'extrémité d'entrée du capillaire de séparation et l'ont utilisé comme zone de préconcentration (Figure 12). L'échantillon est percolé en milieu acide et élué en milieu basique. La séparation électrophorétique étant réalisée en milieu acide, cette combinaison de tampons conduit à la formation d'une interface de pH (dynamic pH junction) qui permet le maintien d'efficacité élevées malgré le volume d'éluat important. Pour un volume total de capillaire de séparation de 1,1 μL , un volume d'échantillon de 21 μL a pu être percolé, conduisant à un facteur d'enrichissement de 3000 par comparaison avec une injection électrocinétique standard. Ce système, appliqué à l'analyse d'un digestat tryptique (5 μL de digestat chargés) a permis l'identification de 109 protéines et 271 peptides pour une durée totale de séparation de 20 minutes. [31]

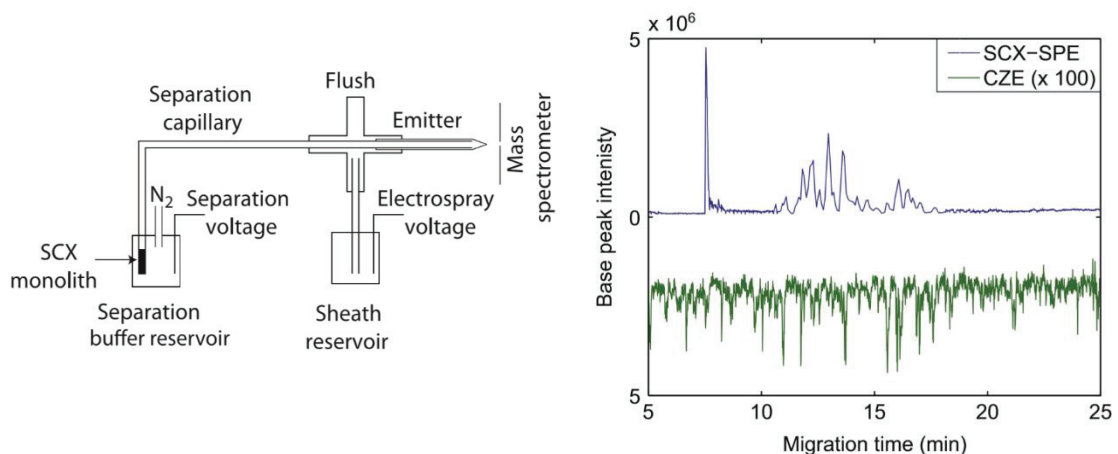


Figure 12 : A) Schéma du dispositif SPE-CE-MS. Le liquide additionnel est pompé par électroosmose grâce à la tension appliquée pour former l'électrospray. B) électrophoregramme d'un digestat d'E. Coli. La trace bleue correspond à l'injection de 5,5 μL de digestat avec le système SCX-SPE-CE-MS/MS; la trace verte (en miroir et en bas) correspond à l'analyse de 30 nL de digestat sans préconcentration (CE-MS/MS) : cette trace a été multipliée par 100 [31].

A côté des interactions peu spécifiques basées sur l'établissement de liaisons non covalentes (physisorption, complexation ou liaison ionique) couramment utilisées dans la plupart des colonnes d'extraction sur phase solide (SPE-SPME) [32–34], les interactions par reconnaissance moléculaire, beaucoup plus spécifiques, permettent l'extraction sélective de cibles d'intérêt dans des matrices complexes (supports à empreinte moléculaire (MIP) et immunoaffinité entres autres). Une sélectivité élevée pour les analytes cibles est généralement souhaitée car elle conduit à des échantillons moins complexes et évite ensuite les effets de matrice lors des étapes ultérieures de séparation et de détection. La réversibilité de ces interactions les prédestine pour des applications de capture et élution en préparation d'échantillon. En plus de la grande spécificité, les grandes valeurs d'affinité qui caractérisent ces interactions permettent de percoler de grands volumes d'échantillons très dilués pour préconcentrer efficacement l'échantillon.

Pour cela, le développement de supports sélectifs, c'est-à-dire de supports pour lesquels il existe une interaction spécifique avec une classe de molécules est nécessaire. Il est entendu que cette interaction avec le support doit être réversible dans le cadre de la préparation d'échantillon en amont d'une étape séparative.

Afin d'élargir la gamme de molécules ciblées, des techniques basées sur des mécanismes dits de Chimie Covalente Réversible (Reversible Covalent Chemistry, RCC) ont été étudiées pour simplifier la préparation de l'échantillon. Les réactions chimiques présentent, par nature, une polyvalence et sélectivité uniques. En effet, contrairement aux liaisons ioniques, les liaisons covalentes comportent au moins une paire d'électrons de liaison partagée par deux noyaux atomiques, ces derniers étant pour la plupart des non-métaux d'électronégativité similaire. Cela implique que les liaisons covalentes sont directionnelles, ce qui oblige les partenaires de liaison à être compatibles à la fois électroniquement et géométriquement [35]. La RCC ajoute ainsi une nouvelle dimension aux techniques de préparation d'échantillon : la sélectivité chimique. En sélectionnant les analytes en fonction de leur réactivité vis-à-vis de la formation de liaisons covalentes, la complexité de l'échantillon peut être considérablement réduite afin d'améliorer la détectabilité des espèces cibles en faible abondance. Les principales réactions incluent la formation d'esters boroniques réversibles, l'échange thiol-disulfure et la formation réversible d'hydrazones qui ciblent des groupes d'analytes tels que les diols (sucres, glycoprotéines et glycopeptides et catéchols), les thiols (protéines et peptides avec cystéines) et les carbonyles (protéines carbonylées, mycotoxines). Leurs applications couvrent les domaines de la protéomique, du marquage réversible à l'analyse qualitative et quantitative dans le domaine de l'agroalimentaire. La RCC implique généralement deux étapes distinctes, nécessitant des conditions

différentes (pH, solvant, catalyseurs) pour le couplage/capture, i.e. la formation d'au moins une liaison covalente à au moins une molécule d'analyte et le découplage/libération, c'est-à-dire le clivage des liaisons covalentes formées précédemment (Figure 13) [36].

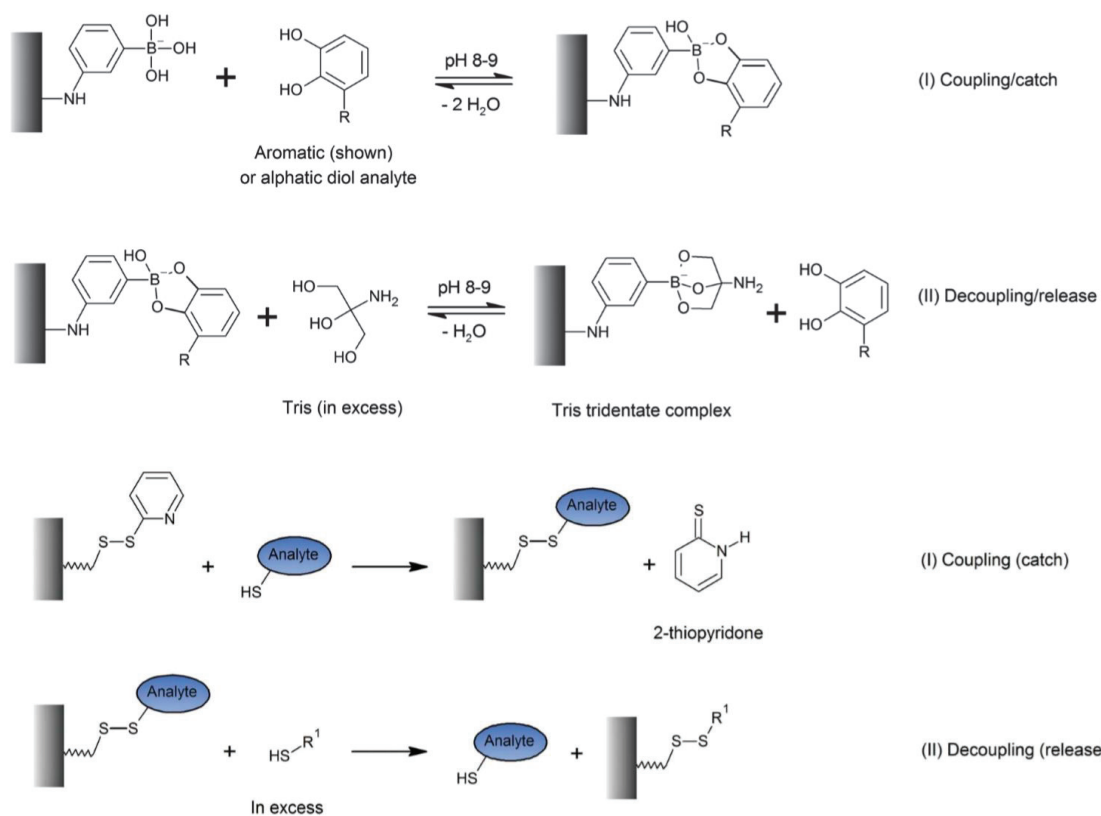


Figure 13. Illustration des réactions de formation d'esters boroniques réversibles (en haut) et d'échange thiol-disulfure (en bas). Adapté de [36].

Parmi les concepts précédemment mentionnés, la formation d'ester boronique réversible est le plus documenté. En effet, les APB ont été utilisés par les chercheurs depuis les années 80s afin de cibler la famille des composés cis-diols qui comporte une vaste gamme de composés biologiquement pertinents comme les catéchols, les sucres et les biomolécules glycosylées telles que l'acide ribonucléique (ARN), les nucléosides, les glycoprotéines et les glycopeptides. Ces biomolécules jouent un rôle essentiel dans divers processus biologiques aussi bien que dans le diagnostic de certaines maladies [37]. Par exemple, les glycanes et les glycoprotéines jouent un rôle important dans la reconnaissance intercellulaire et la réponse immunitaire, ainsi qu' en tant que biomarqueurs pour le dépistage du cancer [38–43]. Aussi, les catécholamines pourraient jouer un rôle central dans la neurodégénérescence de la maladie de Parkinson ou dans la maladie d'Alzheimer [25,26], et dans le diagnostic de pheochromocytoma [46,47], et d'addiction aux drogues [48,49]. En effet, les diols en général, et les sucres en particulier, sont un motif structural commun mais non omniprésent dans de

nombreuses biomolécules. De là, la pertinence de l'utilisation de la BAC dans le traitement d'échantillon.

Au regard de l'évolution des méthodes séparatives de plus en plus poussées vers la miniaturisation et l'intégration des étapes analytiques, il nous semble intéressant de développer des capillaires monolithiques d'affinité boronate afin de surmonter les défis liés à l'analyse des échantillons complexes en termes de purification et préconcentration, et de les coupler « in-line » à des techniques séparatives électrocinétiques miniaturisées afin d'ouvrir la voie à des analyses automatisées et donc, simplifiées.

D'après notre recherche bibliographique, une large gamme de matériaux a été utilisée pour la BAC. De manière générale, les groupes acides boroniques réactifs sont soit introduits par fonctionnalisation d'un matériau pré-synthétisé, soit par copolymérisation d'un dérivé phénylboronique (par exemple copolymère 3-acrylamidophénylboronique acide / N,N-diméthylacrylamide). Cependant, les voies de fonctionnalisation publiées jusqu'à présent restent encore chronophages et non-localisables ce qui a limité leur utilisation au couplage « on-line » avec la chromatographie en phase liquide.

En outre, malgré les nombreuses études réalisées dans la littérature concernant l'affinité boronate, les multiples mécanismes (primaires ou secondaires) et l'effet des conditions d'analyse sur la reconnaissance ne sont pas encore toujours clairement élucidés ou présentés.

C'est pourquoi nous avons voulu répondre à certaines « questions » dans la recherche liée à la compréhension de l'affinité boronate (Chapitre I), élargir les voies de fonctionnalisation de phases stationnaires monolithiques (Chapitre II) et proposer de nouveaux outils permettant l'analyse miniaturisée et intégrée des composés cis-diols (Chapitre III), par couplage « in-line » de la μ SPE avec l'électrophorèse capillaire et la cIEF selon le schéma de principe suivant (Figure 14).

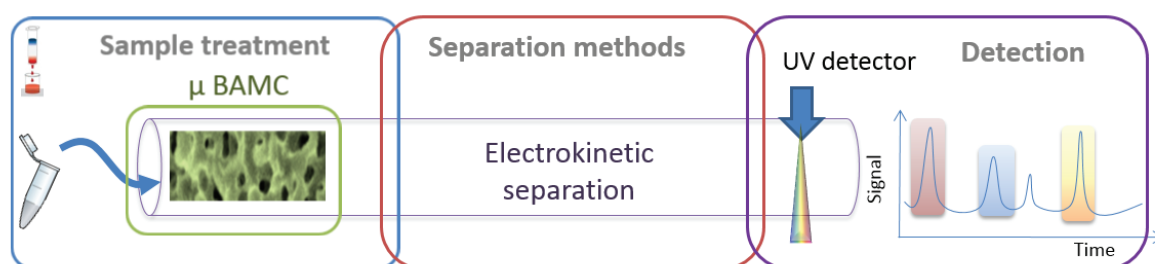


Figure 14. Représentation schématique du couplage « in-line » d'une unité μ SPE d'affinité boronate, μ BAMC (micro boronate affinity monolithic column), à une séparation électrocinétique et une détection UV, envisagé dans ce travail de thèse.

Références bibliographiques

- [1] Caractérisation du cerveau, cellule par la cellule, News-Medicalnet. (2017). <https://www.news-medical.net/news/20170123/62/French.aspx>.
- [2] R. Badugu, J.R. Lakowicz, C.D. Geddes, A glucose-sensing contact lens: from bench top to patient, *Curr. Opin. Biotechnol.* 16 (2005) 100–107. doi:10.1016/j.copbio.2004.12.007.
- [3] M.F. Mora, F. Greer, A.M. Stockton, S. Bryant, P.A. Willis, Toward Total Automation of Microfluidics for Extraterrestrial In Situ Analysis, *Anal. Chem.* 83 (2011) 8636–8641. doi:10.1021/ac202095k.
- [4] L. Vio, G. Crétier, F. Chartier, V. Geertsen, A. Gourgiotis, H. Isnard, J.-L. Rocca, Separation and analysis of lanthanides by isotachopheresis coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry, *Talanta*. 99 (2012) 586–593. doi:10.1016/j.talanta.2012.06.041.
- [5] I. Rodríguez-Ruiz, F. Lamadie, S. Charton, Uranium(VI) On-Chip Microliter Concentration Measurements in a Highly Extended UV–Visible Absorbance Linearity Range, *Anal. Chem.* 90 (2018) 2456–2460. doi:10.1021/acs.analchem.7b05162.
- [6] M.C. Breadmore, Recent advances in enhancing the sensitivity of electrophoresis and electrochromatography in capillaries and microchips, *ELECTROPHORESIS*. 28 (2007) 254–281. doi:10.1002/elps.200600463.
- [7] P. Anrès, Développement de nouvelles méthodologies de préconcentration électrocinétique in-situ en électrophorèse capillaire pour l'analyse de traces, 2012.
- [8] A.R. Timerbaev, T. Hirokawa, Recent advances of transient isotachopheresis-capillary electrophoresis in the analysis of small ions from high-conductivity matrices, *ELECTROPHORESIS*. 27 (2006) 323–340. doi:10.1002/elps.200500320.
- [9] C. Eid, J.G. Santiago, Isotachopheresis applied to biomolecular reactions, *Lab. Chip.* 18 (2018) 11–26. doi:10.1039/C7LC00852J.
- [10] S.S. Bahga, J.G. Santiago, Coupling isotachopheresis and capillary electrophoresis: a review and comparison of methods, *Analyst*. 138 (2013) 735–754. doi:10.1039/C2AN36150G.
- [11] Petr Jan, Maier Vítězslav, Horáková Jana, Ševčík Juraj, Stránský Zdenek, Capillary isotachopheresis from the student point of view – images and the reality, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 2705–2715. doi:10.1002/jssc.200600249.
- [12] B. Jung, R. Bharadwaj, J.G. Santiago, On-Chip Millionfold Sample Stacking Using Transient Isotachopheresis, *Anal. Chem.* 78 (2006) 2319–2327. doi:10.1021/ac051659w.
- [13] C.-C. Lin, J.-L. Hsu, G.-B. Lee, Sample preconcentration in microfluidic devices, *Microfluid. Nanofluidics*. 10 (2011) 481–511. doi:10.1007/s10404-010-0661-9.
- [14] M. Urbánek, L. Křivánková, P. Boček, Stacking phenomena in electromigration: From basic principles to practical procedures, *Electrophoresis*. 24 (2003) 466–485. doi:10.1002/elps.200390056.

- [15] C.-H. Lin, T. Kaneta, On-line sample concentration techniques in capillary electrophoresis: Velocity gradient techniques and sample concentration techniques for biomolecules, *ELECTROPHORESIS*. 25 (2004) 4058–4073. doi:10.1002/elps.200406172.
- [16] A.J. Tomlinson, L.M. Benson, N.A. Guzman, S. Naylor, Preconcentration and microreaction technology on-line with capillary electrophoresis, 8th Int. Symp. High Perform. Capill. Electrophor. Part I. 744 (1996) 3–15. doi:10.1016/0021-9673(96)00332-9.
- [17] Tempels F. W. Alexander, Underberg Willy J. M., Somsen Govert W., de Jong Gerhardus J., Design and applications of coupled SPE-CE, *ELECTROPHORESIS*. 29 (2007) 108–128. doi:10.1002/elps.200700149.
- [18] Ramautar Rawi, Somsen Govert W., de Jong Gerhardus J., Recent developments in coupled SPE-CE, *ELECTROPHORESIS*. 31 (2009) 44–54. doi:10.1002/elps.200900510.
- [19] Ramautar Rawi, de Jong Gerhardus J., Somsen Govert W., Developments in coupled solid-phase extraction–capillary electrophoresis 2009–2011, *ELECTROPHORESIS*. 33 (2011) 243–250. doi:10.1002/elps.201100453.
- [20] Ramautar Rawi, Somsen Govert W., Jong Gerhardus J., Developments in coupled solid-phase extraction–capillary electrophoresis 2011–2013, *ELECTROPHORESIS*. 35 (2013) 128–137. doi:10.1002/elps.201300335.
- [21] P. Puig, F. Borrull, M. Calull, C. Aguilar, Recent advances in coupling solid-phase extraction and capillary electrophoresis (SPE–CE), *TrAC Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 664–678. doi:10.1016/j.trac.2007.05.010.
- [22] K. Shimura, T. Nagai, Capillary isoelectric focusing after sample enrichment with immunoaffinity chromatography in a single capillary, *Sci. Rep.* 6 (2016) 39221. doi:10.1038/srep39221.
- [23] 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. doi:10.1016/j.aca.2014.06.046.
- [24] Hernández Elena, Benavente Fernando, Sanz-Nebot Victoria, Barbosa José, Analysis of opioid peptides by on-line SPE-CE-ESI-MS, *ELECTROPHORESIS*. 28 (2007) 3957–3965. doi:10.1002/elps.200700845.
- [25] M.C. Breadmore, Preconcentration and frontal electroelution of amino acids for in-line solid-phase extraction–capillary electrophoresis, *Young Anal. Fac. Asia.* 556 (2006) 121–126. doi:10.1016/j.aca.2005.07.069.
- [26] K. Jooß, J. Sommer, S.-C. Bunz, C. Neusüß, In-line SPE-CE using a fritless bead string design—Application for the analysis of organic sulfonates including inline SPE-CE-MS for APTS-labeled glycans, *ELECTROPHORESIS*. 35 (2014) 1236–1243. doi:10.1002/elps.201300388.
- [27] R. Pero-Gascon, V. Sanz-Nebot, M.V. Berezovski, F. Benavente, Analysis of Circulating microRNAs and Their Post-Transcriptional Modifications in Cancer Serum by On-Line Solid-Phase Extraction–Capillary Electrophoresis–Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 90 (2018) 6618–6625. doi:10.1021/acs.analchem.8b00405.

- [28] M. Tascon, L.G. Gagliardi, F. Benavente, Parts-per-trillion detection of harmala alkaloids in *Undaria pinnatifida* algae by on-line solid phase extraction capillary electrophoresis mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta.* 954 (2017) 60–67. doi:10.1016/j.aca.2016.12.012.
- [29] Peró-Gascón Roger, Pont Laura, Benavente Fernando, Barbosa José, Sanz-Nebot Victoria, Analysis of serum transthyretin by on-line immunoaffinity solid-phase extraction capillary electrophoresis mass spectrometry using magnetic beads, *ELECTROPHORESIS.* 37 (2016) 1220–1231. doi:10.1002/elps.201500495.
- [30] J.C. Masini, F. Svec, Porous monoliths for on-line sample preparation: A review, *Anal. Chim. Acta.* 964 (2017) 24–44. doi:10.1016/j.aca.2017.02.002.
- [31] Z. Zhang, L. Sun, G. Zhu, X. Yan, N.J. Dovichi, Integrated strong cation-exchange hybrid monolith coupled with capillary zone electrophoresis and simultaneous dynamic pH junction for large-volume proteomic analysis by mass spectrometry, *Talanta.* 138 (2015) 117–122. doi:10.1016/j.talanta.2015.01.040.
- [32] H. Lord, J. Pawliszyn, Evolution of solid-phase microextraction technology, *J. Chromatogr. A.* 885 (2000) 153–193. doi:10.1016/S0021-9673(00)00535-5.
- [33] M.-C. Hennion, Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 856 (1999) 3–54. doi:10.1016/S0021-9673(99)00832-8.
- [34] L.A. Berrueta, B. Gallo, F. Vicente, A review of solid phase extraction: Basic principles and new developments, *Chromatographia.* 40 (1995) 474–483. doi:10.1007/BF02269916.
- [35] L.J. Prins, P. Scrimin, Covalent Capture: Merging Covalent and Noncovalent Synthesis, *Angew. Chem. Int. Ed.* 48 (2009) 2288–2306. doi:10.1002/anie.200803583.
- [36] D. Siegel, Applications of reversible covalent chemistry in analytical sample preparation, *Analyst.* 137 (2012) 5457–5482. doi:10.1039/C2AN35697J.
- [37] J.W. Hughes, L. Watkins, J.A. Blumenthal, C. Kuhn, A. Sherwood, Depression and anxiety symptoms are related to increased 24-hour urinary norepinephrine excretion among healthy middle-aged women, *J. Psychosom. Res.* 57 (2004) 353–358. doi:10.1016/j.jpsychores.2004.02.016.
- [38] S. Yang, P.G. Wang, Method development of glycoprotein biomarkers for cancers, *Bioanalysis.* 9 (2017) 903–906. doi:10.4155/bio-2017-0077.
- [39] M.J. Kailemia, D. Park, C.B. Lebrilla, Glycans and glycoproteins as specific biomarkers for cancer, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 395–410. doi:10.1007/s00216-016-9880-6.
- [40] E. Song, Y. Mechref, Defining glycoprotein cancer biomarkers by MS in conjunction with glycoprotein enrichment, *Biomark. Med.* 9 (2015) 835–844. doi:10.2217/bmm.15.55.
- [41] Y. Tian, H. Zhang, Characterization of disease-associated N-linked glycoproteins, *Proteomics.* 13 (2013). doi:10.1002/pmic.201200333.
- [42] Y.H. Ahn, J.Y. Kim, J.S. Yoo, Quantitative mass spectrometric analysis of glycoproteins combined with enrichment methods, *Mass Spectrom. Rev.* 34 (2015) 148–165. doi:10.1002/mas.21428.

- [43] M.A. Connelly, E.G. Gruppen, J.D. Otvos, R.P.F. Dullaart, Inflammatory glycoproteins in cardiometabolic disorders, autoimmune diseases and cancer, *Clin. Chim. Acta.* 459 (2016) 177–186. doi:10.1016/j.cca.2016.06.012.
- [44] H. Sawada, T. Oeda, K. Yamamoto, Catecholamines and Neurodegeneration in Parkinson's Disease—From Diagnostic Marker to Aggregations of α -Synuclein, *Diagnostics.* 3 (2013) 210–221. doi:10.3390/diagnostics3020210.
- [45] L. Liu, Q. Li, N. Li, J. Ling, R. Liu, Y. Wang, L. Sun, X.H. Chen, K. Bi, Simultaneous determination of catecholamines and their metabolites related to Alzheimer's disease in human urine, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 1198–1204. doi:10.1002/jssc.201000799.
- [46] T.G. Rosano, T.A. Swift, L.W. Hayes, Advances in catecholamine and metabolite measurements for diagnosis of pheochromocytoma., *Clin. Chem.* 37 (1991) 1854–1867.
- [47] G. Eisenhofer, M. Peitzsch, Laboratory Evaluation of Pheochromocytoma and Paraganglioma, *Clin. Chem.* 60 (2014) 1486–1499. doi:10.1373/clinchem.2014.224832.
- [48] D. Weinschenker, J.P. Schroeder, There and Back Again: A Tale of Norepinephrine and Drug Addiction, *Neuropsychopharmacology.* 32 (2007) 1433–1451. doi:10.1038/sj.npp.1301263.
- [49] P.J. Fitzgerald, Elevated Norepinephrine may be a Unifying Etiological Factor in the Abuse of a Broad Range of Substances: Alcohol, Nicotine, Marijuana, Heroin, Cocaine, and Caffeine, *Subst. Abuse Res. Treat.* 7 (2013) 171–183. doi:10.4137/SART.S13019.

Chapitre I

Etat de l'art sur la chromatographie d'affinité boronate

Back to BAC: Insights into Boronate Affinity Chromatography Interaction Mechanisms

Published in *Separation & Purification Reviews* (2017) 47:3, 214-228, DOI: 10.1080/15422119.2017.1365085

Maria Betzabeth Espina-Benitez, Jérôme Randon, Claire Demesmay, Vincent Dugas*

Université de Lyon, CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, ENS de Lyon, Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280, 5 rue de la Doua, F-69100 VILLEURBANNE, France

* Corresponding author. Tel. : +33437423552

E-mail address: vincent.dugas@isa-lyon.fr

Abstract:

Boronate Affinity Chromatography (BAC) is commonly used in sample preparation techniques for its peculiar selectivity for cis-diol containing compounds. Various chromatographic materials based on phenylboronic acid (PBA) functionalization have been designed. This review aims at presenting the versatility of the underlying mechanisms of boronate affinity chromatography (BAC). The PBA moiety presents secondary / complementary / interfering interactions, i.e. hydrophobic, electrostatic, hydrogen-bonding interactions. The sound understandings of these mechanisms are very helpful to manipulate the selectivity, which is key feature of biomolecular sample treatment. Each interaction is reviewed and illustrated by specific examples. Special attention is paid to decipher the underlying role of PBA-support for sugars, glycans and glycoconjugates recognition.

Key words: boronate affinity chromatography, diols, glycans, glycoconjugates, phenylboronic acid, separation mechanisms, sugars.

Table of contents

1. Introduction.....	29
2. The specific PBA-cis-diol interaction: from a theoretical point of view.....	31
3. Hydrophobic and π - π interactions	32
4. Lewis acid-base interactions	34
4.1. Influence of the presence of Lewis bases in reaction media.	34
4.2. Influence of the presence of Lewis base sites on sample molecules.....	36
5. Electrostatic interactions.....	37
6. Hydrogen Bonding interactions.....	40
7. Boronate affinity with saccharides, glycans and glyconjugates	41
7.1. Monosaccharides and derivatives (nucleosides, nucleotides etc..).....	42
7.2. Glycated proteins	44
7.3. Glycoconjugates (glycopeptides, glycoproteins).....	44
7.4. Sialylated glycoproteins.....	49
8. Conclusion	51
9. References.....	52

1. Introduction

Solid-phase sample preparation relies on molecular interactions ranging from non-specific interactions to highly specific interactions and aims at purifying and preconcentrating target molecules. Apart from standard C₁₈ reversed-phase and ion-exchange chromatography that allows working on large class of molecules, i.e. non-polar compounds and ionic species respectively, affinity-based chromatography allows the selective isolation and preconcentration of target molecules. This is of paramount importance in the field of life sciences. In such domain, analytical challenges faces huge issues, i.e low volume sample, complex matrices, large dynamic range of concentration. Since a decade, boronate affinity chromatography (BAC) has garnered increasing interest for the selective enrichment of cis-diol containing compounds in biological fluids for example [1–3]. This quite old-concept [4] was revisited in the miniaturized scale. Reviews on the latest advances in BAC focus specifically on the development and application of monolithic columns [5,6] with specific emphasis on the effects of the structure of boronate ligands and supporting materials on the properties of boronate affinity materials [7], such as binding pH, affinity, selectivity, binding capacity. Furthermore, a wide portfolio of BAC materials was also investigated covering SPME fibers [7–10], magnetic nanoparticles [11–18] and mesoporous nanomaterials [19–21] for sample preparation purpose. BAC was often depicted in a somewhat simplistic or restrictive manner as “allowing specific interactions with cis-diol containing compounds”, omitting to mention the more complex character brought by such phenyl boronate affinity (PBA) materials.

Our current review summarizes the various underlying mechanisms that stand for *specific cis-diol interactions* and *non-specific interactions* occurring in boronate affinity chromatography. Indeed, the large diversity of targeted compounds, spanning from small-molecule neurotransmitters, flavonoids, saccharides to large glycoconjugates (glycolipids, glycoproteins...), implies to address BAC with a comprehensive overview of the interactions with the PBA moiety. Figure 1 illustrates these overall PBA-solutes interactions, depending on the chemical features of the target molecules.

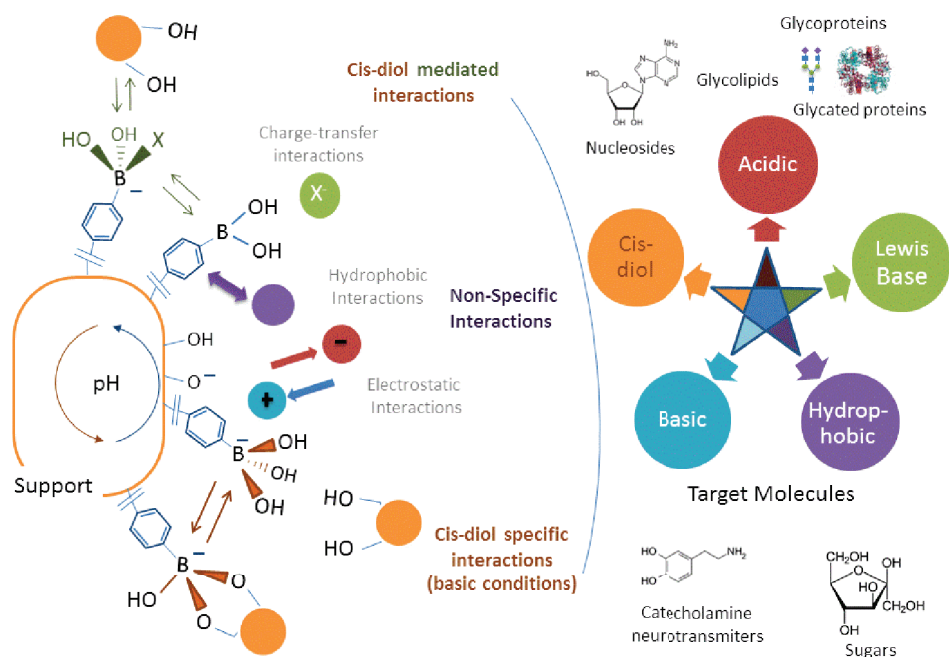


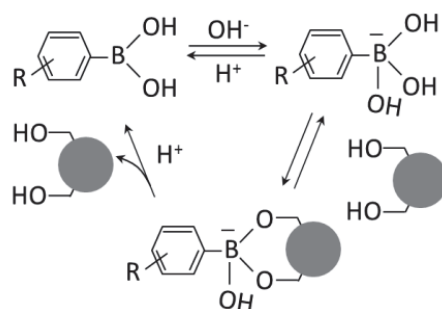
Figure 1. Schematic overview of the various interactions occurring on PBA support with targeted molecules with various chemical features.

The targeted cis-diol containing compounds, as well as interfering molecules present in the sample solution, may exhibit some specific physico-chemical properties that can potentially modify the PBA-cis-diol interactions, *viz* ionic and ionizable groups, non-polar moieties and Lewis-base sites. These physico-chemical features can develop a panel of interactions with PBA moiety. These mechanisms will be systematically addressed with a specific emphasis on their separation- and purification-related behavior. Indeed, to our knowledge, such overall vision is missing and to our experience highly valuable. Thus, this review aims at giving an overview to scientists as well as to students looking for additional information and method's limits concerning the implementation of BAC in new analytical processes.

This review begins with a brief and “simple” description of the well-known PBA-cis-diol interaction. Each secondary interaction will be thereafter considered; *i.e.*, hydrophobic interactions, Lewis acid-base interactions, electrostatic interactions and hydrogen-bonding interactions. The last section will focus on saccharides and related-compounds due to the great interest raised by such compounds and the complexity of their interactions with PBA. For instance, while PBA is regarded as a promising tool for saccharides in water, its use for glycoconjugates in dilute and complex matrices faces to severe limitations[22]. Furthermore, adequate comprehension of the overall mechanisms is mandatory for affinity and selectivity purposes.

2. The specific PBA-cis-diol interaction: from a theoretical point of view

The use of PBA-functionalized materials in separation sciences relies on the well-known specific interaction of the boronic acid moiety with 1,2 or 1,3 cis diol-containing compounds, leading respectively to 5- and (less stable) 6-membered rings [23]. Schematic of the interaction between boronic acids and cis-diol-containing target molecules is given scheme 1.



Scheme 1. Interaction scheme between PBA and diols.

Phenylboronic acids are pH sensitive species. At low pH ($\text{pH} < \text{pKa}$), the boronic acid group exhibits a planar trigonal form that interacts rapidly with cis-diol containing compounds to form a neutral cyclic ester. In aqueous media such compounds are not stable enough to be detected [24]. Under basic conditions, the boronate form is an anionic specie exhibiting a tetrahedral configuration. This form accounts for the most reactive and stable specie in aqueous media. As a result, the selective capture of cis-diol containing compounds operates under basic conditions ($\text{pH} > \text{pKa}$ of PBA moiety) while elution proceeds through acidic conditions. The PBA-cis-diol interaction is often depicted as a “reversible covalent complex”. This term can lead to the straightforward and erroneous conclusion that boronate affinity chromatography (BAC) is a high-affinity mechanism like immunoaffinity chromatography (IAC). In such embodiment, it should be possible to (i) purify cis-diol containing compounds with a high degree of purity, (ii) attain high preconcentration factors through percolation of large volumes of very dilute sample solutions through small SPE columns. Unfortunately, this optimistic vision is erroneous. Indeed, the binding strength (affinity) of the interaction is characterized through median association constants (K_a) (or its reciprocal dissociation constant (K_d)) under given experimental conditions (i.e buffer composition, pH and temperature). By way of comparison, the reversible “covalent complexes” between PBA and cis-diol groups are characterized by a significantly lower affinity ($10^{-1} < K_d < 10^{-4}$ M) when compared to immunoaffinity interactions ($K_d < 10^{-7}$ M)[7,25].

For cis-diol containing compounds, the affinity has been reported to be dependent of the degree of “*pre-organization*” of the cis-diol compounds for interaction with PBA. For instance, the affinity is optimal for compounds exhibiting a co-planar configuration, due to low energy barrier to be overcome [24,26]. Catechol (1,2-dihydroxybenzene) is a cis-diol-containing compound exhibiting a low K_d value ($\sim 300 \mu\text{M}$) i.e. a high affinity [27] with PBA. Neurotransmitter’s catecholamines are thus well-suited compounds for BAC. The relatively high K_a values for these class of molecules open the frame to the selective preconcentration and purification of epinephrine, norepinephrine and dopamine from urine sample through on-line [10,28,29] and in-line [30] analytical processes. In-line analysis represents the highest level of integration of analytical process. Espina et al. have recently investigated the in-line coupling of a miniaturized boronate affinity monolithic column with capillary zone electrophoresis for the selective enrichment of the epinephrine, norepinephrine and dopamine from urine sample. It is well known that capillary electrophoresis is a powerful separation technique but that its sensitivity (i.e. UV detection) can be seen as its Achilles heel. The in-line coupling with a boronate affinity-based sample preparation step overcomes this limitation.

3. Hydrophobic and π - π interactions

Apart from secondary interactions coming from the underlying solid surface chemistry (surface material properties, functional layer, nature of the spacer arm linkage) the aromatic ring of PBA may be source of hydrophobic and π - π interactions.

Ren et al [31] have investigated the properties of porous polymer boronate affinity columns (poly(VPBA-co-EDMA)) by liquid chromatography and revealed that multiple intermolecular interactions exist. Complete separation of low-molecular weight alkylbenzenes was successfully obtained in RP-phased liquid chromatography. The moderate retention (under 45:55 water/ACN mobile phase) was supposed to be supported by the presence of the phenyl groups (Figure 2A).

Baseline separation of an aniline test mixture was obtained on the C_{12} -Wulff-PBA column and standard ODS column (Figure 2B) under the same elution conditions [32]. The authors attributed the relatively strong retention of some aniline solutes on the C_{12} Wulff-PBA column as well as the lower efficiency to the presence of additional interactions, such as electrostatic and π - π interactions.

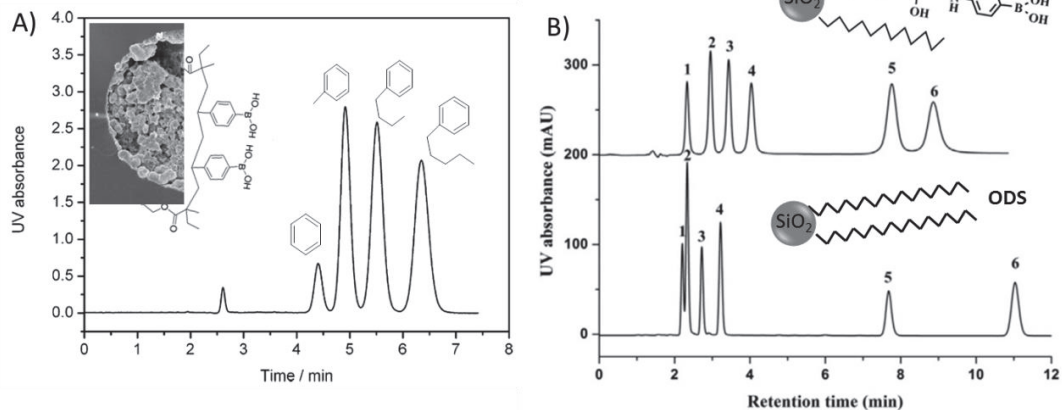


Figure 2. Separation of alkylbenzenes on poly(VPBA-co-EDMA) monolithic capillary column with 75 μm I.D. PBA (adapted from [31] (A) and separation of anilines on C₁₂-Wulff-PBA and ODS on C₁₂-Wulff-PBA mixed-mode column. Mobile phase: methanol-water (50:50, v/v). Peaks: 1, aniline; 2, m-nitroaniline; 3, o-nitroaniline; 4, 1-aminonaphthalene; 5, diphenylamine; 6, 2,4,6-trichloroaniline (B) (adapted from [32]).

If these authors have used this hydrophobic character to separate apolar compounds and to manipulate the selectivity under reversed phase mode, such secondary interactions are usually unwanted in purification purposes [33]. Indeed, such nonspecific interactions can lead to a loss of specificity during handling of complex matrices i.e. apolar compounds can be retained during percolation of aqueous sample solutions. Fortunately, it was reported that the addition of a low percentage of MeOH (up to 40%) in the percolation/washing solution, can easily suppress interferences due to non-specific hydrophobic interactions while not affecting the affinity of the cis-diol compounds with PBA. However, higher organic modifier contents or the replacement of methanol by acetonitrile impairs the affinity (Figure 3) [30]. The possibility to use organic modifiers without significantly affecting the affinity during SPE steps is a unique feature of BAC. Indeed, the high affinity-based (antibody and aptamer) SPE is strongly affected by organic solvents during the loading step. If the use of organic solvent is precluded owing to sample solubility/stability issues, hydrophilic materials (i.e. methylenebisacrylamide-based monolith) may limit or avoid such undesirable hydrophobic interactions [33–36] in aqueous conditions.

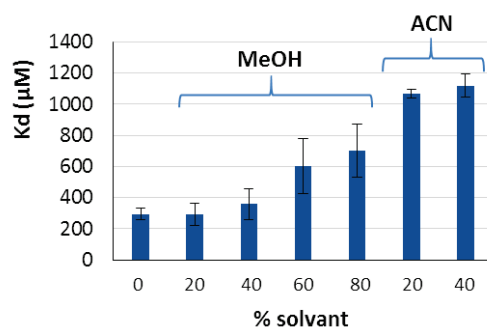


Figure 3. Influence of the organic modifier content in the mobile phase on the catechol-PBA affinity. (adapted from [30]).

4. Lewis acid-base interactions

Lewis acidity is one of the most important physicochemical properties of boronic molecules [37]. With an incomplete set of valence electrons bor(on)ic acids interact with Lewis bases by donating a pair of electrons to form a covalent bond. In an aprotic solvent, boronic acids are frequently used as Lewis acid catalysts and chelating agents for reaction control in organic synthesis [38].

4.1. Influence of the presence of Lewis bases in reaction media.

It is assumed that water-borne hydroxyl ions, in aqueous basic solution, act as Lewis bases, leading to the tetragonal form of the boronic acid moiety. Lewis acid-base interactions, in aqueous media, occur at low pH where the neutral acidic trigonal form of the boronic acid moiety is predominant [31] and water-borne hydroxyl ion competitors negligible. Inorganic anions (i.e. fluoride, cyanide, phosphate)[24], α -hydroxyacids (i.e. citrate) as well as several functional groups contained in proteins including carboxylate groups (e.g. aspartate and glutamate) and uncharged primary amines (e.g. N-terminus and lysine) are also Lewis bases [39]. An overview of the potential Lewis acid-base interactions is given Figure 4.

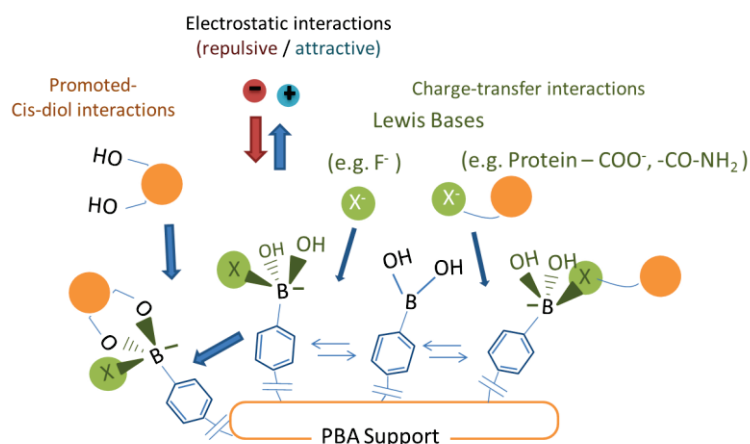


Figure 4. Synoptic of the Lewis acid-base interactions on phenyl boronate supported solid phase.

Inorganic anions such as fluoride and phosphate has been used to modulate the retention of cis-diol containing compounds in BAC [31,40]. Formation of fluoroboronate at pH 7, by simply adding F⁻ anions to the loading buffer, was used to increase the retention of nucleosides with respect of their 2'-deoxyanalogues [40]. Retention of catechol on PBA-functionalized monolithic columns was increased by addition of up to 45 mM of NaF to the mobile phase. It was assumed that the presence of fluoride enhances the complexation of saccharides with boronate ions under less basic conditions [31]. It has been observed that the presence of fluoride enhances the complexation of nucleosides and nucleotides with boronate ions under less basic conditions and facilitates the formation (increase of the stability) of the corresponding anionic esters [40].

Dihydrogen phosphate (i.e. H₂PO₄⁻) also stands for a Lewis base. Increasing the concentration of phosphate buffer was reported to increase the affinity towards uncharged cis-diol containing compounds [30] as illustrated in Figure 5.

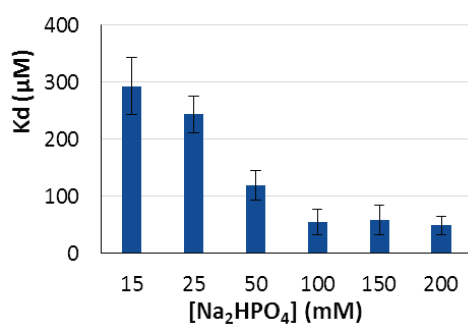


Figure 5. Influence of the phosphate concentration on the catechol-boronate affinity (pH 8.5) (adapted from [30]).

One additional beneficial impact of increasing the buffer concentration (see later electrostatic section) on the affinity concerns the concomitant increase of the ionic strength of the solution. This participates to the reduction of (attractive/repulsive) electrostatic interactions.

4.2. Influence of the presence of Lewis base sites on sample molecules.

Site-specific binding through charge-transfer interaction with PBA has been reported [39]. As depicted Figure 4, some groups with a Lewis base character and present at the surface of proteins are able to bind to PBA moieties. These interactions are involved in the non-specific adsorption of (acidic) proteins onto PBA in acidic buffers [39]. Addition of Lewis bases in the buffer can compete with these non-cis diol interactions. It was also highlighted by the same authors that increasing the concentration of fluoride and hence citrate in the sample buffer results in an increase of the amount of basic proteins adsorption due to electrostatic interactions.

In conclusion, besides the stabilizing effect of the cis-diol-PBA interaction promoted by fluoride or phosphate ions in the solution, others Lewis bases (i.e. citrate ions and some α -hydroxyacids) act as competitors. In solution, such ions allow the formation of stable cyclic complexes through charge transfer interactions, followed by an esterification reaction [39]. Fluoride and citrate ions used as competitors were exploited at low pH to reduce non-specific adsorption of proteins [39]. Figure 4 illustrates the complexity of the specificity brought by such PBA-functionalized surface through the variety of interactions coming from the Lewis acid-base interactions. The negative charge brought by fluoride ions for example is a site of electrostatic repulsion / attraction interaction that causes increase/decrease in affinity.

Lewis acid-base interactions with PBA, have been also investigated under aprotic conditions. Based on a set of model solutes composed of nucleosides and deoxynucleosides as well as of aromatic alcohols and amines, Tuytten et al have compared the impact of some characteristic functional groups on the retention onto PBA in protic and aprotic conditions [41]. In aqueous conditions (pH 8.8), a cumulative effect of the presence of exocyclic amino groups with the cis-diol complexation was observed. For example, retention factors for adenine (purine base), nebularine (purine ring linked to ribofuranosyl moiety) and adenosine (purine base linked to ribofuranosyl moiety) (Figure 6) increased from 1.97 to 11.54. Addition of organic solvent (acetonitrile) up to 80 % in volume to the mobile phase led to suppress the retention of the overall solutes. Interestingly, under aprotic solvent conditions (100 % ACN), cis-diol containing compounds and non-aromatic amines were retained and released when H₂O gradient was applied. It was concluded that trapping

of nucleosides (not restricted to cis-diol compounds) on PBA was possible in 100% ACN. Hence, the apparent Lewis basicity of the functional groups contributes more to the retention mechanism than the presence of a cis-diol group.

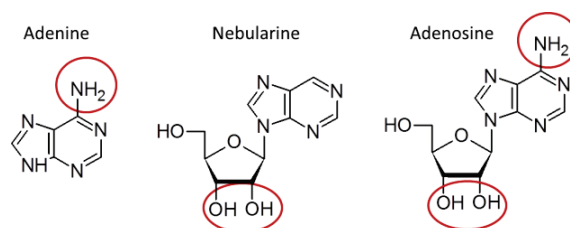


Figure 6. Test compounds allowing discrimination of cis-diol and amine compounds under non-aqueous BAC.

The broad selectivity under aprotic conditions was used to trap the nucleosides in an automated HPLC-column-switching setup compatible with mass spectrometric analysis [42]. Indeed, nucleosides and other compounds of putative clinical value were enriched from urine samples in aprotic conditions from trap BAC column. Elution with 10% of water matches perfectly to their subsequent HILIC separation in combination with ESI-MS detection. Nevertheless, this strategy implies sample treatment of urine in order to obtain non-aqueous sample. In a more straightforward application, non-aqueous solvent conditions were used to purify hydrophobic compounds owing to their poor solubility in aqueous solution especially for those in herbal medicine [43]. Four cis-diol-containing compounds present in herbal medicines (quercetin, rutin, luteolin and baicalin), were used for the adsorption tests. It was concluded that non-aqueous boronate affinity has good selectivity for vicinal cis-diol-containing molecules and that adsorption kinetics in organic solvents are very similar to those obtained in alkaline buffer (pH 9). A methanolic solution of flavonoid glycosides from the crude extraction of cotton flowers was also purified using a boronate affinity monolithic column [44].

5. Electrostatic interactions

Electrostatic interactions are an inevitable secondary interaction mechanism on PBA-functionalized solid supports. As depicted Figure 7, PBA groups are negatively charged when the pH of the surrounding solution exceeds the pK_a value of the boronic acid/boronate couple. The underlying solid support can also participate to electrostatic interactions, i.e. silica-based materials that are widely used in chromatography and hence in BAC are negatively charged at pH > 2-4 due to deprotonation of surface silanol sites.

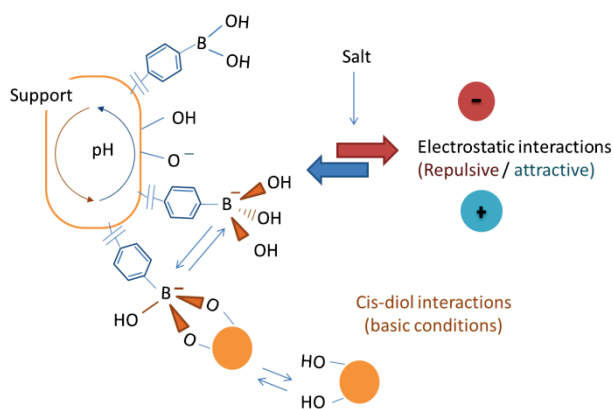


Figure 7. Schematic overview of the electrostatic occurrences on PBA-functionalized support.

Additional electrostatic interactions can have beneficial or deleterious effects on the cis-diol-PBA affinity as well as on the selectivity of the separation. Investigations carried out on the determination of the optimum pH for a given ligand-PBA interaction have led to the following rule: the maximum amount of ester boronate forms at the pH, where the sum of the charges of the free PBA moieties is equal to the charge of the esterified species [24]. Indeed, affinity of catechol-based compounds for PBA increases with pH until approx. 8.5 and decreases after, due to the first step of dissociation of catechol (acid dissociation constant of $pK_a \approx 9.5$). Furthermore, other examples were also reported where specific cis-diol interactions were impeded when cis-diol containing compounds (proteins [39], α -hydroxycarboxylic acid [24]) approaching the surface were negatively charged. However electrostatic repulsion cannot always be mitigated by an increase of the ionic strength (200 mM of NaCl) [39], this is the case of nucleotides that cannot be completely captured [45].

As Lewis bases, fluoride and citrate ions interact with PBA at low pH forming anionic species. Such charge transfer interactions were demonstrated to occur independently from the ionic strength. Since such interactions introduce negative charges to the surface, they conversely promote adsorption of cationic species like cationic proteins [39].

Considering attractive interactions, it was observed that stabilization of the cyclic ester by intramolecular electrostatic interactions can occur. For example, the interaction between the β -furanose anomer of fructosamine (produced by the chemical coupling of glucose with amine residue of proteins) with phenyl boronate derivatives [24] is favored and is stabilized by the electrostatic interaction between the negatively charged boronate moiety and the neighboring positively charged ammonium function of the fructosamine. Regarding cationic species, it is difficult to differentiate specific cis-diol-PBA interactions from adsorption unless addition of salt to screen electrostatic interactions.

Proteins are versatile molecules in essence. The large combinatory associated to the amino acid composition leads to a wide variety of physico-chemical properties (i.e. solubility, isoelectric points, size etc..) and thus to various charge states depending on pH. As described previously, such charge effects lead to loss of affinity and/or specificity. Use of high ionic strength solutions is a readily solution to this electrostatic effect issue [26,39,46]. Divalent cations such as Mg^{2+} have been shown to greatly affect boronate–diol interactions [41,47,48] by stabilizing the anionic boronate complex. It has been observed that while increasing the stability, an increase in divalent cation concentration also participates to an increase in non-specific interactions through electrostatic or hydrophobic effects [47,48].

In conclusion, besides its direct impact on the cis-diol-boronate affinity, the pH affects the overall selectivity of PBA-functionalized support by modulating secondary interactions. The use of a high salt content (or high ionic strength solution) aims at mitigating such secondary interactions. The negative charge brought by the PBA moiety at a pH higher than the pKa of the boronic acid/boronate couple was exploited in cation-exchange chromatography. Ren et al [31] separated basic amino acids (lysine, arginine, alanine) in a 10 mM sodium phosphate buffer (pH 8.5). Recently, Li et al [32] reported the preparation of mixed-mode columns : silica particles were co-functionalized with C_{12} alkyl-chains and wulff-type phenylboronate.

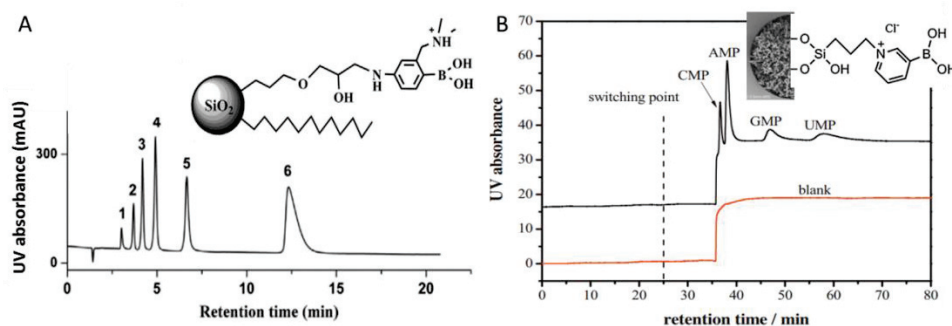


Figure 8. Separation of 6 inorganic anions on mixed-mode BAC (Separation of test mixture of iodate (1), bromate (2), bromide (3), nitrate (4), iodide (5) and thiocyanate (6) at pH 3.0,(B) Separation of a mixture of nucleotides (CMP, AMP, GMP, UMP) on the 3-pyridinylboronic acid-functionalized hybrid monolithic capillary by pH gradient (Mobile phase: 20 mM sodium phosphate buffer containing 300 mM NaCl (pH 5.5), switched to 5% formic acid at 25 min) adapted from [45].

Wulff-type phenylboronate are known to have enhanced affinity in neutral and weak acidic conditions compared to standard phenylboronate. The nitrogen atom adjacent to the boron atom can form intramolecular B-N coordination. Under acidic conditions, the protonated amines of the Wulff-PBA moiety have been used as anion exchangers. The selectivity of such column was comparable to imidazolium-based functionalized column, i.e. $k_{\text{iodate}} < k_{\text{bromate}} < k_{\text{bromide}} < k_{\text{nitrate}} < k$

$k_{\text{iodide}} < k_{\text{thiocyanate}}$. Similarly, pyridinylboronic acid-functionalized monolith was reported to provide electrostatic attraction towards negatively charged cis-diol containing compounds. In addition to lowering the pH of capture of cis-diol compounds, the pyridinyl-based was reported to (i) greatly facilitate the capture of negatively charged nucleotides and (ii) support secondary separation mechanism alongside to acidic elution [45].

6. Hydrogen Bonding interactions

It was reported that some peculiar retention examples would be related to hydrogen bonding. Retention of thiourea, a polar compound with two amino groups for hydrogen bonding, was reported on monolithic poly(VPBA-co-EDMA) capillary column at pH 8.5 [31]. This retention was impaired by addition of urea used as hydrogen-bonding competitor. Liu et al [35], developing new boronic acid functionalized monolithic capillary columns using a sulfonyl derivative of PBA (i.e. 4-(3-butenylsulfonyl) phenylboronic acid), have observed some unexpected peak separation. Figure 7 illustrates the elution pattern of 4 nucleosides on PBA monolithic capillary column. Authors have attributed the secondary separation capability during elution in acidic conditions to hydrogen bonding mechanism. Indeed, increasing urea content in the elution phase (acetic acid, pH 2.7) leads to reduction of the nucleosides retention. In addition to the hydrogen bonding mechanism related to the boronic acid moiety, the sulfonyl group, a strong hydrogen acceptor is supposed to enhance such secondary and rarely reported mechanism.

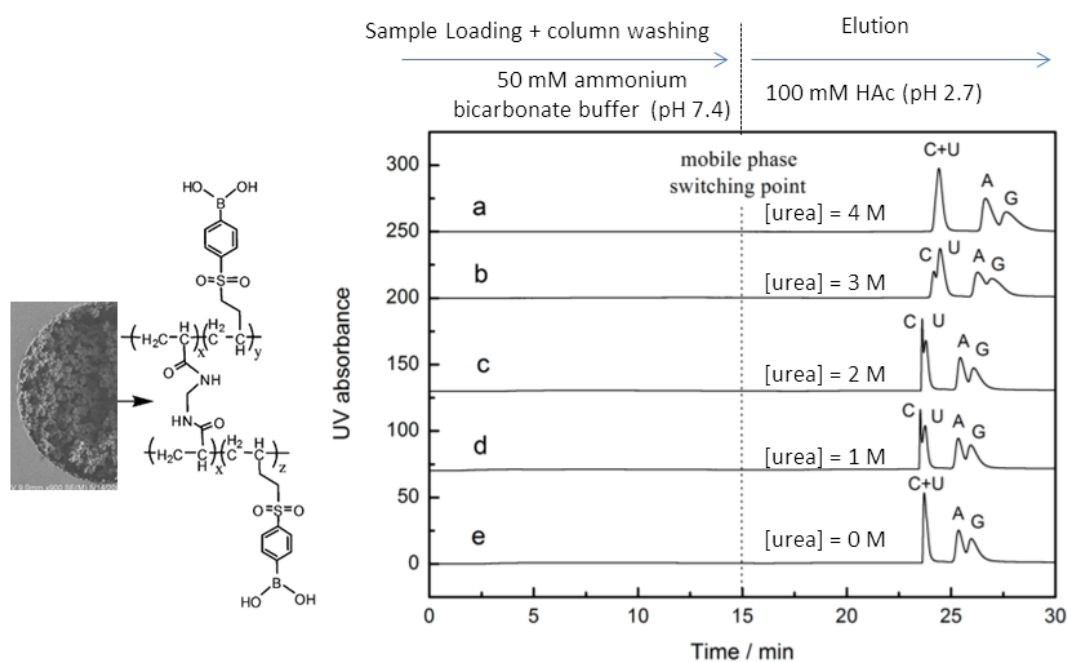


Figure 9. Preconcentration and elution of nucleosides on poly (BSPBA-co-MBAA) monolithic column (150 μm I.D). Sample: cytidine (C), uridine (U), adenosine (A), guanosine (G) (0.05 mg/mL each) dissolved in 50 mM ammonium bicarbonate (pH 7.4). Elution with 100 mM HAc (pH 2.7) containing different concentration urea at 15 min; urea concentration, a) 0, b) 1, c) 2, d) 3, and e) 4 M (adapted from [35]).

7. Boronate affinity with saccharides, glycans and glyconjugates

In order to clarify some confusing terms and reported result discrepancies, this section focuses on glycans and glycoconjugates. The complexity of the “glyco-world” justifies, to our point of view, to give some definitions of the jargon associated. To begin this outline view, we will detail key features of the monosaccharide-PBA derivatives. In solution, monosaccharides can chemically react with the amine residues of proteins to form glycated proteins. This reaction modifies the behavior of the sugar towards boronate affinity. Besides, these free monosaccharides and monosaccharide derivatives (glycated proteins), polysaccharides and polysaccharide derivatives are another important class of molecules. In these, sugar units form, as Lego, oligosaccharides through glycosidic bonding. Changes in conformation and configuration related to the glycosidic bonding are also sources of differences with respect to the affinity of free sugars with boronates. Hence, enzymatic post-modification of proteins or lipids leads to an important class of biomolecules; glycoconjugates. The systematic investigation of the boronate interactions with respect to the form of the corresponding sugar moiety (carbohydrate, oligosaccharides; glycated or glycosylated molecules) would be helpful to get a comprehensive overview of BAC towards this class of molecules.

7.1. Monosaccharides and derivatives (nucleosides, nucleotides etc..)

Investigation of the specific interactions between boric and boronic acid and saccharides in aqueous media [4,38] revealed that the stability of the boronate esters formed depends on structural and steric factors. As depicted Figure 10, C5 and C6 aldoses and ketoses (e.g. glucose and fructose) in aqueous media consist of a mixture of anomeric cyclic compounds.

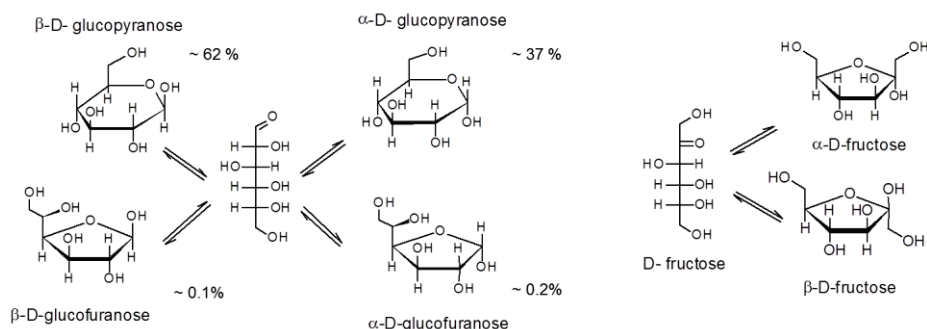


Figure 10. Representation of the different configuration of D-glucose and D fructose (and their relative naturally occurring concentration [50]).

Taking into account the natural distribution of such anomeric forms, local association constants were determined from the association constants. It was observed that such local association constants appear to be characteristic of the saccharide configuration (Figure 11).

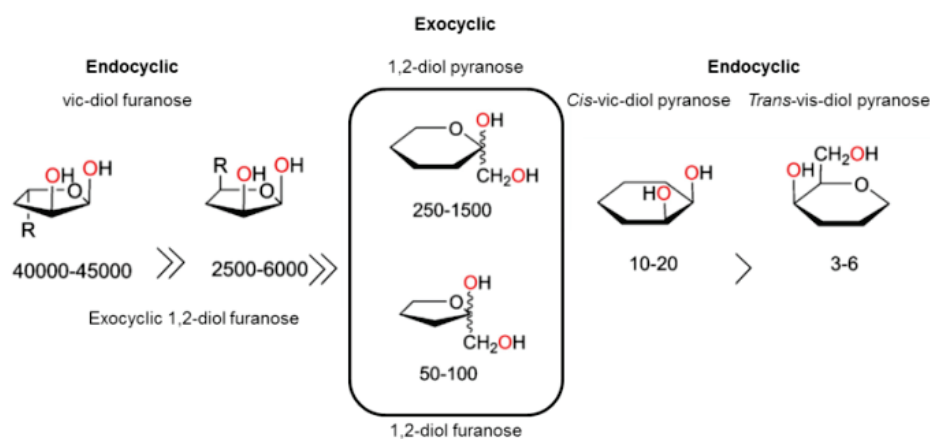


Figure 11. Local stability constants (M^{-1}) sequence of borate esters of sugars (adapted from [49])

The more prone form to bind boronate is the endocyclic vic-diol-furanose form, with a local stability constant of 40 000-45 000 M^{-1} . This form is well *pre-organized* to interact with bor(on)ic acid. The presence of a steric hindering group on the same side of the ring, strongly impacts the local constant. The pyranose forms or exocyclic-1,2-diol furanose arrangement exhibit higher local stability

constants than endocyclic cis-diol pyranose forms that have very low local stability constants. It was thus stated that two hydroxyl groups on adjacent carbon atoms should be in an approximately coplanar configuration to form a stable complex with boronate [24,26,51]. For example, *two equatorial vicinal cis-diol* of pyranose systems are not susceptible to interact with boronate, due to the large steric constraint of the resulting cyclic ester formed [49]. Thus, the stability sequence follows the degree of preorganization of the starting diols. It is worth noticing that catechol with a small dihedral angle between the two adjacent hydroxyl is well-adapted to form coplanar cyclic diester with phenyl boronate as illustrated by its relatively high association constant (see table below) compared to fructose and glucose. Similar requirements have also been emphasized for disaccharides, i.e. boronic acids bind to reducing sugars in their furanose form [52,53]. Efforts leading to find boronic acid derivatives that would be capable to bind non-reducing sugars (i.e. glycopyranosides) have highlighted the ability of benzoboroxole to bind hexopyranosides [51].

Because monosaccharides usually exist as mixtures of structural configurations and anomers, the “overall” association constant can be deduced from a combination of the local association constants and anomeric composition. Consequently, fructose (which stands for about 23 % of the well-pre-organized vic-diol β -D-furanose form) has a larger association constant than glucose (Table 1).

Table 1. Affinity constant of diol-containing compounds at two pH.

Ka (M⁻¹) with PBA at various pH, in 0.10 M phosphate buffer. Adapted from [27]				
<i>pH</i>	<i>Fructose</i>	<i>Catechol</i>	<i>Glucose</i>	<i>Sorbitol</i>
7.4	160	500	2	160
8.5	560	3300	11	1000

Although affinity constant measurements are sensitive to the method and conditions employed, these values are useful for comparative purposes. It is important to note that affinity of boronate towards cis-diols primarily depends on the pH of the aqueous media as described previously.

Ribonucleosides and nucleotides are good cis-diol candidates for BAC due to the presence of the well-pre-organized cis-diol site of the ribofuranose moiety in such biomolecules. These site-specific interactions were widely used to develop analytical processes for the selective enrichment and analysis of nucleosides and nucleotides in biological fluid.

7.2. Glycated proteins

Post-translational modifications of proteins account for the chemical and biochemical diversity of proteins. Besides enzymatic modifications such as sulfonation, alkylation as well as glycosylation, proteins may undergo chemical “glycation” [54,55]. This latter reaction is ascribed to the reaction between the aldehyde group of reducing sugars and the primary amino groups of proteins (i.e. lysine residues), to afford the corresponding Schiff base. Spontaneously, the resulting glycation products exhibit furanose anomers through an Amadori rearrangement. Such β -furanose forms are the well-pre-organized form for interacting with phenyl boronates. It should be noticed that the cyclic diester is stabilized by electrostatic interactions (Figure 9).

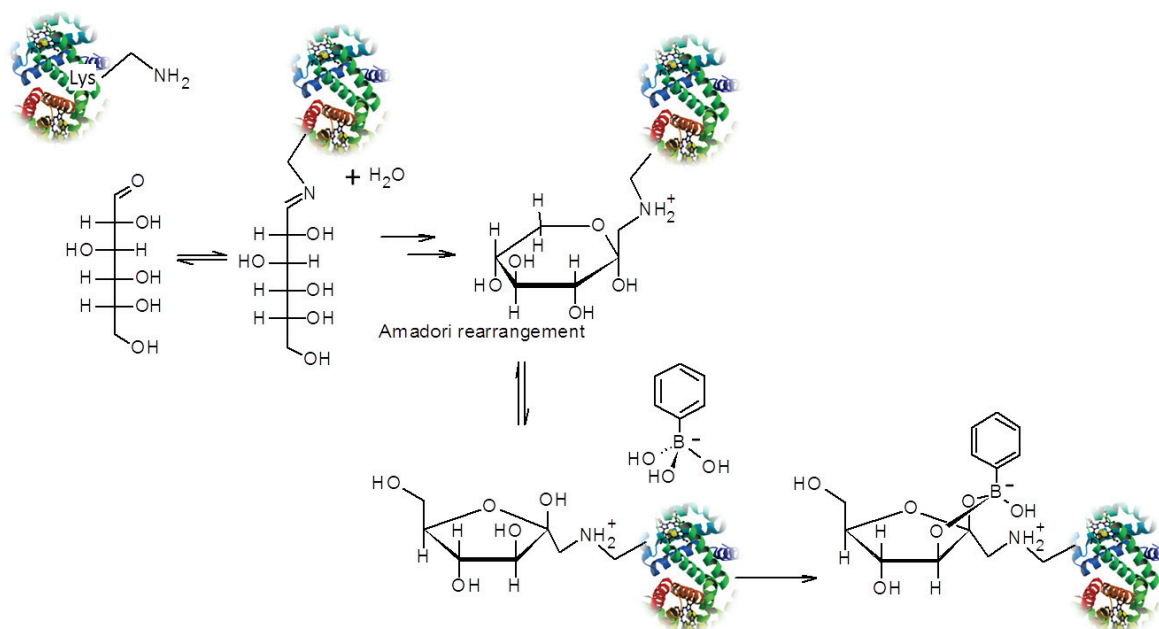


Figure 9. Schematic representation of the interaction of phenylboronate to glycated proteins.

Glycated proteins and peptides have been selectively captured using BAC to investigate the glycation patterns of Hemoglobin [56,57], enzymes [58] and antibodies (rhuMab) [54]. Proteomic studies investigating glycated proteins [59] and glycated peptides [60,61] from plasma and erythrocyte membranes are also based on the selective boronate affinity enrichment.

7.3. Glycoconjugates (glycopeptides, glycoproteins)

Boronates and their derivatives have considerably lower affinity towards non-reducing sugars, non-reducing oligosaccharides and glycosides. Maturation of proteins in cells leads to different post-

translational modifications like glycosylation. Such enzymatic modifications lead to the incorporation of oligosaccharides to the Asn-Xxx-Ser/Thr consensus sequence (where Xxx can be any amino acid except for proline). Attachment to the β -amide of the asparagine leads to N-glycosylation whereas in O-glycosylation, oligosaccharides are attached to the hydroxyl group of Serine (Ser) or Threonine (Thr) side chains. An example of the oligosaccharide structure of N-linked glycosylation is given Figure 13. In oligosaccharides, monomers are in the pyranose form and consequently have only available less pre-organized pyranose diol functions for binding to boronate.

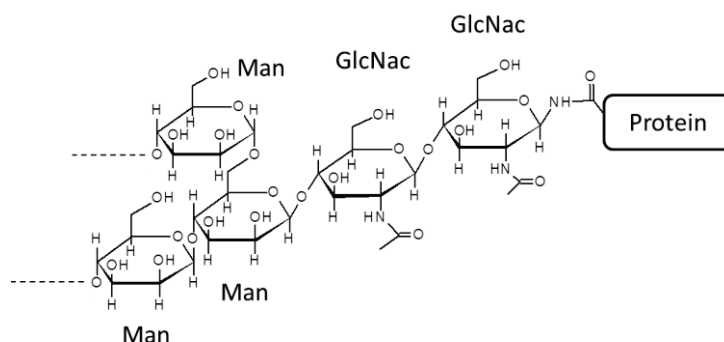


Figure 13. Example of oligosaccharide composition of N-Linked glycoprotein.

The difficulty to form stable complexes between N- or O-glycans with PBA ligand was also confirmed by quantum mechanics investigations [26]. Indeed, high energy barriers as high as 7000 – 12 700 kcal/mol would need to be overcome to form co-planar esters with vicinal cis-diol on pyranose rings.

There is no consensus on the ability of BAC to selectively capture glycoproteins [26,39,62]. Although commercially available kits for the determination of glycated proteins (glycated albumin [63,64], Hemoglobin, erythropoietin) based on BAC had been available since the 80's, the “selective” interaction towards glycosylated proteins has been subjected to caution [35,39,62].

For example, Zhang et al [60] have evaluated the binding specificity of phenyl boronate columns using a non-glycated enzyme (RNase), two glycated enzymes (Glycated-RNase with 3 and 14 glycated motif) and two standard enzymatically glycosylated proteins (α -1-antichymotrypsin and α -2-hs-glycoprotein, which contain 6 N-linked glycans and 2 N-linked and 3 O-linked glycans, respectively). Only a small fraction (1.5% and 1.2%, respectively) of the glycoproteins was retained on the boronate column while, glycated RNase prepared by incubation with D-glucose under anaerobic conditions for 3 and 14 days presented a major peak of retention (Figure 14).

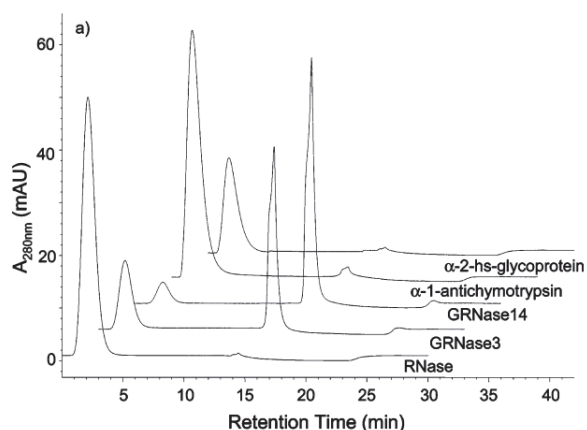


Figure 14. Chromatogram of different standard proteins passing through the phenyl boronate affinity column. Peaks at approximately 2 min are nonglycated proteins, and glycosylated proteins elute near 15 min (adapted from [60]).

Zhang et al [26] have studied the interactions of recombinant proteins with BAC. The main objective of this study was to develop a simple and generic method to monitor the glycation level of recombinant Antibodies (rAbs). They found that, after elimination of non-specific interactions using Tris and NaCl in the mobile phase, glycosylated antibodies were not retained on BAC. However, glycosylated species were retained and specifically eluted by addition of 500 mM sorbitol as competing agent in the mobile phase.

At the opposite, various glycopeptides [8,21] and glycoproteins [8,21,34,35,46,65] were reported to be selectively captured and analyzed using BAC. Recent advances in boronate affinity materials focused on specific glycoprotein affinity and binding capacity improvements [6,7]. Indeed, it has been reported that boronate affinity materials suffer from binding strength limitations. This issue pushed researches towards the development of improved glycoconjugate-boronate affinity as reviewed by Li et al. [7]. An original strategy, called “teamed boronate affinity (TBA)”, involves intermolecular boron–nitrogen coordination between a regular boronic acid and an auxiliary amine compound and opens the way to enhance boronate affinity in neutral and weak acidic conditions [66,67]. Nevertheless, boronic acids with special structures expand the binding pH to weakly acidic range with higher affinity than PBA. For example, use of ligands with superior cis-diol affinity (benzoboroxole [34,37] and difluorophenylboronic acid derivatives [25,65]) have been reported to overcome the relative low binding capacities related to PBA affinity monoliths. For instance, benzoboroxole-functionalized monolithic column find successful applications in proteomic analysis and aptamer selection [68,69]. Similarly, improvement of the binding capacity was reported through the amplification of the number of boronic acid ligands [29,36,70,71] based on the seminal work of Zhen Liu’s group who introduced for the first time the concept of boronate avidity material in 2013

[16]. These strategies, i.e. use of improved affinity boronate derivatives and amplification of the number of boronic acid groups on the materials, were finally combined to propose high boronate *avidity* monolithic columns [72]. This combination takes advantage of the ultra-high affinity of difluorophenyl boronate [25] group towards saccharides with the large increase of surface sites using branched-polyethyleneimine as reactive sites. This configuration results in interactions with glycoproteins through synergistic multivalent binding sites, allowing to increase the apparent affinity, named avidity by authors.

Regarding such discrepancies, a thorough investigation aiming to highlight the various mechanisms of interaction between the BAC and a protein library containing both glycosylated and non-glycosylated proteins with pI ranging from 2.5 to 9.5 was reported [39]. Figure 15 shows the adsorption profile of basic and acid proteins on PBA columns. Under low ionic strength conditions, the behavior of glycosylated and non-glycosylated model proteins towards adsorption seems comparable.

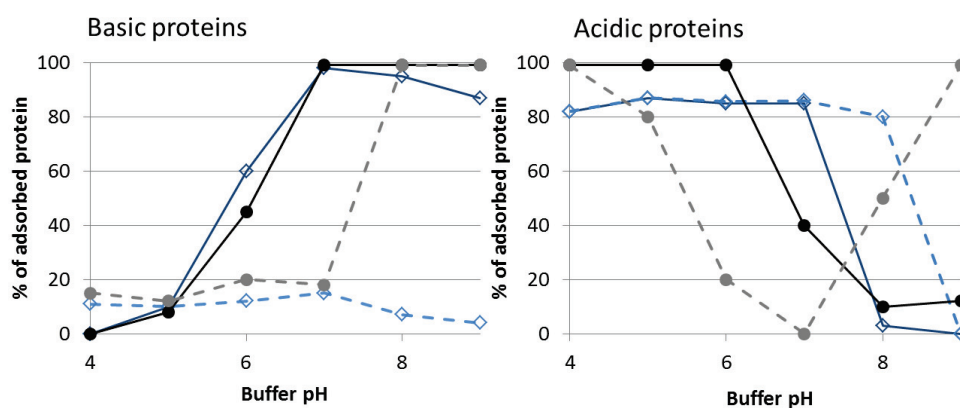


Figure 15. Percentage of adsorption of glycosylated (dark) and non glycosylated (blue) proteins on ProSep®-PB (straight lines for low ionic strength), with 200 mM NaCl in adsorption buffer (dash lines). (adapted from [39])

Considering the pH requirement for the selective “affinity” interaction with PBA moieties (pH>8), glycosylated proteins show interactions only when the electrostatic repulsion between the boronate anion and the protein surface is mitigated by adding 200 mM NaCl to the buffer. The silica based ProSep®-PB support (due to residual silanol groups) adsorbs basic compounds exhibiting opposite charges. As can be observed in the figure 10, adsorption of basic proteins increases with pH, independently of the presence of glycans. It should be noticed that, in addition to the surface silanols, the boronate hydroxyanion is also able to act as weak cation-exchange ligand at high pH. The addition of 200 mM of NaCl shields the electrostatic interactions and highlights the part of specific cis-diol interactions with glycosylated proteins.

Regarding acidic proteins behavior (Figure 15 right), it was observed that their adsorption occurs predominantly outside the pH range of cis-diol interactions. Using of a high salt content did not limit such adsorption, revealing that protein adsorption was not triggered via electrostatic non-specific interactions. This behavior was attributed to the formation of charge transfer interactions of Lewis base sites exposed by proteins (i.e. carboxylate and unprotonated amines groups) [39] and boronic acid groups on the solid support. These interactions were more resistant than electrostatic ones to an increase in ionic strength.

An illustration of the complexity of glycoproteins manipulation using BAC is given Figure 16. It was observed that the specificity and affinity of the developed boronate affinity column towards an acidic protein i.e. AGP (pI = 2.7) depends on ionic strength. Indeed, only a portion of AGP was captured by the monolith using low to moderate NaCl content. This effect was attributed to electrostatic repulsion. Indeed, during the sample loading (pH 7.4), AGP is negatively charged and this charge largely impairs the specific cis-diol interaction.

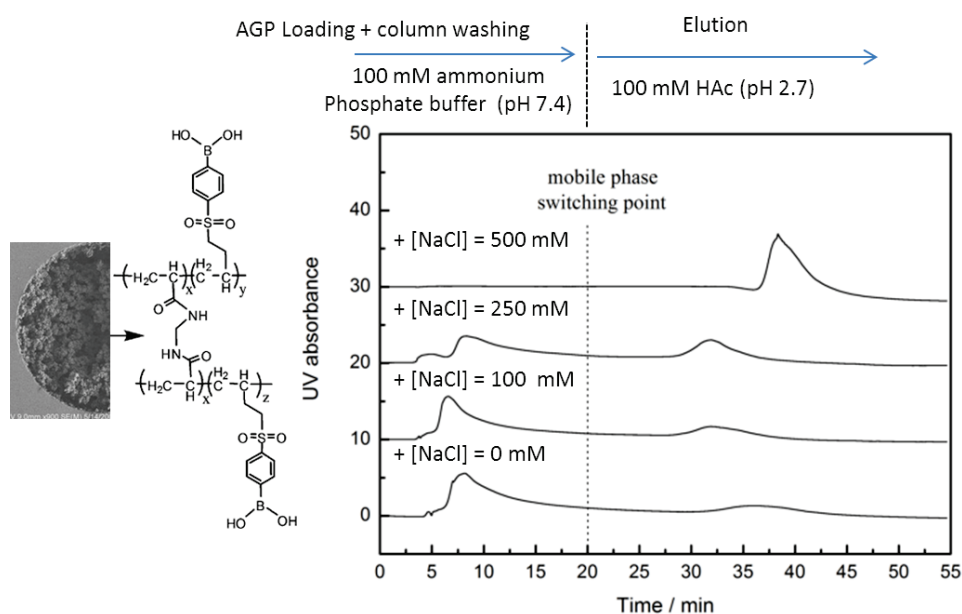


Figure 16. Effect of the buffer ionic strength on the retention of AGP on poly (BSPBA-co-MBAA) monolithic column (150 μ m I.D) (adapted from [35])

Elsewhere, a synergic effect between specific cis-diol and electrostatic interactions was reported [46]. After loading a monoclonal antibody sample on PBA column, washing conditions were investigated in order to optimize the purity and IgG recovery from a clarified cell supernatant from Chinese Hamster Ovary (CHA) cell cultures. Starting conditions used the Tris-shielding method to limit non-specific boronate-protein interactions [73,74]. Then, the authors separately studied the impact of addition of sorbitol and NaCl to the starting solution on purity and recovery yields. Sorbitol

was used as cis-diol competitor. At relatively low concentration sorbitol was used to suppress some secondary interactions due to the boronate hydroxyanions. Addition of 100 mM of sorbitol to the washing buffer (Tris-HCl) improved purity without affecting the recovery yield (approx. 98-99%), while increasing the concentration of sorbitol led to some loss of glycoproteins during the washing step. It should be kept in mind that elution was triggered by switching to a high concentration of sorbitol (500mM) [26] . Addition of 150 mM of NaCl to the washing buffer led to comparable improvement in term of purity and recovery yields than addition of 100 mM sorbitol. However, the simultaneous addition of sorbitol (100 mM) and NaCl (150 mM) led to complete loss of IgG during the washing step, thus revealing a synergic effect between cis-diol and electrostatic interactions towards the IgG-PBA bonding at pH 7.5.

7.4. Sialylated glycoproteins

Sialic acids are unique structural feature monosaccharides. These nine-carbon monosaccharides mainly found on cell surfaces are terminal units of glycoproteins and glycolipids. 5-N-Acetylneuraminic acid (Neu5Ac, see figure below) is the most predominant member of this family in humans. With pKas ranging from 2.5 to 2.6 depending on their conformation, the carboxylate groups are dissociated under physiological conditions. Neu5Ac is almost exclusively α -linked through $\alpha(2-3)$ or $\alpha(2-6)$ linkages [24]. While in its free-state the α -hydroxycarboxylate group is well-pre-organized for boronate ester formation, the 2-OH group is no more available in glycans, rendering the glycerol side chain the critical site for binding boronic acid. It has been suggested that the complex is stabilized through the coordination of the amide NH or CO located at the C-5 position of Neu5Ac, forming an intermolecular B–N or B–O linkage [75].

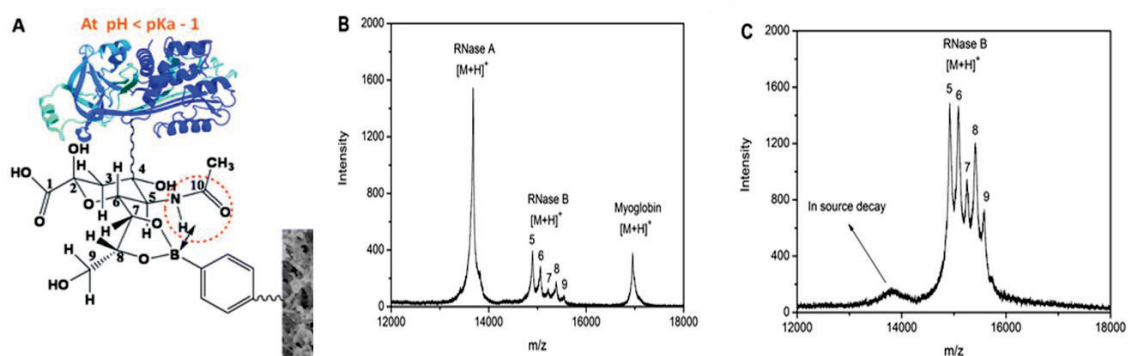


Figure 17. Representation of the binding of boronic acid with sialylated glycoproteins (A) and MALDI-TOF MS spectra for direct (B) and extracted (C) analyses of 1:1:1: RNase A (non glycosylated), RNase B (glycosylated) and myoglobin (non glycosylated) mixture. 5,6,7,8, and 9 in the spectra represent for Man5, Man6, Man7, Man8 and Man9 glycoforms, respectively (adapted from [76]).

Sialylated glycoproteins were reported to exhibit anomalously high binding constants with many of boronic acids when the pH is lower than the pK_a value of the boronic acid. This pH adjustment strategy was used for the selective extraction of sialylated glycoproteins [76]. Using a pH lower than the phenylboronic acid pK_a ($pH < pK_a - 1$) drastically reduces the interactions with non-sialylated glycoproteins, while ensuring optimal binding conditions to sialylated ones. At the opposite, the use of a higher pH excludes sialic acid containing glycoproteins due to electrostatic repulsions and preferentially binds neutral ones (Figure 17).

The ionic strength of the sample solution has been taken into account to tune the specificity and affinity for sialic acids. Electrostatic repulsion between boronic acid and sialic acid (negatively charged) needs to be suppressed, adjusting the ionic strength of the loading buffer. In addition, an increase in the ionic strength is also useful to suppress non-specific adsorption, between negatively charged boronic acids and positively charged substances.

8. Conclusion

Numerous PBA- materials prepared in different formats and containing different chemistries were developed for analyte enrichment, therapeutic protein cleanup and separation. Boronate affinity is an important tool in the arsenal of techniques available to analytical scientists. PBA moieties are associated to multiple mode of interactions. This can have severe impacts on the affinity and selectivity. Particularly, it has been proved that proteins, that are intrinsically complex molecules, behave differently depending on experimental conditions. It emerges from this review that separation of proteins on BAC is based on multimodal interactions. The specific cis-diol “affinity” interaction that aims to selectively separate glycoconjugates is strongly influenced by non-specific electrostatic and charge transfer interactions. These secondary interactions can alter the selectivity. Modulation of these forces by pH, modifiers and ionic strength can be used to enhance the achievable resolution of this multimodal protein ligand. Specific cis-diol interactions have been observed for the set of glycosylated proteins under high pH and high ionic strength conditions. Additional selectivity or affinity can be obtained by designing molecular scaffold of multi-sites ligands based on PBA and its derivatives [77,78]. In anyway, a deep understanding of the underlying mechanisms is mandatory for separation and purification purposes. Although this review focuses exclusively on the interactions with the PBA moiety, users have to be aware of the existence of additional secondary interactions depending on the underlying BAC material used.

9. References

- [1] X.-C. Liu, Boronic Acids as Ligands for Affinity Chromatography, *Chin. J. Chromatogr.* 24 (2006) 73–80. doi:10.1016/S1872-2059(06)60004-7.
- [2] P. Muhammad, D. Li, Z. Liu, Boronate Affinity Chromatography, in: *Encycl. Anal. Chem.*, John Wiley & Sons, Ltd, 2006. doi:10.1002/9780470027318.a9414.
- [3] D. Siegel, Applications of reversible covalent chemistry in analytical sample preparation, *Analyst.* 137 (2012) 5457–5482. doi:10.1039/C2AN35697J.
- [4] H.L. Weith, J.L. Wiebers, P.T. Gilham, Synthesis of cellulose derivatives containing the dihydroxyboryl group and a study of their capacity to form specific complexes with sugars and nucleic acid components, *Biochemistry (Mosc.)*. 9 (1970) 4396–4401. doi:10.1021/bi00824a021.
- [5] D. Li, Z. Liu, CHAPTER 11 Boronate Affinity Materials for the Selective Capture of cis-Diol-Containing Biomolecules, in: *Boron Sens. Synth. Supramol. Self-Assem.*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2016: pp. 302–360. doi:10.1039/9781782622123-00302.
- [6] H. Li, Z. Liu, Recent advances in monolithic column-based boronate-affinity chromatography, *TrAC Trends Anal. Chem.* 37 (2012) 148–161. doi:10.1016/j.trac.2012.03.010.
- [7] D. Li, Y. Chen, Z. Liu, Boronate affinity materials for separation and molecular recognition: structure, properties and applications, *Chem. Soc. Rev.* 44 (2015) 8097–8123. doi:10.1039/C5CS00013K.
- [8] M. Chen, Y. Lu, Q. Ma, L. Guo, Y.-Q. Feng, Boronate affinity monolith for highly selective enrichment of glycopeptides and glycoproteins, *Analyst.* 134 (2009) 2158–2164. doi:10.1039/B909581K.
- [9] J. He, Z. Liu, P. Dou, J. Liu, L. Ren, H.-Y. Chen, Electrochemically deposited boronate affinity extracting phase for covalent solid phase microextraction of cis-diol biomolecules, *Talanta.* 79 (2009) 746–751. doi:10.1016/j.talanta.2009.04.061.
- [10] J. He, Z. Liu, L. Ren, Y. Liu, P. Dou, K. Qian, H.-Y. Chen, On-line coupling of in-tube boronate affinity solid phase microextraction with high performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry for the determination of cis-diol biomolecules, *Talanta.* 82 (2010) 270–276. doi:10.1016/j.talanta.2010.04.033.
- [11] X. An, X. He, L. Chen, Y. Zhang, Graphene oxide-based boronate polymer brushes via surface initiated atom transfer radical polymerization for the selective enrichment of glycoproteins, *J. Mater. Chem. B.* 4 (2016) 6125–6133. doi:10.1039/C6TB01489E.
- [12] P. Dou, L. Liang, J. He, Z. Liu, H.-Y. Chen, Boronate functionalized magnetic nanoparticles and off-line hyphenation with capillary electrophoresis for specific extraction and analysis of biomolecules containing cis-diols, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 7558–7563. doi:10.1016/j.chroma.2009.04.040.
- [13] J. Du, M. He, X. Wang, H. Fan, Y. Wei, Facile preparation of boronic acid-functionalized magnetic nanoparticles with a high capacity and their use in the enrichment of cis-diol-containing compounds from plasma, *Biomed. Chromatogr.* 29 (2015) 312–320. doi:10.1002/bmc.3277.

- [14] L. Liang, Z. Liu, A self-assembled molecular team of boronic acids at the gold surface for specific capture of cis-diol biomolecules at neutral pH, *Chem. Commun.* 47 (2011) 2255–2257. doi:10.1039/C0CC02540B.
- [15] B. Wang, L. Chen, Y. Sun, Y. Zhu, Z. Sun, T. An, Y. Li, Y. Lin, D. Fan, Q. Wang, Development of phenylboronic acid-functionalized nanoparticles for emodin delivery, *J. Mater. Chem. B.* 3 (2015) 3840–3847. doi:10.1039/C5TB00065C.
- [16] H. Wang, Z. Bie, C. Lu, Z. Liu, Magnetic nanoparticles with dendrimer-assisted boronate avidity for the selective enrichment of trace glycoproteins, *Chem. Sci.* 4 (2013) 4298–4303. doi:10.1039/C3SC51623G.
- [17] J. Wang, X. He, L. Chen, Y. Zhang, Boronic acid functionalized magnetic nanoparticles synthesized by atom transfer radical polymerization and their application for selective enrichment of glycoproteins, *RSC Adv.* 6 (2016) 47055–47061. doi:10.1039/C6RA05848E.
- [18] X. Zhang, J. Wang, X. He, L. Chen, Y. Zhang, Tailor-Made Boronic Acid Functionalized Magnetic Nanoparticles with a Tunable Polymer Shell-Assisted for the Selective Enrichment of Glycoproteins/Glycopeptides, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 7 (2015) 24576–24584. doi:10.1021/acsami.5b06445.
- [19] P. Dou, Z. Liu, At-line coupling of magnetic-nanoparticle-based extraction with gel isoelectric focusing for protein analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 3423–3429. doi:10.1007/s00216-010-4447-4.
- [20] X. Pan, Y. Chen, P. Zhao, D. Li, Z. Liu, Highly Efficient Solid-Phase Labeling of Saccharides within Boronic Acid Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles, *Angew. Chem. Int. Ed.* 54 (2015) 6173–6176. doi:10.1002/anie.201500331.
- [21] Y. Xu, Z. Wu, L. Zhang, H. Lu, P. Yang, P.A. Webley, D. Zhao, Highly Specific Enrichment of Glycopeptides Using Boronic Acid-Functionalized Mesoporous Silica, *Anal. Chem.* 81 (2009) 503–508. doi:10.1021/ac801912t.
- [22] M. Dowlut, D.G. Hall, An Improved Class of Sugar-Binding Boronic Acids, Soluble and Capable of Complexing Glycosides in Neutral Water, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 4226–4227. doi:10.1021/ja057798c.
- [23] R. Nishiyabu, Y. Kubo, T.D. James, J.S. Fossey, Boronic acid building blocks: tools for sensing and separation, *Chem. Commun.* 47 (2011) 1106–1123. doi:10.1039/C0CC02920C.
- [24] J.A. Peters, Interactions between boric acid derivatives and saccharides in aqueous media: Structures and stabilities of resulting esters, *Coord. Chem. Rev.* 268 (2014) 1–22. doi:10.1016/j.ccr.2014.01.016.
- [25] C. Lü, H. Li, H. Wang, Z. Liu, Probing the Interactions between Boronic Acids and cis-Diol-Containing Biomolecules by Affinity Capillary Electrophoresis, *Anal. Chem.* 85 (2013) 2361–2369. doi:10.1021/ac3033917.
- [26] B. Zhang, S. Mathewson, H. Chen, Two-dimensional liquid chromatographic methods to examine phenylboronate interactions with recombinant antibodies, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 5676–5686. doi:10.1016/j.chroma.2009.05.084.
- [27] G. Springsteen, B. Wang, A detailed examination of boronic acid–diol complexation, *Tetrahedron.* 58 (2002) 5291–5300. doi:10.1016/S0040-4020(02)00489-1.
- [28] S. Janků, M. Komendová, J. Urban, Development of an online solid-phase extraction with liquid chromatography method based on polymer monoliths for the determination of dopamine, *J. Sep. Sci.* 39 (2016) 4107–4115. doi:10.1002/jssc.201600818.

- [29] W. Wang, M. He, C. Wang, Y. Wei, Enhanced binding capacity of boronate affinity adsorbent via surface modification of silica by combination of atom transfer radical polymerization and chain-end functionalization for high-efficiency enrichment of cis-diol molecules, *Anal. Chim. Acta.* 886 (2015) 66–74. doi:10.1016/j.aca.2015.06.015.
- [30] M.B. Espina-Benitez, J. Randon, C. Demesmay, V. Dugas, Development and application of a new in-line coupling of a miniaturized boronate affinity monolithic column with capillary zone electrophoresis for the selective enrichment and analysis of cis-diol-containing compounds, *J. Chromatogr. A.* 1494 (2017) 65–76. doi:10.1016/j.chroma.2017.03.014.
- [31] L. Ren, Z. Liu, M. Dong, M. Ye, H. Zou, Synthesis and characterization of a new boronate affinity monolithic capillary for specific capture of cis-diol-containing compounds, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 4768–4774. doi:10.1016/j.chroma.2009.04.036.
- [32] H. Li, X. Zhang, L. Zhang, X. Wang, F. Kong, D. Fan, L. Li, W. Wang, Preparation of a silica stationary phase co-functionalized with Wulff-type phenylboronate and C12 for mixed-mode liquid chromatography, *Anal. Chim. Acta.* 962 (2017) 104–113. doi:10.1016/j.aca.2017.01.028.
- [33] L. Ren, Y. Liu, M. Dong, Z. Liu, Synthesis of hydrophilic boronate affinity monolithic capillary for specific capture of glycoproteins by capillary liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 8421–8425. doi:10.1016/j.chroma.2009.10.014.
- [34] H. Li, H. Wang, Y. Liu, Z. Liu, A benzoboroxole-functionalized monolithic column for the selective enrichment and separation of cis-diol containing biomolecules, *Chem. Commun.* 48 (2012) 4115–4117. doi:10.1039/C2CC30230F.
- [35] Y. Liu, L. Ren, Z. Liu, A unique boronic acid functionalized monolithic capillary for specific capture, separation and immobilization of cis-diol biomolecules, *Chem. Commun.* 47 (2011) 5067–5069. doi:10.1039/C0CC05675H.
- [36] H. Li, X. Zhang, L. Zhang, X. Wang, F. Kong, D. Fan, L. Li, W. Wang, Preparation of a boronate affinity silica stationary phase with enhanced binding properties towards cis-diol compounds, *J. Chromatogr. A.* 1473 (2016) 90–98. doi:10.1016/j.chroma.2016.10.050.
- [37] A. Adamczyk-Woźniak, M. Jakubczyk, A. Sporzyński, G. Żukowska, Quantitative determination of the Lewis acidity of phenylboronic catechol esters — Promising anion receptors for polymer electrolytes, *Inorg. Chem. Commun.* 14 (2011) 1753–1755. doi:10.1016/j.inoche.2011.08.002.
- [38] D.G. Hall, Structure, Properties, and Preparation of Boronic Acid Derivatives, in: *Boronic Acids*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2011: pp. 1–133. doi:10.1002/9783527639328.ch1.
- [39] R.J. Carvalho, J. Woo, M.R. Aires-Barros, S.M. Cramer, A.M. Azevedo, Phenylboronate chromatography selectively separates glycoproteins through the manipulation of electrostatic, charge transfer, and cis-diol interactions, *Biotechnol. J.* 9 (2014) 1250–1258. doi:10.1002/biot.201400170.
- [40] P.R. Westmark, L.S. Valencia, B.D. Smith, Influence of eluent anions in boronate affinity chromatography, *J. Chromatogr. A.* 664 (1994) 123–128. doi:10.1016/0021-9673(94)80637-3.
- [41] R. Tuytten, F. Lemière, E.L. Esmans, W.A. Herrebout, B.J. van der Veken, B.U.W. Maes, E. Witters, R.P. Newton, E. Dudley, Role of Nitrogen Lewis Basicity in Boronate Affinity Chromatography of Nucleosides, *Anal. Chem.* 79 (2007) 6662–6669. doi:10.1021/ac0709089.
- [42] R. Tuytten, F. Lemière, W. Van Dongen, E. Witters, E.L. Esmans, R.P. Newton, E. Dudley, Development of an On-Line SPE-LC–ESI-MS Method for Urinary Nucleosides: Hyphenation of Aprotic Boronic Acid Chromatography with Hydrophilic Interaction LC–ESI-MS, *Anal. Chem.* 80 (2008) 1263–1271. doi:10.1021/ac702057u.

- [43] L. Zhang, C. Wang, Y. Wei, Boronate affinity adsorption of cis-diol-containing biomolecules in nonaqueous solvent, *Biomed. Chromatogr.* 29 (2015) 1133–1136. doi:10.1002/bmc.3424.
- [44] X.-J. Li, M. Jia, Y.-X. Zhao, Z.-S. Liu, H. Akber Aisa, Preparation of phenylboronate affinity rigid monolith with macromolecular porogen, *J. Chromatogr. A.* 1438 (2016) 171–178. doi:10.1016/j.chroma.2016.02.031.
- [45] D. Li, Q. Li, S. Wang, J. Ye, H. Nie, Z. Liu, Pyridinylboronic acid-functionalized organic–silica hybrid monolithic capillary for the selective enrichment and separation of cis-diol-containing biomolecules at acidic pH, *J. Chromatogr. A.* 1339 (2014) 103–109. doi:10.1016/j.chroma.2014.02.084.
- [46] R. Dos Santos, S.A.S.L. Rosa, M.R. Aires-Barros, A. Tover, A.M. Azevedo, Phenylboronic acid as a multi-modal ligand for the capture of monoclonal antibodies: Development and optimization of a washing step, *J. Chromatogr. A.* 1355 (2014) 115–124. doi:10.1016/j.chroma.2014.06.001.
- [47] F.A. Middle, A. Bannister, A.J. Bellingham, Separation of glycosylated haemoglobins using immobilized phenylboronic acid. Effect of ligand concentration, column operating conditions, and comparison with ion-exchange and isoelectric-focusing, *Biochem. J.* 209 (1983) 771. doi:10.1042/bj2090771.
- [48] M.A. Wimmer, G. Lochnit, E. Bassil, K.H. Mühling, H.E. Goldbach, Membrane-Associated, Boron-Interacting Proteins Isolated by Boronate Affinity Chromatography, *Plant Cell Physiol.* 50 (2009) 1292–1304. doi:10.1093/pcp/pcp073.
- [49] R. van den Berg, J.A. Peters, H. van Bekkum, The structure and (local) stability constants of borate esters of mono- and di-saccharides as studied by ¹¹B and ¹³C NMR spectroscopy, *Carbohydr. Res.* 253 (1994) 1–12. doi:10.1016/0008-6215(94)80050-2.
- [50] W.A. Bubbs, NMR spectroscopy in the study of carbohydrates: Characterizing the structural complexity, *Concepts Magn. Reson. Part A.* 19A (2003) 1–19. doi:10.1002/cmr.a.10080.
- [51] M. Bérubé, M. Dowlut, D.G. Hall, Benzoboroxoles as Efficient Glycopyranoside-Binding Agents in Physiological Conditions: Structure and Selectivity of Complex Formation, *J. Org. Chem.* 73 (2008) 6471–6479. doi:10.1021/jo800788s.
- [52] S. Arimori, M.D. Phillips, T.D. James, Probing disaccharide selectivity with modular fluorescent sensors, *Tetrahedron Lett.* 45 (2004) 1539–1542. doi:10.1016/j.tetlet.2003.12.013.
- [53] D. Stones, S. Manku, X. Lu, D.G. Hall, Modular Solid-Phase Synthetic Approach To Optimize Structural and Electronic Properties of Oligoboronic Acid Receptors and Sensors for the Aqueous Recognition of Oligosaccharides, *Chem. – Eur. J.* 10 (2004) 92–100. doi:10.1002/chem.200305400.
- [54] C. Quan, E. Alcalá, I. Petkovska, D. Matthews, E. Canova-Davis, R. Taticek, S. Ma, A study in glycation of a therapeutic recombinant humanized monoclonal antibody: Where it is, how it got there, and how it affects charge-based behavior, *Anal. Biochem.* 373 (2008) 179–191. doi:10.1016/j.ab.2007.09.027.
- [55] S. Fischer, J. Hoernschemeyer, H.-C. Mahler, Glycation during storage and administration of monoclonal antibody formulations, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70 (2008) 42–50. doi:10.1016/j.ejpb.2008.04.021.
- [56] Y. Li, J.-O. Jeppsson, M. Jörntén-Karlsson, E. Linné Larsson, H. Jungvid, I.Y. Galaev, B. Mattiasson, Application of shielding boronate affinity chromatography in the study of the glycation pattern of haemoglobin, *J. Chromatogr. B.* 776 (2002) 149–160. doi:10.1016/S1570-0232(02)00162-9.

- [57] X. Zhang, K.F. Medzihradzsky, J. Cunningham, P.D. Lee, C.L. Rognerud, C.-N. Ou, P. Harmatz, H.E. Witkowska, Characterization of glycated hemoglobin in diabetic patients: usefulness of electrospray mass spectrometry in monitoring the extent and distribution of glycation, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* 759 (2001) 1–15. doi:10.1016/S0378-4347(01)00196-7.
- [58] T. Fujita, K. Suzuki, T. Tada, Y. Yoshihara, R. Hamaoka, K. Uchida, Y. Matuo, T. Sasaki, T. Hanafusa, N. Taniguchi, Human Erythrocyte Bisphosphoglycerate Mutase: Inactivation by Glycation In Vivo and In Vitro¹, *J. Biochem. (Tokyo)*. 124 (1998) 1237–1244. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022243.
- [59] Q. Zhang, N. Tang, A.A. Schepmoes, L.S. Phillips, R.D. Smith, T.O. Metz, Proteomic Profiling of Nonenzymatically Glycated Proteins in Human Plasma and Erythrocyte Membranes, *J. Proteome Res.* 7 (2008) 2025–2032. doi:10.1021/pr700763r.
- [60] Q. Zhang, N. Tang, J.W.C. Brock, H.M. Mottaz, J.M. Ames, J.W. Baynes, R.D. Smith, T.O. Metz, Enrichment and Analysis of Nonenzymatically Glycated Peptides: Boronate Affinity Chromatography Coupled with Electron-Transfer Dissociation Mass Spectrometry, *J. Proteome Res.* 6 (2007) 2323–2330. doi:10.1021/pr070112q.
- [61] Q. Zhang, M.E. Monroe, A.A. Schepmoes, T.R.W. Clauss, M.A. Gritsenko, D. Meng, V.A. Petyuk, R.D. Smith, T.O. Metz, Comprehensive Identification of Glycated Peptides and Their Glycation Motifs in Plasma and Erythrocytes of Control and Diabetic Subjects, *J. Proteome Res.* 10 (2011) 3076–3088. doi:10.1021/pr200040j.
- [62] B.J. Gould, P.M. Hall, m-Aminophenylboronate affinity ligands distinguish between nonenzymically glycosylated proteins and glycoproteins, *Clin. Chim. Acta.* 163 (1987) 225–230. doi:10.1016/0009-8981(87)90026-X.
- [63] A.C. Silver, E. Lamb, W.R. Cattell, A.B.S.J. Dawnay, Investigation and validation of the affinity chromatography method for measuring glycated albumin in serum and urine, *Clin. Chim. Acta.* 202 (1991) 11–22. doi:10.1016/0009-8981(91)90251-7.
- [64] I. Mikšík, Z. Deyl, Post-translational non-enzymatic modification of proteins II. Separation of selected protein species after glycation and other carbonyl-mediated modifications, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* 699 (1997) 311–345. doi:10.1016/S0378-4347(97)00233-8.
- [65] Q. Li, C. Lü, Z. Liu, Preparation and characterization of fluorophenylboronic acid-functionalized monolithic columns for high affinity capture of cis-diol containing compounds, *J. Chromatogr. A.* 1305 (2013) 123–130. doi:10.1016/j.chroma.2013.07.007.
- [66] Y. Liu, Y. Lu, Z. Liu, Restricted access boronate affinity porous monolith as a protein A mimetic for the specific capture of immunoglobulin G, *Chem. Sci.* 3 (2012) 1467–1471. doi:10.1039/C2SC20125A.
- [67] L. Ren, Z. Liu, Y. Liu, P. Dou, H.-Y. Chen, Ring-Opening Polymerization with Synergistic Comonomers: Access to a Boronate-Functionalized Polymeric Monolith for the Specific Capture of cis-Diol-Containing Biomolecules under Neutral Conditions, *Angew. Chem. Int. Ed.* 48 (2009) 6704–6707. doi:10.1002/anie.200902469.
- [68] Z. Bie, Y. Chen, H. Li, R. Wu, Z. Liu, Off-line hyphenation of boronate affinity monolith-based extraction with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for efficient analysis of glycoproteins/glycopeptides, *Anal. Chim. Acta.* 834 (2014) 1–8. doi:10.1016/j.aca.2014.04.035.
- [69] H. Nie, Y. Chen, C. Lü, Z. Liu, Efficient Selection of Glycoprotein-Binding DNA Aptamers via Boronate Affinity Monolithic Capillary, *Anal. Chem.* 85 (2013) 8277–8283. doi:10.1021/ac4015353.

- [70] Y. Xue, W. Shi, B. Zhu, X. Gu, Y. Wang, C. Yan, Polyethyleneimine-grafted boronate affinity materials for selective enrichment of cis-diol-containing compounds, *Talanta*. 140 (2015) 1–9. doi:10.1016/j.talanta.2015.03.008.
- [71] L. Gao, J. Du, C. Wang, Y. Wei, Fabrication of a dendrimer-modified boronate affinity material for online selective enrichment of cis-diol-containing compounds and its application in determination of nucleosides in urine, *RSC Adv.* 5 (2015) 106161–106170. doi:10.1039/C5RA18443F.
- [72] D. Li, Y. Li, X. Li, Z. Bie, X. Pan, Q. Zhang, Z. Liu, A high boronate avidity monolithic capillary for the selective enrichment of trace glycoproteins, *J. Chromatogr. A.* 1384 (2015) 88–96. doi:10.1016/j.chroma.2015.01.050.
- [73] Y. Li, E.L. Larsson, H. Jungvid, I.Y. Galaev, B. Mattiasson, Shielding of protein–boronate interactions during boronate chromatography of neoglycoproteins, *J. Chromatogr. A.* 909 (2001) 137–145. doi:10.1016/S0021-9673(00)01106-7.
- [74] A.M. Azevedo, A.G. Gomes, L. Borlido, I.F.S. Santos, D.M.F. Prazeres, M.R. Aires-Barros, Capture of human monoclonal antibodies from a clarified cell culture supernatant by phenyl boronate chromatography, *J. Mol. Recognit.* 23 (2010) 569–576. doi:10.1002/jmr.1068.
- [75] H. Otsuka, E. Uchimura, H. Koshino, T. Okano, K. Kataoka, Anomalous Binding Profile of Phenylboronic Acid with N-Acetylneuraminic Acid (Neu5Ac) in Aqueous Solution with Varying pH, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 3493–3502. doi:10.1021/ja021303r.
- [76] Y. Lu, Z. Bie, Y. Liu, Z. Liu, Fine-tuning the specificity of boronate affinity monoliths toward glycoproteins through pH manipulation, *Analyst.* 138 (2013) 290–298. doi:10.1039/C2AN36048A.
- [77] C. Chen, G. El Khoury, P. Zhang, P.M. Rudd, C.R. Lowe, A carbohydrate-binding affinity ligand for the specific enrichment of glycoproteins, *J. Chromatogr. A.* 1444 (2016) 8–20. doi:10.1016/j.chroma.2016.03.049.
- [78] S. Wang, J. Ye, Z. Bie, Z. Liu, Affinity-tunable specific recognition of glycoproteins via boronate affinity-based controllable oriented surface imprinting, *Chem. Sci.* 5 (2014) 1135–1140. doi:10.1039/C3SC52986J.

Chapitre II

Elaboration de colonnes d'affinité boronate miniaturisées

Introduction

En 1890, la découverte par Magnanini et al. [1] de la complexation de l'acide borique avec les sucres pour l'étude de leurs configurations et conformations a initié le développement des dérivés d'acide boronique. Mais, ce n'est qu'en 1954 que le premier postulat expliquant la complexation entre les acides boroniques et les composés cis-diols par la formation d'un ester cyclique boronique est publié par Kuivila et al. [2]. Jusqu'en 1959, les travaux se concentrent sur la synthèse et les propriétés des acides boroniques avec des études quantitatives sur leurs interactions avec les groupements cis-diols [3–5].

Cette découverte a donné lieu au développement du premier système de chromatographie d'affinité boronate (BAC) en 1970 [6], pour lequel Weith et al. synthétisent un dérivé de cellulose contenant des groupements phénylboroniques pour la séparation de nucléosides par BAC (Figure 1).

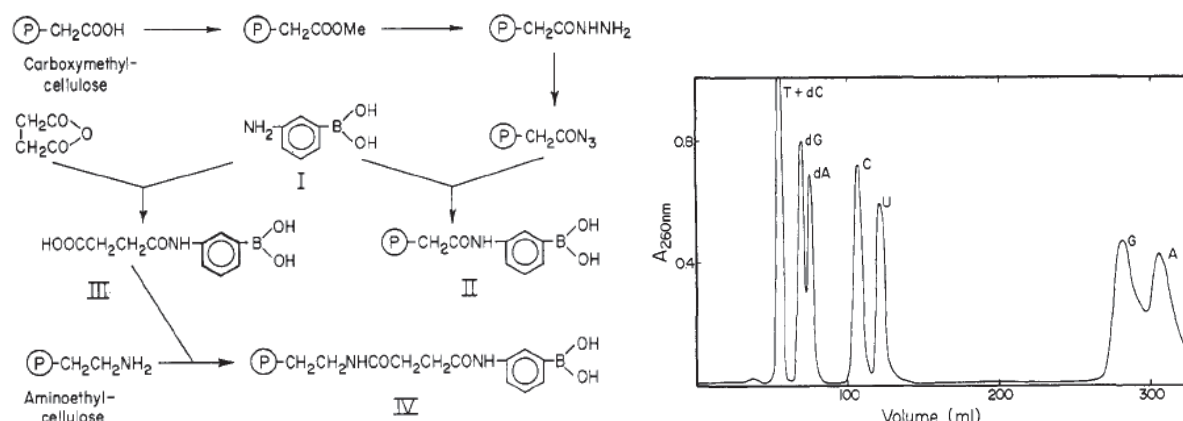


Figure 1. A) Schéma de réaction de synthèse du dérivé de cellulose fonctionnalisé avec des acides phénylboroniques, et B) Profil d'élution obtenu par BAC d'un mélange de thymidine (T), de désoxycytidine (dC), de désoxyguanosine (dG), de cytidine (C), d'uridine (U), de guanosine (G) et d'adénosine (A) sur une colonne de N-(nzdihydroxyborylphenyl) carbamylméthylcellulose. dimensions de la colonne : 55 x 1 cm ; l'élution avec du tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH 7,5 à 20 °C et à un débit d'environ 10 ml h⁻¹ (Adapté de [6]).

Les supports chromatographiques à base de polymères qui seront progressivement développés (e.g cellulose, polyacrylamide ou d'acide polyméthacrylique) ne sont néanmoins utilisables qu'à faible débit de phase mobile, en raison de leur faible résistance mécanique à la pression et présentent un pouvoir résolutif limité compte tenu de la taille importante des particules utilisées. Ainsi, la mise en œuvre de ces supports est-elle limitée à une utilisation conventionnelle de traitement d'échantillon pour le purifier (sample clean-up) avec des pressions compatibles avec ces matériaux [7].

Ce traitement d'échantillon, réalisé hors-ligne en amont d'étape analytique par HPLC (haute pression) permet la purification d'échantillons d'urine ou de plasma contenant des petites molécules comme les catécholamines ou les (ribo)nucléotides ou des plus grosses molécules comme l'hémoglobine glyquée dans les études de diabète. Ce n'est qu'à partir du début des années 80 que des supports rigides, fonctionnalisés par des acides phénylboroniques voient le jour et ouvrent le champ à une utilisation à des fins séparatives dans des systèmes HPLC [7]. Les colonnes de chromatographie d'affinité boronate sont alors préparées à l'aide de particules de silice modifiées ou de support polymériques de haute stabilité mécanique [8].

Par la suite, de multiples supports d'affinité boronate ont été développés dans différents formats et de plus en plus miniaturisés, tels que :

- Les microchips portant des canaux fonctionnalisés boronate pour le couplage à l'électrophorèse capillaire [9–12],
- Les nanoparticules [13–21] et les matériaux monolithiques [22–26] d'affinité boronate pour l'analyse de vitamines, glycoprotéines, médicaments, catécholamines, etc., par chromatographie liquide, électrophorèse capillaire ou spectrométrie de masse.

En 2006, Potter et al. détaillent la synthèse de la première colonne capillaire monolithique d'affinité boronate [27]. Depuis, la synthèse à l'échelle miniaturisée de colonnes monolithiques d'affinité boronate (μ BAMC) de plus en plus performantes en termes de traitement d'échantillon (purification et préconcentration d'analytes dans des matrices complexes) et de séparation ont été les centres d'intérêt des chercheurs [27–34].

Une grande variété de colonnes monolithiques BAC a été développée et de multiples applications ont été proposées pour l'enrichissement sélectif des glycopeptides et des nucléosides. La plupart des approches publiées pour la synthèse de colonnes BAC mettent en œuvre la copolymérisation d'un dérivé commercial de l'acide phénylboronique avec divers agents de réticulation pour obtenir le monolithe fonctionnalisé. Quelques articles de revue résument les développements récents dans le domaine des colonnes monolithiques d'affinité boronate et de leurs applications afin de guider l'utilisateur dans la préparation de nouvelles colonnes BAC et dans la sélection adéquate des conditions d'utilisation pour moduler la sélectivité [32,34].

Table des matières

1.	Les critères de performances des colonnes d'affinité boronate.....	65
1.1.	Le nombre de sites actifs par unité de volume et/ou capacité maximale	65
1.2.	La constante d'affinité K_a (ou la constante de dissociation K_d).....	67
2.	Les méthodes de caractérisation des supports boronate	68
2.1.	Mesure de la capacité dynamique (ou Dynamic binding capacity, DBC)	69
2.2.	Scatchard plot.....	69
2.3.	Chromatographie d'affinité par analyse frontale.....	70
3.	Stratégie d'élaboration des colonnes miniaturisées	72
3.1.	Choix des supports	72
3.2.	Choix des dérivés d'acides phénylboroniques	73
3.3.	Choix des modes de fonctionnalisation	73
3.4.	Résumé de la stratégie de synthèse.....	74
4.	Partie Expérimentale	75
4.1.	Synthèse des monolithes.....	75
4.1.1.	Instrumentation.....	75
4.1.2.	Synthèse des monolithes de silice.....	75
4.1.3.	Synthèse des monolithes organiques (poly(GMA-co-EDMA))	76
4.2.	Fonctionnalisation des monolithes de silice	77
4.2.1.	Photopolymérisation de l'AAPBA sur support silanisé acrylate	77
4.2.2.	Photogreffage de l'AAPBA par chimie-Click « thiol-ène » sur support silanisé thiol	77
4.2.3.	Photogreffage du MPBA par chimie-click « ène-thiol » sur support silanisé vinyl.....	78
4.3.	Fonctionnalisation des monolithes organiques	80
4.3.1.	Greffage direct de l'APBA sur support GMA : réaction époxyde – amine	80
4.3.2.	Greffage de l'APBA sur support GMA modifié aldéhyde : réaction aldéhyde- amine	80
4.3.3.	Protocoles de greffage du DFFPBA sur support GMA : couplage amine-aldéhyde	80

4.4.	Evaluation des performances des monolithes fonctionnalisés.....	81
4.4.1.	Mesure de « Dynamic Binding Capacity » en batch.....	81
4.4.2.	Chromatographie d'affinité par analyse frontale de colonnes monolithiques fonctionnalisées	82
5.	Résultats.....	83
5.1.	Synthèse et évaluation de colonnes monolithiques de silice d'affinité boronate.....	83
5.1.1.	Propriétés des monolithes de silices utilisés.....	83
5.1.2.	Fonctionnalisation par photopolymérisation.....	84
5.1.3.	Photogreffage par chimie-click « thiol-ène » et « ène-thiol ».....	90
5.1.4.	Conclusion sur les procédés de fonctionnalisation des monolithes de silice	97
5.2.	Synthèse et évaluation de colonnes monolithiques organiques poly(GMA-co-EDMA) d'affinité boronate.....	97
5.2.1.	Présentation des propriétés des monolithes poly(GMA-co-EDMA)	98
5.2.2.	Fonctionnalisation des monolithe poly(GMA-co-EDMA) par réaction époxy-amine.....	99
5.2.3.	Fonctionnalisation des monolithes poly(GMA-co-EDMA) par réaction aldéhyde-amine (formation d'une base de Schiff).....	101
5.2.4.	Greffage haute densité avec un dérivé d'acide phényboronique d'affinité supérieure (DFFPBA) 103	
6.	Conclusion sur les procédés de fonctionnalisation de monolithes.....	109
7.	Références bibliographiques.....	112

1. Les critères de performances des colonnes d'affinité boronate

L'interaction phénylboronate - composé cis-diol est souvent décrite comme un "complexe covalent réversible", ce qui peut conduire à la conclusion erronée que la chromatographie d'affinité boronate (BAC) est un mécanisme de forte affinité comme l'est la chromatographie d'immunoaffinité (IAC) par exemple. Dans les faits, les K_d caractéristiques de l'affinité boronate envers les composés cis-diols sont de l'ordre $10^{-1} < K_d < 10^{-4}$ M. Ces valeurs d'affinité classent l'affinité boronate dans la catégorie des chromatographies de faible affinité, comparées par exemple aux constantes d'affinité des anticorps en chromatographie d'immunoaffinité ($K_d \leq 10^{-7}$ M).

D'un point de vue chromatographique, il a été démontré que la rétention d'un composé présentant une affinité relativement faible ($K_d > \mu\text{M}$) pour un support chromatographique possédant un nombre total de sites d'interaction actifs (m_B), et en supposant les autres sources d'interaction négligeables, peut s'exprimer selon la relation suivante :

$$k = \frac{m_B}{K_d} \cdot \frac{1}{V_m}$$

avec V_m le volume de phase mobile (ou volume mort de la colonne).

Cette relation montre, pour un mécanisme d'interaction de faible affinité, qu'une augmentation de la rétention (k) peut résulter soit d'une augmentation du nombre total de sites d'interaction actifs par unité de volume (m_B/V_m) et/ou d'une augmentation de l'affinité de l'interaction (en diminuant la valeur du K_d du complexe). Une description très précise des différentes stratégies permettant d'améliorer les performances des matériaux d'affinité phénylboronate est présentée dans les articles de revue réalisés par Liu et He [35] et par Li et al. [36].

1.1. Le nombre de sites actifs par unité de volume et/ou capacité maximale

Dans le cas d'une interaction 1:1 (ce qui est le cas pour de l'affinité boronate) et en absence d'effet d'encombrement stérique, le nombre de sites actifs (m_B) correspond à la capacité maximale de la colonne (Q_{max} : maximum binding capacity) c'est-à-dire à la quantité maximale de soluté cible qui peut être capturée. L'extraction d'un composé sur une phase solide (SPE) sera d'autant plus avantageuse qu'il sera possible de percoler un plus grand volume d'échantillon pour une masse de phase donnée.

L'augmentation de la capacité/unité de volume (c'est à dire du nombre de sites par unité de volume) implique une augmentation du nombre de groupements fonctionnels par unité de volume. Pour atteindre un tel objectif, il faut soit mettre en œuvre des modes de greffage permettant d'obtenir des grandes densités surfaciques de sites actifs, soit utiliser des supports de grande surface spécifique. Une dernière alternative consiste à utiliser des stratégies d'amplification du nombre de sites, tel que montré dans la Figure 2 : (i) greffage de polymères branchés (comme le polyéthylèneimine (PEI) [19,21]), greffage de dendrimères sur les sites de surfaces [17,25], (iii) élaboration de brosses de polymère selon des réactions de polymérisation contrôlées initiées à partir de ces mêmes sites de surface (Surface Initiated Controlled Reaction polymerization (SI-CRP) [37]).

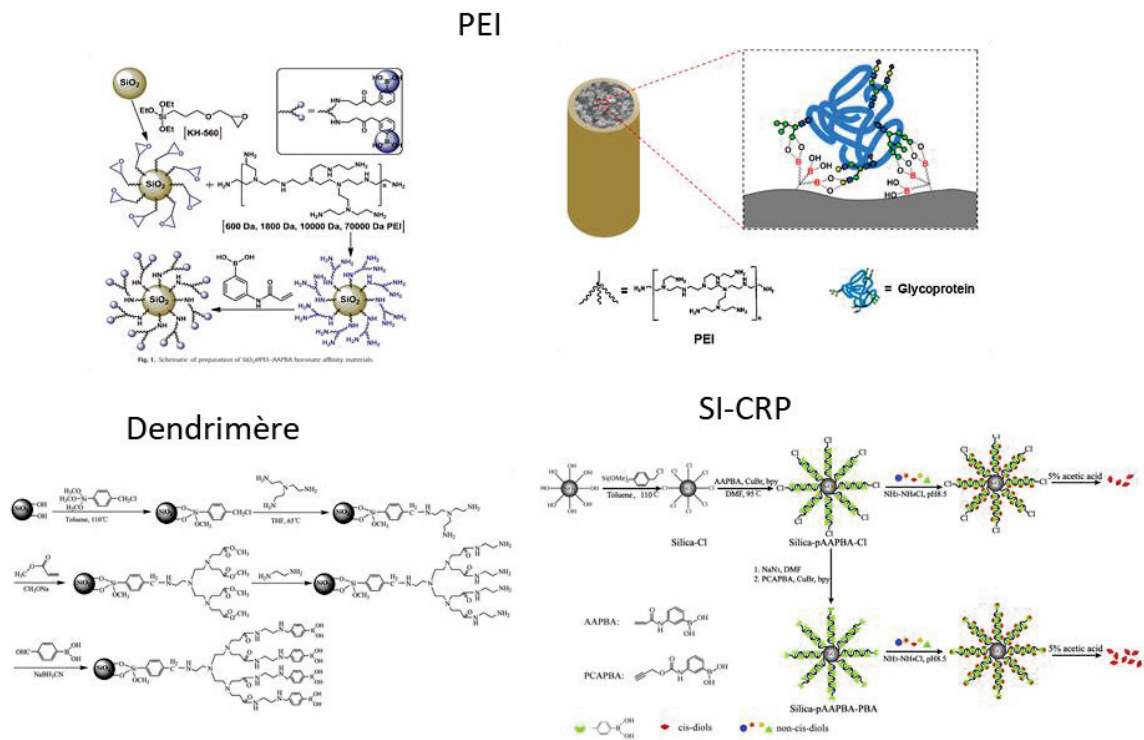


Figure 2. Stratégies d'amplification du nombre de sites de liaison boronate.

Néanmoins, le greffage sur la surface de polymères ou dendrimères permettant d'amplifier le nombre de sites réactionnels sur lesquels les dérivés d'acide phénylboronique viendront se greffer peut-être une source d'interactions secondaires si une partie des sites réactionnels reste libre. Cet inconvénient est limité lorsque la polymérisation est effectuée à partir de la surface et que les dérivés d'acide phénylboronique terminent la réaction. Cependant, ces méthodes multi-étapes sont assez laborieuses et longues à mettre en œuvre sur des colonnes miniaturisées.

Pour donner un ordre de grandeur, les valeurs de capacité dans la littérature par unité de masse, tous supports et modes de greffage confondus, vont de quelques dizaines de $\mu\text{mol g}^{-1}$ à environ 600 $\mu\text{mol g}^{-1}$.

1.2. La constante d'affinité K_a (ou la constante de dissociation K_d)

La constante d'affinité K_a est également un paramètre critique puisqu'elle conditionne le volume maximal percolable. Ainsi, au regard de la relativement faible affinité de l'acide phénylboronique vis-à-vis des composés cis-diols tels que les sucres et les glycoprotéines (généralement présents en très faible concentration dans des milieux biologiques), un certain nombre de travaux se sont focalisés sur la synthèse et l'utilisation de dérivés d'acide boronique présentant des affinités supérieures (faibles valeurs de K_d) vis-à-vis de ces classes de molécules d'intérêt.

A titre d'exemple, les acides difluorophénylboroniques, présentent une plus grande affinité pour les monosaccharides (environ 20 fois supérieure) que celles de leurs homologues phénylboroniques classiques (affinité mesurés en solution) [38]. La préparation de supports fonctionnalisés (nanoparticules [19,20], attapulгите [39], supports monolithiques [30,40]) par des dérivés difluorophénylboronate a été décrite en utilisant un réactif commercial, l'acide 2,4-difluoro-3-formylphénylboronique (DFFPBA).

Compte tenu du mécanisme d'interaction (mécanisme réversible dépendant du pH) la valeur de la constante d'affinité dépend fortement du pH. L'acide phénylboronique ou les dérivés simples d'acides phénylboroniques présentant des pK_a proches de 8 (l'acide 3-aminophénylboronique (APBA) et l'acide 4-vinylphénylboronique (VPBA) ont des pK_a respectifs de 8,8 et 8,2), leur pH optimal d'utilisation, lors de l'étape de capture, est voisin de 10. Un tel pH n'est guère adapté pour analyser des composés dans des matrices biologiques telles que le sang, les larmes, l'urine et la salive dont les pH varient de 4,5 à 8,0. Afin de s'affranchir de la dilution consécutive à un ajustement du pH de l'échantillon ou du risque de dégradation des biomolécules labiles, le développement de dérivés d'acides phénylboroniques de pK_a plus faible a également été proposé.

Quatre types de dérivés d'acides phénylboroniques de pK_a plus faibles ont été décrits : (I) les acides phénylboroniques avec des groupes électroattracteurs, tels que sulfonyle, fluoro et carbonyle, sur le cycle phényle, (II) les acides boroniques contenant des liaisons intramoléculaires B-N ou B-O tétra-coordinées (type Wulff), (III) les acides boroniques contenant des liaisons intramoléculaires B-O tri-coordinées (type Wulff amélioré), et (IV) les acides boroniques hétérocycliques. Les matériaux d'affinité boronate

fonctionnalisés avec ces quatre types d'acides boroniques et leur pH de liaison ont été discutés dans l'article de revue de Liu et He. [35], et sont représentés sur la Figure 3.

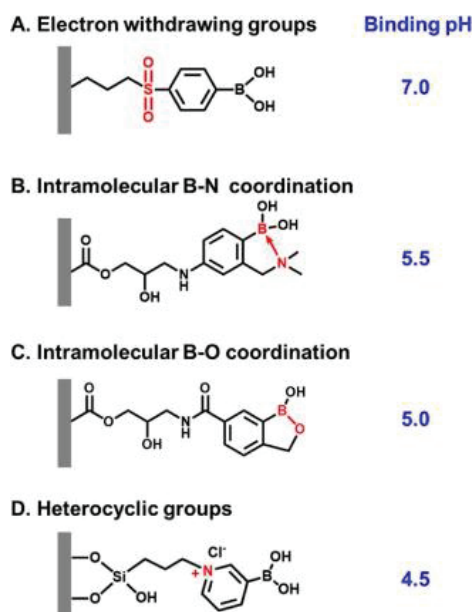


Figure 3. Matériaux d'affinité boronate présentant un pH de capture biocompatible [35].

2. Les méthodes de caractérisation des supports boronate

Les critères permettant de caractériser les supports d'affinité boronate concernent en premier lieu la constante d'affinité (K_d) et la quantité de sites actifs (m_B) et/ou la capacité de ces supports. Ces paramètres donnent une image de la capacité de purification et de préconcentration de ces composés.

Si la connaissance du nombre de sites actifs est utile afin de comparer les matériaux et/ou les procédés de fonctionnalisation, sa détermination n'en est pas moins facile. D'un point de vue pratique, ce sont très souvent des mesures de capacité (binding capacity) qui sont utilisées pour caractériser les supports fonctionnalisés. Les méthodes de détermination de la capacité et/ou du nombre de site actif m_B sont décrites ci-dessous.

La constante d'affinité dépend, quant à elle, du type de dérivé d'acide phénylboronique immobilisé, du composé cis-diol en solution et des conditions de reconnaissance telles que le pH, la composition de solvant et la concentration et nature du tampon.

Parmi les méthodes disponibles, certaines sont applicables sur du monolithe synthétisé en batch, d'autres sont applicables *in-situ* sur des colonnes miniaturisées.

2.1. Mesure de la capacité dynamique (ou Dynamic binding capacity, DBC)

Pour cette méthode, applicable exclusivement en mode batch, une masse déterminée d'adsorbant m est placée en contact avec un volume V_0 d'une solution de concentration connue C_0 en molécule cible. La concentration en molécule cible à l'équilibre C_{eq} est déterminée par HPLC-UV [14,23,28,29,31,37,41] et permet de remonter à la capacité (Q) du matériau par unité de masse selon la relation suivante :

$$Q = \frac{(C_0 - C_{eq}) V_0}{m}$$

Cette méthode est simple, mais elle ne prend pas en compte la dépendance de la concentration à l'équilibre en fonction de la valeur du K_d et de la concentration initiale. De plus, l'adsorption non-spécifique des composés cibles contribue à la valeur de la capacité et peut conduire, dans certains cas, à sa surestimation et ce d'autant plus que la concentration initiale est élevée. Si l'expérience est réalisée à une concentration élevée C_0 de la molécule cible [13,15,28,29,37,42] (de façon à déplacer l'équilibre d'interaction vers la formation complexée), la capacité (binding capacity) mesurée est proche de la capacité maximale du matériau, c'est-à-dire de son nombre de sites actifs.

2.2. Scatchard plot

Le principe de cette méthode, applicable également en batch, est identique à celui de la détermination de la « dynamic binding capacity ». Des solutions à différentes concentrations initiales en molécule cible sont mises en contact avec le support d'affinité boronate. La concentration du composé cible libre à l'équilibre (C_{eq}) est déterminée par spectrophotométrie UV-Vis ou par HPLC-UV afin de remonter à la quantité de composé cible complexé à l'équilibre, Q_{eq} , (de manière similaire à la méthode DBC) [43–45]. Le tracé de Q_{eq}/C_{eq} vs Q_{eq} (Scatchard plot) donne une droite dont l'équation est la suivante:

$$\frac{Q_{eq}}{C_{eq}} = \frac{Q_{max} - Q_{eq}}{K_d}$$

Le tracé de cette droite permet de déterminer la valeur de capacité (Q_{max}) et la constante de dissociation K_d à partir de la pente et de l'ordonnée à l'origine de la droite (Figure 4). Si cette méthode est plus longue à mettre en œuvre que la précédente, elle permet de remonter à la capacité maximale du

matériau (égale à la quantité de sites actifs si interaction 1:1 et pas de gêne stérique) ainsi qu'à l'estimation de la valeur du K_d .

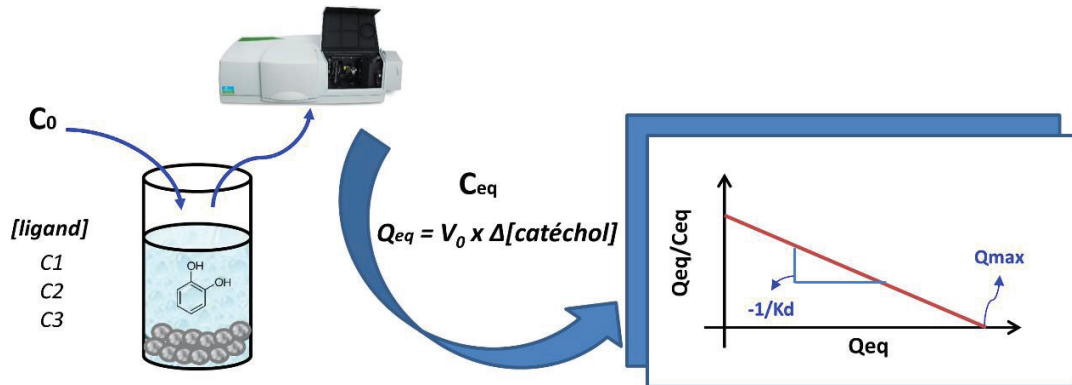


Figure 4. Détermination du K_d et du m_B par Scatchard plot.

2.3. Chromatographie d'affinité par analyse frontale

Alors que les deux méthodes précédentes, basées sur la mesure de la concentration du composé cible libre en solution, sont limitées à l'étude de matériaux en batch, la méthode de chromatographie par analyse frontale est spécifique pour la caractérisation des colonnes chromatographiques [46–48].

Cette méthode consiste à percoler en continu des solutions de différentes concentrations en composé cible (ligand) à travers des colonnes fonctionnalisées jusqu'à atteindre l'équilibre. Lorsque l'équilibre est atteint, l'évolution du signal en sortie de colonne permet de suivre l'apparition du composé cible. Les courbes obtenues, appelées courbes de percée, permettent de calculer, pour chaque concentration percolée la quantité de soluté cible qui a été capturée par le support (m_{Bapp}) (Figure 5). La quantité (m_{Bapp}) de catéchol capturée par la colonne est calculée selon :

$$m_{Bapp} = \Delta t \times F \times [Ligand]$$

où Δt est l'écart de temps entre le temps mort de la colonne et le temps de demi-vague du composé cible et F le débit de phase mobile.

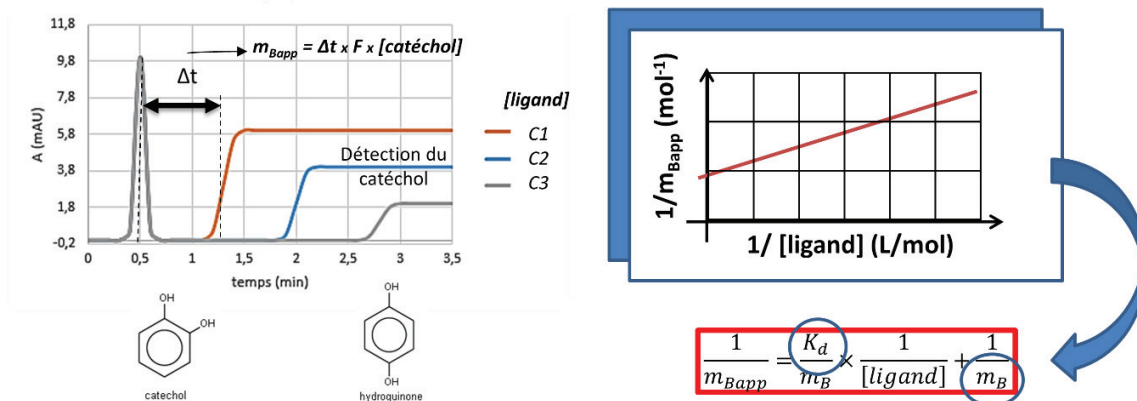


Figure 5. Détermination du K_d et du m_B par analyse frontale.

Dans le cas d'interactions de faible affinité de stœchiométrie 1:1, la représentation de $1/m_{Bapp}$ en fonction de $1/[Ligand]$ conduit à une droite dont l'équation permet de remonter à la valeur du K_d ainsi qu'à la quantité de sites actifs (m_B) [42] selon la relation :

$$\frac{1}{m_{Bapp}} = \frac{K_d}{m_B \cdot [ligand]} + \frac{1}{m_B}$$

A l'instar des méthodes citées précédemment, la mesure de la quantité de ligand capturée m_{Bapp} est susceptible d'être partiellement due à des mécanismes d'interactions secondaires non-spécifiques sur des surfaces présentant un caractère hydrophobe non négligeable. L'estimation de la part d'interactions non-spécifiques peut être évaluée en réalisant les courbes de percée à l'aide d'un isomère non cis-diol du ligand (par exemple l'hydroquinone à la place du catéchol).

De plus, il existe différentes considérations pratiques à prendre en compte pour une bonne estimation du K_d et de m_B , telles que les conditions de reconnaissance (pH, composition et nature du solvant, concentration et nature du tampon) et le choix de la concentration de l'analyte. De façon pratique, la concentration en ligand doit couvrir entre 0,1-10 fois la valeur du K_d [46]. Par exemple, avec une valeur de K_d de 330 μM à pH 8.5 [49], la concentration du catéchol devrait varier entre 33 et 3300 μM (3,6 mg L^{-1} et 363,4 mg L^{-1}).

3. Stratégie d'élaboration des colonnes miniaturisées

La préparation de supports monolithiques au format capillaire et fonctionnalisés avec des dérivés d'acides phénylboroniques a été un des premiers objectifs de ce travail de thèse. Différentes stratégies ont été envisagées et comparées.

Compte tenu des critères de performance décrits dans les paragraphes précédents (quantité maximale de sites actifs et constante de dissociation K_d la plus faible possible), les choix ont concerné :

- le support monolithique,
- le mode de fonctionnalisation,
- le dérivé d'acide phénylboronique.

3.1. Choix des supports

L'équipe TechSep dans laquelle ce travail a été réalisé possède une expertise dans le domaine de la synthèse des monolithes organiques et inorganiques.

Les monolithes inorganiques de silice, préparés par voie sol-gel se sont imposés :

- de par leur grande surface spécifique (plusieurs centaines de m^2/g) favorable à l'obtention d'une densité volumique élevée de greffons permettant la reconnaissance,
- de par leur perméabilité élevée et contrôlable, facilitant une percolation aisée et rapide de grands volumes d'échantillon,
- de par les multiples procédés permettant leur fonctionnalisation.

Bien que moins attractifs en termes de surface spécifique (une dizaine de m^2/g tout au plus) la mise en œuvre des monolithes organiques a également été envisagée. En effet, le mécanisme d'interaction réversible d'affinité boronate repose sur l'utilisation d'une large gamme de pH (pH basique pour la capture et acide pour l'élution) pouvant être une limitation à l'utilisation des monolithes de silice greffés stables dans un domaine de pH de 2 à 8. La très grande stabilité chimique des monolithes organiques constitue en ce sens un atout considérable. Malgré quelques exemples de synthèse directe (one-pot) de monolithes organiques par copolymérisation d'un dérivé d'acide phénylboronique avec un cross-linker de type éthylène diméthacrylate [28,32,50] ou N-N' méthylènebisacrylamide (MBAA) [51–53], nous avons opté pour le greffage post-synthèse d'un monolithe dont la synthèse et les propriétés chromatographiques sont

parfaitement maîtrisées. En effet, l'expérience du laboratoire sur le développement et l'optimisation de la synthèse de monolithes organiques adaptés pour la chromatographie (perméabilité, efficacité, reproductibilité) montre qu'il est difficile de prévoir le temps d'optimisation nécessaire pour atteindre ces performances. De plus, cette approche de greffage post-synthèse d'un monolithe poly(glycidylméthacrylate-co-éthylène diméthacrylate) (poly(GMA-co-EDMA)) a déjà été utilisée auparavant avec succès.

3.2. Choix des dérivés d'acides phénylboroniques

Le choix des principales réactions a été guidé par la disponibilité commerciale des dérivés simples ou plus complexes de l'acide phénylboronique, possédant, outre le site de reconnaissance, une fonction réactive (amine, acrylamide, thiol et aldéhyde). Afin d'expérimenter une nouvelle voie de greffage, un dérivé d'acide phénylboronique a également été synthétisé en collaboration avec l'Institut de Chimie et Biochimie Moléculaire et Supramoléculaire de Lyon (M. Sébastien VIDAL). Enfin, afin de pouvoir élargir la gamme de molécules cibles à des biomolécules cis-diols de plus faible affinité, la fonctionnalisation avec l'acide 2,4-difluoro-3-formylphénylboronique (DFFPBA) a été étudiée.

3.3. Choix des modes de fonctionnalisation

Compte tenu du savoir-faire de l'équipe TechSep en matière de fonctionnalisation, différentes stratégies ont été envisagées pour accéder à la plus grande quantité de sites actifs possible, dans un minimum de temps.

Dans le cas des monolithes de silice, la fonctionnalisation par le dérivé phénylboronique est systématiquement précédée d'une étape de silanisation permettant l'introduction en surface de fonctions réactives (acrylate, vinyl, thiol) pour les réactions de greffage ou de polymérisation des dérivés phénylboroniques. Dans le cas des monolithes organiques disposant de groupements époxy de surface, le greffage peut être soit direct, soit nécessiter des modifications de surface préalables (ouvertures des époxydes en diol puis oxydation des diols en aldéhyde réactif).

Le greffage simple et la polymérisation (théoriquement plus favorable en termes de quantités de sites actifs obtenus à l'issue du greffage) ont été étudiés, qu'il s'agisse de réactions thermiques (lentes) ou

photo-initiées (très rapides). Le greffage simple avec amplification grâce à des polymères branchés polyéthylène imine (PEI) a également été envisagé pour augmenter la quantité de sites actifs.

3.4. Résumé de la stratégie de synthèse

La Figure 6 illustre les différentes stratégies mises en œuvre pour la préparation des supports d'affinité. Ces stratégies pourraient se regrouper en trois catégories :

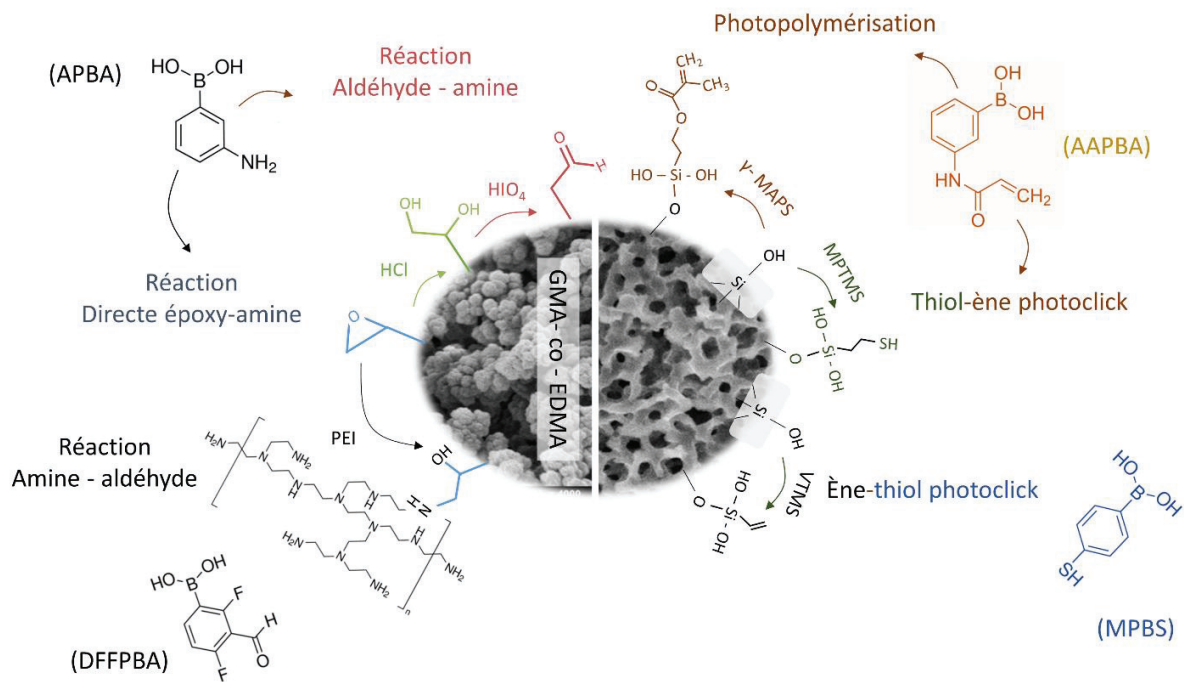


Figure 6. Stratégies mises en œuvre pour la préparation des supports d'affinité

- Greffage simple époxy-amine, aldéhyde-amine (voie thermique) sur monolithe organique.
- Photopolymérisation d'un dérivé acrylamide de l'acide phénylboronique (l'acide 3-(acrylamido)phénylboronique, AAPBA) sur un monolithe de silice activé par des fonctions acrylate.
- Photogreffage simple basé soit sur l'activation sélective des monomères thiols en solution qui réagissent avec les fonctions vinyliques de surface, soit sur l'activation sélective des thiols de surface qui réagissent avec les fonctions vinyliques d'un dérivé phénylboronique (thiol-ène). Cette approche utilise un mécanisme de chimie click photoinitié par des radicaux évitant l'utilisation de catalyseur métallique.

4. Partie Expérimentale

4.1. Synthèse des monolithes

4.1.1 Instrumentation

L'écoulement des liquides à travers les capillaires et les monolithes est assuré soit à l'aide du système nanobaume® (Cluzeau, France), soit à l'aide d'un système de contrôle microfluidique (MFCS-100, Fluigent). Les pressions accessibles avec ces différents dispositifs varient de 50 mbar à 200 bars.

Tous les greffages/synthèses photochimiques sont réalisés dans un four UV Bio-Linker crosslinker (VWR International, Strasbourg, France) équipé de 5 lampes (8W) émettant à 365 nm.

Caractérisation morphologique des monolithes : Un microscope JEOL nanoscope JCM 5000 a été utilisé pour analyser les monolithes de silice synthétisés ; ces derniers ont été coupés et fixés perpendiculairement sur des plaques métalliques.

Caractérisation par RMN du solide : La fonctionnalisation du monolithe en batch par le MPBA a été caractérisée par spectroscopie RMN ¹³C à l'angle magique : spectromètre AVANCE III 500WB, sonde 4mm triple H/X/Y, technique MAS, vitesse de rotation 10KHz, fréquence spectrale 99,34 MHz.

Caractérisation par analyse thermogravimétrique (ATG): Les monolithes en batch vierge, silanisés et fonctionnalisés AAPBA par photopolymérisation ont été caractérisés par ATG : TGA Q50 V20 ; 13 Build 39, sous air à 10 °C min⁻¹ jusqu'à 1000 °C.

4.1.2 Synthèse des monolithes de silice

Les réactifs entrant dans la fabrication du monolithe : tétraméthoxysilane (TMOS), méthyltriméthoxy-silane (MTMS), acide acétique et PEG 10000 ont été obtenus auprès d'un seul fournisseur (Sigma Aldrich).

Les capillaires utilisés sont des capillaires de silice fondue revêtus polyimide ou fluoropolymère transparent aux UV (Cluzeau, France) : diamètre externe 375 µm et diamètre interne (d.i.) 75µm ou 100 µm. 18 mL d'une solution de TMOS/MTMS (85/15 v/v) sont mélangés avec 40 mL d'acide acétique contenant 1,9 g de PEG et 4,05 g. La solution est refroidie à 0°C et agitée pendant 30 min à 0°C. Le mélange est ensuite chauffé à 40°C. Ce mélange réactionnel est alors soit introduit dans des capillaires de silice fondue soit dans un vial fermé pour obtenir des monolithes en batch. En capillaire, les extrémités sont

bouchées avec de la colle UV (UV2195, Polytech). Les capillaires et/ou les vials sont placés dans un bain-marie à 40°C pendant une nuit. La dernière étape de synthèse de monolithe de silice est un traitement hydrothermique du monolithe indispensable pour créer la mésoporosité du matériau. Pour cela, les monolithes (en capillaire ou en batch) sont placés dans un four où ils subissent une rampe de température de 40°C à 120°C suivi d'un pallier de 3h à 120°C. Les monolithes en fin de synthèse sont ensuite abondamment rincés au méthanol.

4.1.3 Synthèse des monolithes organiques (poly(GMA-co-EDMA))

Les réactifs entrant dans la fabrication du monolithe : le glycidyl méthacrylate (97 %, GMA), l'éthylène diméthacrylate (98 %, EDMA), le 2,2'azobisisobutyronitrile (> 99 %, AIBN), le butane-1,4-diol (LC-grade), le propan-1-ol (LC-grade), le 3-(triméthoxysilyl)-propyl méthacrylate (γ -MAPS), la diéthylamine (97%, DEA) et la triéthylamine (98 %, TEA) ont été obtenus auprès d'un seul fournisseur (Sigma Aldrich).

Les capillaires utilisés sont des capillaires de silice fondue enduits de téflon transparents aux UV (Cluzeau, France) : diamètre externe 360 μm et diamètre interne (d.i.) 75 μm ou 100 μm . La vinylation préalable des parois internes des capillaires, qui permet l'ancrage du monolithe, est réalisée par la procédure suivante : nettoyage des capillaires durant 30 minutes avec de la soude 1 M et pendant 30 minutes avec de l'éthanol. La réaction de vinylation est réalisée par une solution à 5 % (v/v) de γ -MAPS dans un mélange éthanol/eau (95/5, v/v) pendant 30 minutes. Finalement, le capillaire est rincé à l'éthanol pendant 30 minutes avant d'être séché sous flux d'azote.

Le mélange réactionnel utilisé pour la synthèse du monolithe est constitué de 30 % de GMA, 10 % d'EDMA, 35 % de propan-1-ol, 5 % d'eau et 20 % de butane-1,4-diol (fractions volumiques). L'initiateur radicalaire, l'AIBN, est ajouté à hauteur de 1 % en masse par rapport aux monomères. Le mélange obtenu est homogénéisé sous agitation magnétique forte pendant 30 minutes avant d'être dégazé sous ultrasons pendant 5 minutes. Le mélange est ensuite introduit dans le capillaire avant irradiation UV (1,4 mW cm^{-2} pendant 30 min). En fin de synthèse, la colonne monolithique obtenue est rincée en acétonitrile (ACN) à un débit de 1 $\mu\text{L min}^{-1}$ pendant 2 h, à l'aide d'une pompe chromatographique.

4.2. Fonctionnalisation des monolithes de silice

Avant toute fonctionnalisation par un dérivé d'acide phénylboronique, les monolithes de silice doivent être systématiquement silanisés afin de disposer, en surface, de fonctions réactives capables de réagir avec le dérivé d'acide phénylboronique.

4.2.1. Photopolymérisation de l'AAPBA sur support silanisé acrylate

Silanisation au γ -MAPS : La solution de silanisation est préparée en mélangeant 1 mL d'une solution MEOH/H₂O (95/5), 50 μ L de γ -MAPS et 50 μ L de triéthylamine (TEA). Cette solution est percolée à travers le monolithe pendant 3 heures à 80 °C. Ensuite, le capillaire est rincé au MeOH pendant 1 heure.

Photopolymérisation : La solution de greffage est une solution à 100 mM en AAPBA et 9 mM en benzoin methyl ether (BME) préparée dans un mélange eau (ajustée à pH = 9 avec de la Triéthylamine)/ACN (50/50). Le monolithe silanisé et préalablement rincé avec un mélange ACN/H₂O (50/50) est rempli sous pression (7 bars) pendant 20 minutes avec le mélange de polymérisation. Le capillaire est irradié sous UV pendant 10 minutes à 365 nm. La réaction photochimique est localisée sur le monolithe en masquant la portion vide du capillaire avec un masque (tube en PEEK de 500 μ m d.i). Dans le cas d'une photopolymérisation en batch, 200 mg de monolithe silanisé sont mis en contact avec 3,75 mL de solution de polymérisation.

4.2.2. Photogreffage de l'AAPBA par chimie-Click « thiol-ène » sur support silanisé thiol

Silanisation au 3-(mercaptopropyl)trimethoxy silane (MPTS) :

Protocole a - Une solution à 5 % (v/v) de MPTS dans du toluène (anhydre) est percolée à travers la colonne pendant 3h à 37 °C. La colonne capillaire est ensuite bouchée aux extrémités et la réaction est conduite à 100 °C sur une nuit. La colonne est ensuite rincée au MeOH.

Protocole b - Une solution à 5 % (v/v) de MPTS dans de l'acétone est percolée à travers la colonne pendant 2h à température ambiante (20 °C). Ensuite, le capillaire est bouché aux extrémités et laissé la nuit à 110 °C. La colonne est ensuite rincée au MeOH [54].

Protocole c - Une solution à 5 % (v/v) de MPTS and un mélange MeOH/eau (95/5, v/v) acidifiée (pH 4.5) est percolée à travers le capillaire pendant 3 h à température ambiante (20 °C). La colonne est ensuite rincée au MeOH.

Photogreffage : La solution de greffage est préparée en mélangeant 20 mg d'AAPBA et 2,5 mg de benzophénone dans 1 mL d'un mélange eau (ajustée à pH=9 avec de la TEA)/ACN (50/50). Le monolithe

silanisé MPTS et préalablement rincé avec un mélange ACN/H₂O (50/50) est rempli sous pression pendant 20 minutes avec le mélange de photogreffage. Le capillaire est irradié sous UV pendant 10 minutes à 365 nm puis rincé successivement avec un mélange ACN/H₂O (50/50) puis au MeOH.

4.2.3. Photogreffage du MPBA par chimie-click « ène-thiol » sur support silanisé vinyl

Silanisation au Vinyltriméthoxysilane (VTMS) : Le mélange réactionnel est obtenu en mélangeant 50 µL de VTMS, 25 µL de TEA et 1 mL de mélange MeOH/H₂O (95/5, v/v). La solution est percolée à travers le monolithe pendant 3 heures à 80°C. Le mélange réactionnel est renouvelé toutes les heures pour éviter la polycondensation du silane en solution (et le bouchage des colonnes). En fin de réaction le capillaire est rincé au MeOH pendant 1 heure [55].

Synthèse du MPPBA : La synthèse de l'acide 3-(3-mercapto)propanamide) phénylboronique (MPPBA) consiste en 3 étapes (Figure 7) :

- 1) Réaction entre l'acide 3-aminophénylboronique pinacol ester et un acide activé avec une fonction thiol. Cette réaction a été réalisée dans le dichlorométhane (DCM), en présence de N-(3-diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide chlorhydrate (EDC), d'hydroxybenzotriazole (HOBT), et de N,N-Diisopropyléthylamine. Le mélange résultant a été agité sous argon pendant 7 h à température ambiante, et ensuite dilué avec 50 mL de DCM et lavé avec NaHCO₃ et de l'eau salée. La phase organique a été combinée et séchée avec Na₂SO₄, et ensuite concentrée et purifiée avec une colonne de gel de silice et des mélanges de DCM/AcOH comme éluant avec un suivi par CCM. Le rendement de cette réaction a été de 71 %.
- 2) Afin d'éliminer le groupement pinacol, le composé produit lors de la réaction précédente et l'acide phénylboronique ont été dissous en ACN avec 2 % de TFA. La solution de réaction a été agitée sous reflux durant 24 h. Le solvant du mélange réactionnel a été éliminé et le produit a été purifié sur une colonne de gel de silice avec des mélanges de DCM/MeOH comme éluants, et un suivi par CCM. Le rendement de cette réaction a été de 91 %.
- 3) Afin d'éliminer le groupement acétyle, le produit de la réaction précédente et le KOH ont été dissous avec du MeOH sec et sous argon. La solution de réaction a été agitée à 45 °C durant 2 jours. La réaction a été arrêtée avec une solution aqueuse d'HCl 2 M et pH a été contrôlé à pH < 5. La solution a été évaporée afin d'éliminer le solvant, et le produit final, le MPPBA a été

purifié sur une colonne de gel de silice avec des mélanges de DCM/MeOH comme éluants, et un suivi par CCM. Le rendement de cette réaction a été de 68 %.

Photogreffage : 40 mg de Benzophénone sont dissous dans 1 mL de MeOH (Solution 1). Ensuite, 30 mg d'MPBA sont dissous dans 1 mL de MeOH et 50 μ L de la solution 1 sont ajoutés. La solution de greffage est percolée à travers le monolithe puis le capillaire est irradié sous UV à 365 nm pendant 10 minutes. Enfin, le monolithe est rincé avec du MeOH pendant 30-40 minutes.

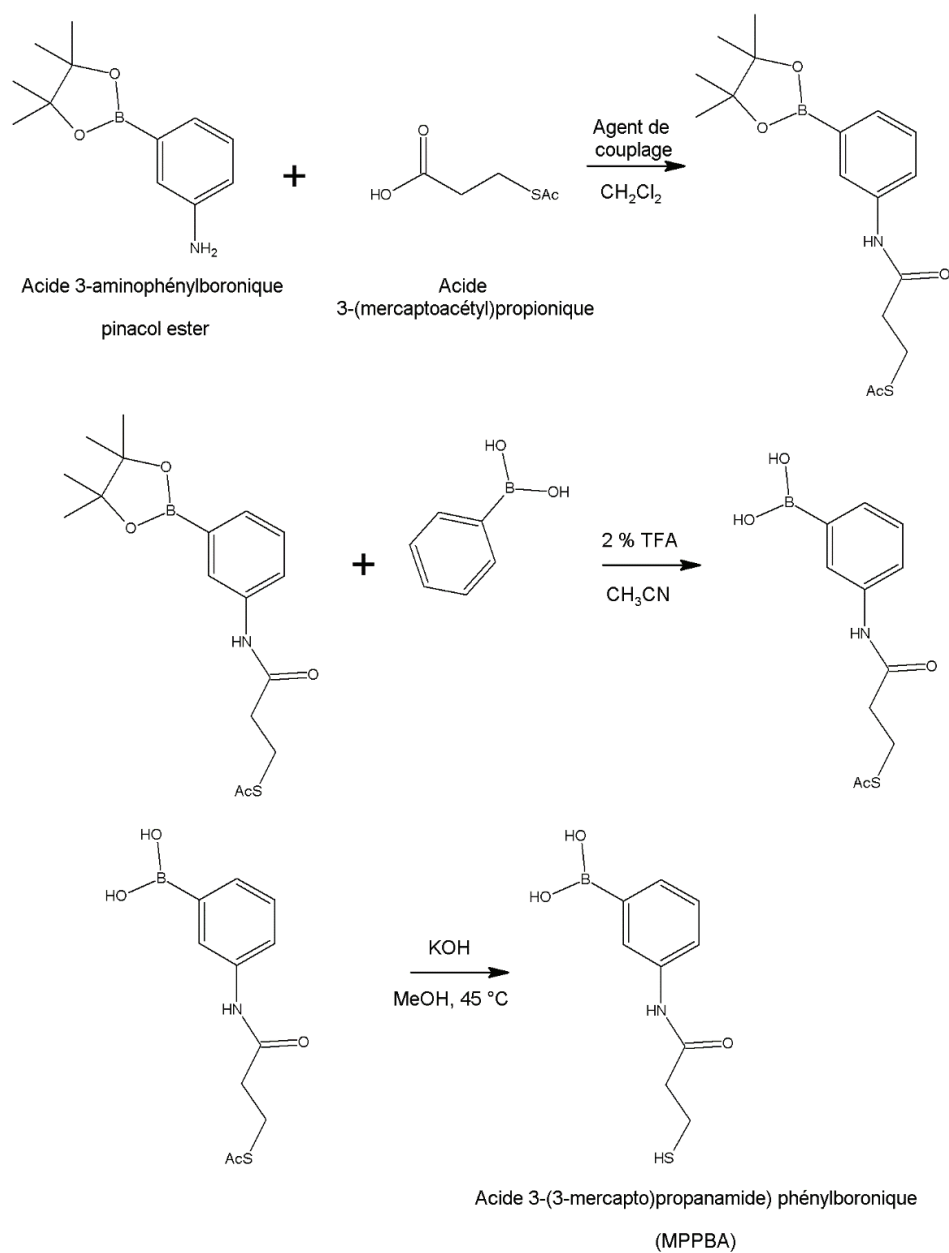


Figure 7. Etapes réactionnelles de synthèse du MPPBA.

4.3. Fonctionnalisation des monolithes organiques

4.3.1. Greffage direct de l'APBA sur support GMA : réaction époxyde – amine

Greffage dynamique sur capillaire monolithique : 20 mg d'APBA sont solubilisés dans un mélange constitué de 2 mL de tampon Na_2HPO_4 10 mM à pH 9,2 et de 200 μL de MeOH ($[\text{APBA}] = 66 \mu\text{M}$). La solution est percolée en continu, à chaud (capillaire placé dans un four à 60°C) pendant 24 h. Les colonnes sont ensuite rincées avec un mélange MeOH/ H_2O (50/50, v/v).

Greffage statique : 20 mg d'APBA sont solubilisés dans un mélange constitué de 75 μL de tampon Na_2HPO_4 10 mM à pH 9.2 et de 160 μL de MeOH ($[\text{APBA}] = 621 \mu\text{M}$). La solution est percolée pendant 30 minutes sur le monolithe organique poly(GMA-co-EDMA). Les extrémités des capillaires sont bouchées par des bouchons en élastomère et le capillaire est placé dans un four à 60 °C pendant 62 h. Les colonnes sont ensuite rincées avec un mélange MeOH/ H_2O (50/50, v/v).

4.3.2. Greffage de l'APBA sur support GMA modifié aldéhyde : réaction aldéhyde- amine

Prétraitement du monolithe GMA : le monolithe organique poly(GMA-co-EDMA) est tout d'abord soumis à une étape d'hydrolyse c'est-à-dire d'ouverture des cycles époxy en diols par percolation d'une solution de H_2SO_4 1 M pendant 2 heures. Après rinçage à l'eau, les fonctions diols sont oxydées en aldéhyde par percolation d'une solution d'acide périodique 120 mM (pH = 5,5) pendant 1 heure. Le monolithe est ensuite rincé à l'eau.

Greffage de l'APBA : Malgré la meilleure efficacité de la réaction à pH acide [56], la solution de greffage utilisée pour la méthode époxy-amine en mode statique a été utilisée. Cette solution est percolée en continu pendant 24 heures à travers le monolithe. La réduction des fonctions imines permettant de stabiliser le couplage est ensuite réalisée en percolant une solution aqueuse de NaBH_3CN (5 mg mL^{-1}) pendant 1 heure. Le monolithe est ensuite rincé à l'eau.

4.3.3. Protocoles de greffage du DFFPBA sur support GMA : couplage amine-aldéhyde

Préfonctionnalisation du monolithe GMA par le polyéthylène imine (PEI) branché : Cette étape a été réalisée par une réaction époxy-amine. Une solution de PEI est préparée en solubilisant 100 mg de PEI branché (M_w 25 000) dans 1 mL de MeOH. Cette solution est percolée en continu dans une colonne

capillaire (poly(GMA-co-EDMA) pendant 12 h dans un four à 60 °C. Ensuite, le capillaire est rincé avec du MeOH pour éliminer le PEI en excès.

Greffage du DFFPBA sur les supports modifié PEI : La solution de greffage est préparée en solubilisant 10 mg de DFFPBA dans 200 µL de MeOH. Ce mélange réactionnel est percolé durant 6 h. Ensuite, une solution aqueuse de NaBH₃CN (5 mg mL⁻¹) est percolée pour réduire les imines en amines.

4.4. Evaluation des performances des monolithes fonctionnalisés

Le catéchol et l'adénosine sont les composés cis-diols les plus couramment utilisés pour caractériser les colonnes d'affinités boronate tandis que l'hydroquinone, isomère non-cis-diol du catéchol est utilisée pour évaluer la spécificité (Figure 8). Dans la littérature, l'interaction entre le catéchol et l'acide phénylboronique est caractérisée par une valeur de K_d de 330 µM avec tampon phosphate 0,1 M et un pH de 8,5 [49].

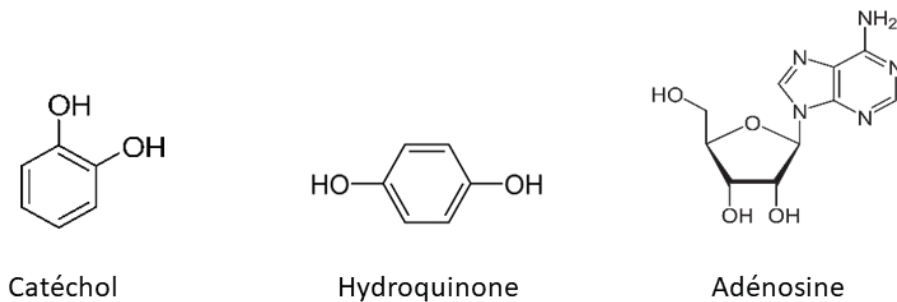


Figure 8. Formule chimique des composés cis-diols utilisés pour caractériser les supports d'affinité boronate.

4.4.1. Mesure de « Dynamic Binding Capacity » en batch

Cette expérience consiste à suivre, par spectrophotométrie UV-Vis, la concentration d'une solution de catéchol mise en contact avec une quantité donnée de monolithe fonctionnalisé en fonction du temps.

Les coefficients d'absorptivité spécifiques du catéchol ont été déterminés à deux longueurs d'onde :

$$\epsilon_{200\text{nm}} = 0,1555 \text{ L mg}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ et } \epsilon_{277\text{nm}} = 0,0213 \text{ L mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}.$$

Les expériences de reconnaissance ont été conduites en tampon phosphate (15 mM Na₂HPO₄, pH 8,5) modifié avec 20 % en volume de MeOH. 10,4 mg de batch fonctionnalisé boronate ont été placés sous

agitation constante dans 7,3 mL d'une solution à 5 mg L⁻¹ en catéchol (45,5 μM). L'absorbance du surnageant a été mesurée à intervalles réguliers pendant 340 h.

4.4.2. Chromatographie d'affinité par analyse frontale de colonnes monolithiques fonctionnalisées

Les courbes de percées sont réalisées (sauf indication contraire) avec des solutions de catéchol de concentration variables dans un mélange tampon phosphate (pH 8,5, 100 mM Na₂HPO₄)/MeOH, 80/20 (v/v). Les solutions sont percolées sur des monolithes de 8,5 cm de long (« Short-end mode »), en mode « pressurisation externe » (pression de 2 à 12 bars) sur des appareils d'électrophorèse capillaire (CE 7100 Agilent) équipés d'un détecteur à barrettes de diodes. La quantité de catéchol capturée aux différentes concentrations de catéchol permet de remonter au nombre de sites actifs et à la constante de dissociation.

5. Résultats

5.1. Synthèse et évaluation de colonnes monolithiques de silice d'affinité boronate

La littérature portant sur la modification de surface de support de silice est très abondante en raison de la grande utilité des matériaux, ou revêtements à base de silice. L'approche la plus directe permettant de fonctionnaliser des surfaces de silice est la silanisation. Cependant, aucun dérivé d'alcoxyde de silicium porteur d'acide phénylboronique n'est disponible commercialement. Les approches alternatives reposent alors sur des procédés de fonctionnalisation multi-étapes. La première étape est une étape de silanisation permettant d'insérer sur le support un groupement réactionnel capable de réagir ultérieurement avec des dérivés d'acide phénylboronique. Différents types de réactions peuvent alors être envisagés. L'approche la plus simple concerne le couplage (ou greffage) d'un réactif en solution sur un groupement de surface approprié (réaction époxy-amine, ou aldéhyde-amine par exemple). Afin d'amplifier le nombre de sites greffés par unité de surface, des procédés de fonctionnalisation à base de réactions de polymérisation (polymérisation radicalaire initiée thermiquement [57,58][59], réaction de polymérisation initiée à partir de la surface et réaction de polymérisation contrôlée (SI-CRP)) sont de plus en plus étudiées. Néanmoins, ces procédés de fonctionnalisation ne sont pas localisables et restent généralement chronophages. Ces procédés ne sont donc pas facilement adaptables dans le cadre de la préparation de colonnes miniaturisées quand différents modes chromatographiques doivent coexister sur la même colonne. C'est pour répondre à ces objectifs que des procédés initiés par photochimie ont été développés ces dernières années. Nous nous sommes donc intéressés aux procédés de photopolymérisation et de greffage photochimiques (thiol-ène, ène-thiol) de dérivés acrylamide (AAPBA) ou mercapto (MPBA) d'acide phénylboronique sur des monolithes silices.

5.1.1. Propriétés des monolithes de silices utilisés

Les monolithes de silice utilisés dans ce travail de thèse sont des matériaux qui ont été développés et caractérisés lors d'un précédent travail de thèse [60]. Le protocole de synthèse par voie sol-gel, détaillé dans la partie matériel et méthode, conduit à la formation de matériaux monolithiques au format capillaire adaptés à la nano-chromatographie. Ces matériaux monolithiques, formés d'un squelette continu (diamètre du squelette de 1,1 μm environ), présentent une porosité bimodale avec des macropores (environ 2 μm) permettant l'écoulement de la phase mobile et des mésopores creusées dans le squelette

et conférant au matériau une grande surface spécifique. Les clichés MEB présentés sur la Figure 9, permettent de qualifier les propriétés structurales des monolithes synthétisés

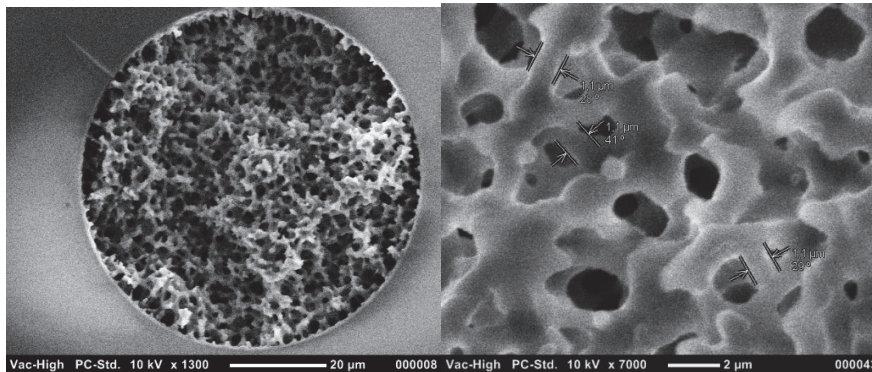


Figure 9. Clichés MEB illustrant la structure de monolithes de silice synthétisés in-situ par procédé sol gel dans un capillaire de 75 μm .

Des mesures d'isothermes d'adsorption/désorption d'azote ont été réalisées sur ces matériaux monolithiques après traitement hydrothermique. Des isothermes de type IV, présentant une boucle d'hystérésis de type H2 (pores avec connexions de différentes tailles), ont été obtenues. Ces isothermes sont caractéristiques de matériaux mésoporeux et permettent d'estimer une surface spécifique (BET) de l'ordre de 580 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ et un diamètre moyen des mésopores de 7 nm. La masse volumique est de 0,7 g cm^{-3}

D'un point de vue chromatographique, ces colonnes monolithiques synthétisées en capillaire ont été caractérisées par une perméabilité de l'ordre de $8 \pm 2 \times 10^{-14} \text{ m}^2$ et un optimum d'efficacité (H_{min} de 6-10 μm) pour une vitesse linéaire de phase mobile de 0,1 cm s^{-1} .

5.1.2. Fonctionnalisation par photopolymérisation

La modification de surface pour introduire des groupements fonctionnels adaptés à la chromatographie peut être réalisée par polymérisation radicalaire sur des surfaces pré-activées. Il a été montré, lors d'une étude antérieure sur la photopolymérisation de chaînes alkyles sur support de silice [61], que le contrôle des conditions de polymérisation (quantité de monomère, quantité d'initiateur, durée de polymérisation) permet d'obtenir des matériaux présentant des propriétés de rétention accrues par rapport à un greffage simple, tout en conservant les performances intrinsèques du support chromatographique (efficacité et perméabilité). La polymérisation initiée par irradiation UV présente les avantages (par rapport à la polymérisation thermique) de pouvoir être localisable (seules les zones

irradiées réagissent) et rapide. Il a été montré que ces méthodes permettent d'introduire des fonctions variées sur des monolithes de silice dits génériques (pré-activés avec des fonctions acrylates) tout en maintenant leurs performances intrinsèques [61,62].

La première étape du procédé de fonctionnalisation photochimique implique la modification de la surface du monolithe par une fonction réactive vis-à-vis de réactions radicalaires. Sur la base des précédents travaux menés par le laboratoire [60], les colonnes de silice monolithiques sont « activées » par des fonctions méthacrylates par silanisation de la surface à l'aide du γ -MAPS. Dans un deuxième temps, cette surface pré-activée peut réagir avec le 3-acrylamidophénylboronique acide (AAPBA) en présence d'un initiateur radicalaire sous irradiation UV (Figure 10).

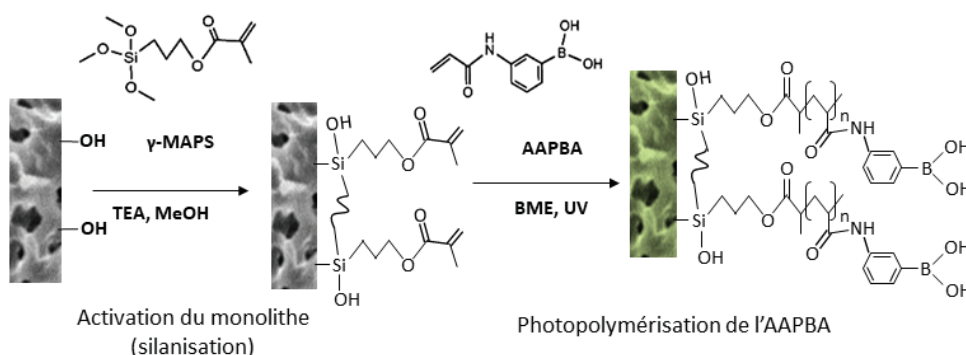


Figure 10. Silanisation puis photopolymérisation de l'AAPBA sur monolithe de silice.

Afin de suivre l'efficacité des différentes étapes du processus de fonctionnalisation, les matériaux ont tout d'abord été caractérisés au format batch, à différents stades de modification.

5.1.2.1. Caractérisation en batch

La caractérisation des supports obtenus par photopolymérisation a été réalisée en premier lieu en batch. De façon concrète, un lot de monolithe de silice a été synthétisé à l'échelle du bécher. Ceci permet d'obtenir une poudre qui pourra ensuite être caractérisée par différentes techniques analytiques spécifiques de l'analyse des matériaux. Les résultats de ces analyses serviront à suivre les différentes étapes de modification pour faciliter l'interprétation des résultats obtenus en capillaire. En effet, ces techniques d'analyse ne sont pas directement applicables en capillaire compte tenu des très faibles quantités de matériaux à l'échelle d'un capillaire de 75 μm de diamètre interne.

L'Analyse Thermogravimétrique du batch à chaque étape de la fonctionnalisation (monolithe de silice vierge, silice silanisée (γ -MAPS) et silice photopolymérisée avec l'AAPBA) a été réalisée pour la détermination de sites totaux d'AAPBA en surface (Figure 11).

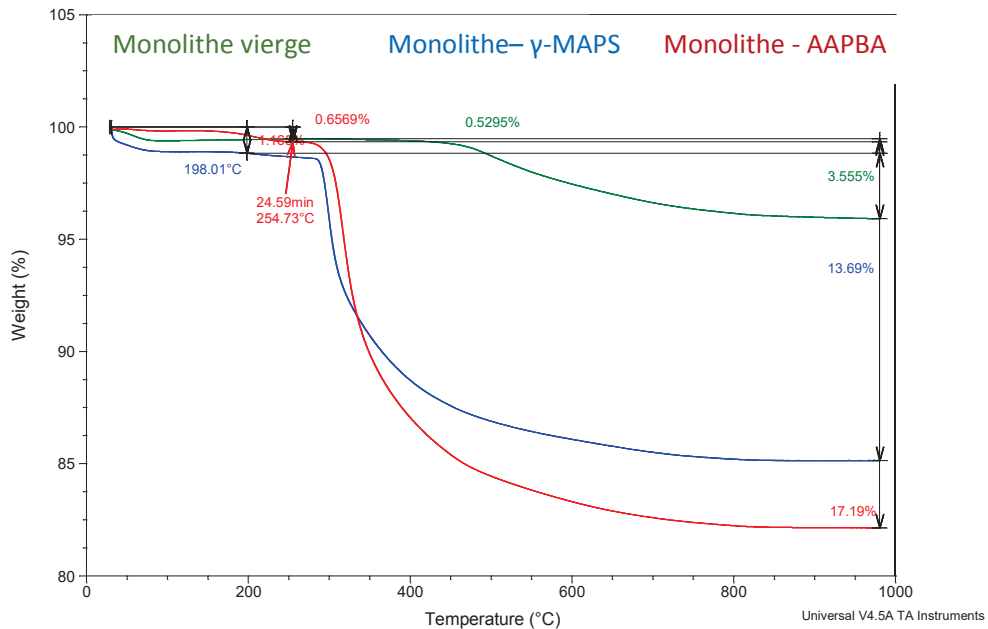


Figure 11. Analyse thermogravimétrique des batchs de silice vierge, silanisée (γ -MAPS) et photopolymérisée avec l'AAPBA.

La Figure 11 illustre les pertes de masse observées en fonction de la température pour le monolithe de silice aux différents stades de la fonctionnalisation. Outre la perte initiale attribuée à la perte d'eau, le monolithe de silice vierge présente une perte de masse significative à partir de 400°C (environ 3,5 % de la masse initiale). Cette perte est attribuée à la perte des groupements méthyles provenant du méthyltriméthoxysilane (MTMS) incorporé dans la structure du monolithe au cours de sa synthèse. Après silanisation au γ -MAPS, le monolithe présente un comportement assez différent. La perte de masse principale apparait pour des températures inférieures à 300°C. La perte de masse est très largement supérieure à celle du monolithe de départ. L'écart de perte de masse entre le monolithe silanisé et le monolithe vierge est d'environ 10,1 % et est attribué à la pyrolyse des greffons γ -MAPS. Enfin, la perte de masse de 3,5 % supplémentaire obtenue pour un monolithe photopolymérisé AAPBA est attribuée aux greffons AAPBA. L'ensemble des données issues de ces analyses d'ATG ainsi que des analyses d'adsorption/désorption de diazote est résumé dans le tableau suivant :

Tableau 1. Résultats de l'ATG et d'adsorption/désorption d'azote des batchs de monolithe de silice vierge, silanisée et fonctionnalisée AAPBA.

Monolithe en batch	BET-BJH			ATG-ATR		
	Surface spécifique BET (m ² /g)	Volume poreux Total (cm ³ /g) à P/P ₀ = 0,98	Diamètre moyen des pores (nm) ^a	% perte (m/m)	Nb de greffons (μmol/m ²)	% molaire AAPBA / γ-MAPS
Silice vierge	580	1,1	7,0	3,55	-	-
Silice – γ-MAPS	531	0,77	6,4	13,69	1,73	-
Silice - AAPBA	502	0,69	4,8	17,19	0,44	25,66

^a Désorption maximale par BJH

Si les caractéristiques morphologiques du monolithe ne sont pas modifiées à l'échelle de la macroporosité et de la taille du squelette, le suivi du matériau par mesure d'adsorption/désorption d'azote illustre l'impact des étapes de fonctionnalisation sur la mésoporosité. Ainsi, l'ensemble de la fonctionnalisation conduit à une diminution importante du diamètre moyen des mésopores, passant de 7 nm pour le monolithe après synthèse à 4,8 nm après silanisation et photopolymérisation AAPBA. Néanmoins, cette taille de mésopores reste suffisante pour permettre l'accès à des petites molécules.

Théoriquement, la réaction de photopolymérisation (Figure 10) [62] permet de créer des revêtements polymériques, c'est-à-dire qu'il est possible, à partir d'un site de surface méthacrylate, de polymériser plusieurs monomères d'AAPBA. Il est donc envisageable d'obtenir un ratio molaire AAPBA/γ-MAPS supérieur à 1. Néanmoins, les pertes de masse rapportées dans le Tableau 1 permettent d'estimer une densité de greffage de 1,73 μmol de γ-MAPS / m² et de seulement 0,44 μmol d'AAPBA / m² de monolithe. Ce résultat suggère que ce mode de fonctionnalisation n'est pas quantitatif car seulement un quart des fonctions méthacrylate de surface a réagi (dans le cas d'un greffage d'un seul monomère AAPBA par site de surface), voire moins si un site de surface initie la polymérisation de plusieurs monomères d'AAPBA. Au vu de ces résultats, la densité de greffage de silane n'est donc pas limitante. Les conditions de polymérisation initiées par des radicaux ne semblent pas être adaptées à une propagation de chaîne poly(AAPBA).

Afin de confirmer ces résultats, il a été entrepris de déterminer la quantité de sites actifs AAPBA par une mesure de « Dynamic Binding Capacity », en tirant parti de l'affinité entre ces groupements phénylboronates de surface et une molécule modèle cis-diol, le catéchol. Lorsque l'équilibre entre le monolithe (10,4 mg) et la solution de catéchol (7,3 mL à [L]₀= 45,5 μM) est atteint (après 1,5 h environ), l'absorbance de la solution se stabilise et permet de calculer la concentration de catéchol à l'équilibre.

Le calcul du nombre de sites actifs a été réalisé en prenant en compte une réaction de complexation de stœchiométrie 1:1. $[P]$ est la concentration d'AAPBA actif non complexé, $[PL]$ est la concentration du complexe et $[L]$ est la concentration du catéchol non complexé, à l'équilibre (Figure 12).

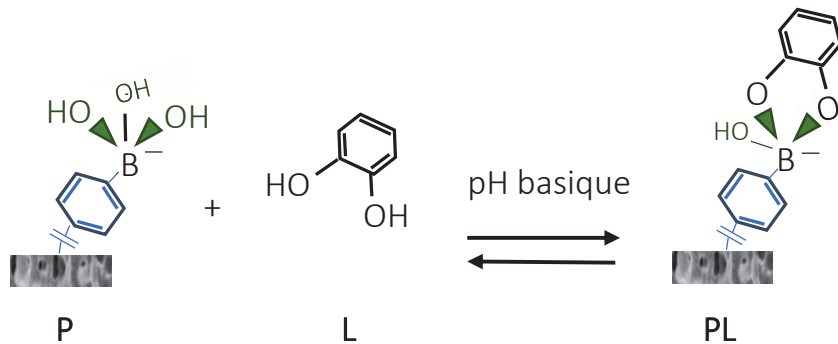


Figure 12. Réaction de complexation de l'APB et le catéchol.

L'expression de la constante de dissociation d'un complexe (K_d) est la suivante :

$$K_d = \frac{[P][L]}{[PL]}$$

Par définition, la concentration totale en site actif $[P_{tot}]$ peut être reliée au K_d par la relation suivante :

$$[P_{tot}] = [PL] + [P] = ([L]_0 - [L]) + \frac{K_d ([L]_0 - [L])}{[L]} = ([L]_0 - [L]) \left(1 + \frac{K_d}{[L]} \right)$$

Les mesures d'absorbance permettent de déterminer la concentration en catéchol libre dans la solution. A l'équilibre, la concentration en catéchol libre $[L]$ est estimée à 33,0 μM . La différence entre la concentration initiale en catéchol et la concentration à l'équilibre ($[L]_0 - [L]$) correspond à la concentration de complexe $[PL]$ de 12,4 μM . En utilisant la valeur de K_d de la littérature ($K_d = 330 \mu\text{M}$), une concentration de site actif $[P_{tot}]$ de 136,1 μM est calculée (dans un volume de solution de 7,3 mL et pour une masse de monolithe de 10,4 mg), soit une quantité de sites actifs de 95,6 μmol d'AAPBA g^{-1} monolithe.

Cette quantité de sites actifs ne représente que 43 % du nombre de sites total déterminé par ATG (221,3 μmol AAPBA g^{-1} de monolithe). Cela signifie qu'une partie des sites greffés en surface, n'est pas active en termes de reconnaissance, probablement pour des raisons d'encombrement stérique.

5.1.2.2. Caractérisation en capillaire

L'analyse *in-situ* dans un capillaire de quelques dizaines de microns de diamètre interne est limitée par la faible quantité de matière disponible (quelques centaines de microgrammes) et par l'accès au cœur du capillaire. Cette caractérisation en capillaire est néanmoins nécessaire car même si les matériaux synthétisés en batch sont proches des matériaux obtenus en format capillaire, il subsiste toujours des différences qui, potentiellement, peuvent expliquer des variations en termes de propriétés. Par exemple, il est reconnu que la synthèse des monolithes en milieu confiné (comme dans un capillaire de 75 μm de diamètre interne) conduit à des structures morphologiques sensiblement différentes. L'analyse par microscopie électronique montre ainsi que le mélange réactionnel conduisant en capillaire à la structure décrite précédemment (avec des diamètres de pores de 2 μm) produit en batch des structures légèrement plus petites (diamètre de pore de 1,2 μm environ). Cet écart est attribué, dans notre cas, à l'encreage du monolithe à la paroi du capillaire, évitant un phénomène de contraction de la structure (synérèse). La mise en forme du monolithe (en poudre libre en solution ou confiné dans un tube capillaire) a également un impact sur la disponibilité des réactifs lors des réactions de greffage. En batch, le volume réactionnel n'est pas limité. Il est possible de travailler avec un large excès de réactif sous agitation. Par contre, en capillaire, le volume de solution de greffage est limité au volume mort (dans le cas d'un greffage en mode statique) et des solutions concentrées doivent être utilisées. Dans le cas d'un greffage en mode dynamique (sous circulation de mélange réactionnel), le temps de percolation/greffage peut être ajusté. Ces différences justifient, au même titre que les différences structurales, de caractériser les propriétés des monolithes greffés *in-situ*.

Des colonnes monolithiques photopolymérisées AAPBA ont été testées par analyse frontale avec le catéchol à des concentrations allant de 5 à 100 mg L^{-1} (45-908 μM) (Figure 13).

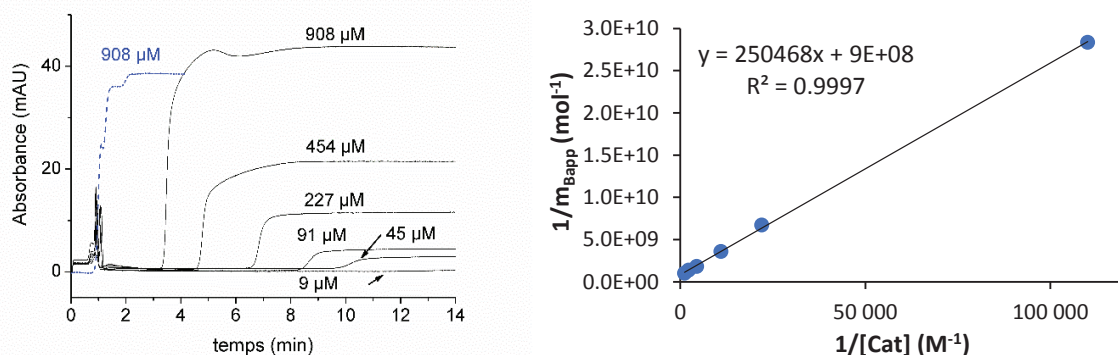


Figure 13. A gauche l'analyse frontale à plusieurs concentrations du catéchol et de l'hydroquinone et à droite $1/m_{\text{Bapp}}$ vs $1/[\text{catéchol}]$ avec un monolithe fonctionnalisé AAPBA par photopolymérisation.

Les courbes de percée (Figure 13A) montrent la dépendance du temps de percée du catéchol au détecteur en fonction de la concentration en catéchol dans la solution de percolation, caractéristique d'un mécanisme d'affinité. Afin d'estimer la spécificité de l'interaction, une analyse a été réalisée avec l'hydroquinone (courbe en bleu), isomère non-cis-diol du catéchol. Le palier de l'hydroquinone est observé au temps mort (environ 1 minute), alors que pour la même concentration (908 μM) le palier du catéchol apparaît après 3 minutes. Le tracé de $1/m_{\text{Bapp}}$ en fonction de $1/[\text{catéchol}]$ conduit à une droite de coefficient de corrélation supérieur à 0,99. Cette droite permet d'estimer un nombre de sites actifs (m_{B}) de 0,43 nmol cm^{-1} (soit 13,90 $\mu\text{mol g}^{-1}$ pour une masse volumique de monolithe de 0,7 g mL^{-1}), ainsi que la valeur du K_{d} de 290 μM . Ces résultats sont présentés dans les Tableaux 2 et 5.

La comparaison des valeurs de nombre de sites actifs d'AAPBA déterminées en batch (95,6 $\mu\text{mol g}^{-1}$) et en capillaire (13,9 $\mu\text{mol g}^{-1}$) montre une différence de 85 %. Cette différence de sites actifs peut être attribuée à l'excès du monomère AAPBA en batch puisqu'il n'y a pas de limitation de volume dans ce cas. En effet, le rapport surface de monolithe sur volume de capillaire n'est pas en faveur de la réaction en capillaire. Afin de limiter qu'un réactif soit limitant, la photopolymérisation est réalisée en travaillant avec des solutions concentrées en AAPBA, mais ces réactifs ont une limite de solubilité limitant la concentration en AAPBA à 100 mM.

Néanmoins, les procédures d'analyse en capillaire semblent cohérentes par rapport aux analyses en batch. Pour simplifier les analyses lors de la comparaison entre les différentes approches, seules les caractérisations par chromatographie d'affinité seront considérées par la suite.

De manière générale, malgré les avantages de rapidité, efficacité et polyvalence de la photopolymérisation, quelques inconvénients pratiques concernent la perte d'efficacité de la colonne due à l'encombrement stérique des mésopores quand la polymérisation conduit à des revêtements trop importants et le bouchage des colonnes lorsque les polymères formés en solution augmentent la viscosité du milieu. Ainsi, des procédés de photogreffage ont été également évalués.

5.1.3. Photogreffage par chimie-click « thiol-ène » et « ène-thiol »

La "chimie-click" fait référence à un ensemble de réactions sélectives puissantes pour la synthèse rapide de nouveaux composés via des liaisons hétéroatomes (C-X-C). De telles réactions donnent des rendements élevés et peuvent être réalisées dans des solvants variés et à température ambiante. En raison de ces nombreux avantages, la « click-chemistry » s'est étendue aux sciences séparatives et plus

particulièrement, à la fonctionnalisation des matériaux chromatographiques au cours des 10 dernières années [63–68].

Trois voies de chimie click ont principalement émergé : la cyclo-addition d'alcyne-azide catalysée par le cuivre (I) (CuAAC), les réactions « thiol-ène » et réaction de Diels-Alder. Les deux premières approches sont les plus communément utilisées pour la modification de surface de matériaux chromatographiques. Cependant, la CuAAC peut présenter quelques inconvénients tels que l'effet toxique du cuivre (I) pour les organismes vivants et la nature explosive des azides ainsi que des sources potentielles d'interférences en chromatographie. En effet, la rémanence des métaux sur les phases stationnaires [69] ainsi que la nature du linker issu de la réaction (classiquement un groupement triazole est formé lors de l'addition d'un réactif porteur d'une fonction azide sur un réactif porteur d'une fonction alcyne) sont à l'origine d'interactions chromatographiques secondaires. La réaction de photoclick thiol-ène conduit, quant à elle, à la formation d'une liaison au travers un hétéroatome. Comme le montre la figure suivante, il est possible d'envisager deux approches pour le greffage d'un groupement fonctionnel sur la surface. La version « ène-thiol », définie dans ce manuscrit comme la réaction d'un dérivé thiolé en solution sur un support monolithique pré-activé avec des fonctions vinyliques, et l'alternative « thiol-ène » qui permet de faire réagir des réactifs porteurs d'une fonction vinylique sur des supports activés par un thiol.



Figure 14. Deux approches possibles pour le greffage d'un groupement fonctionnel par photo-click thiol-ène.

Les deux approches ont été validées lors d'une précédente thèse [70] pour la fonctionnalisation de monolithes de silice avec différents groupements fonctionnels (longues chaînes alkyl (C₁₈), groupements ioniques (sulfonates) et zwitterioniques). Il a été montré que ces réactions de photogreffage sont rapides et quantitatives. L'avantage, comme mentionné ci-dessus, est que les réactifs ne polymérisent pas en solution évitant ainsi les problèmes de bouchages de colonne et de contrôle de l'épaisseur de couches lorsque la concentration en monomère est trop importante par exemple. Par conséquent, ces réactions de photoclick ont été envisagées en tant que voie de greffage de phénylboronates sur monolithes de silice.

D'un point de vue réactionnel, la réaction de photoclick tire profit de l'activation spécifique du groupement thiol en présence d'un photo-initiateur. Différents mécanismes sont décrits en fonction du

type d'initiateur (type I ou type II). Cependant le point commun concerne l'abstraction de l'hydrogène du thiol formant un radical thiyle. C'est ce radical qui, ensuite, attaque le groupe vinyle, conduisant à une liaison thio-éther stable. Puisqu'un groupe vinyle est capable de réagir seulement avec deux monomères thiols, cette réaction est considérée comme une réaction de greffage et non comme une réaction de polymérisation [69,55,71].

Etant donné que les dérivés permettant le greffage selon les deux voies de réaction sont disponibles commercialement (l'acide 4-mercaptophénylboronique (MPBA) et l'AAPBA), les deux voies de fonctionnalisation de support monolithique par réaction photoclick ont été évaluées.

5.1.3.1. Voie « ène-thiol »

La version "ène-thiol" implique le greffage de réactif thiolé en solution sur des supports porteurs de fonctions vinyliques. Cette version est utilisée pour l'immobilisation directe de biomolécules (enzymes, protéines, anticorps).

D'un point de vue méthodologique, la surface du monolithe de silice doit, dans un premier temps, être modifiée par un silane porteur de fonction vinyle. Cette étape est réalisée en faisant réagir le vinyltriméthoxysilane (VTMS) sur les silanols de surface. Ensuite, l'acide 4-mercaptophénylboronique (MPBA) est introduit dans la colonne en présence d'un initiateur et activé par irradiation UV (365 nm) (Figure 15). La benzophénone (BP) a été choisie en tant qu'initiateur. Cette initiateur de type II abstrait l'hydrogène du thiol [55,69,72,73] pour former un radical thiyle.

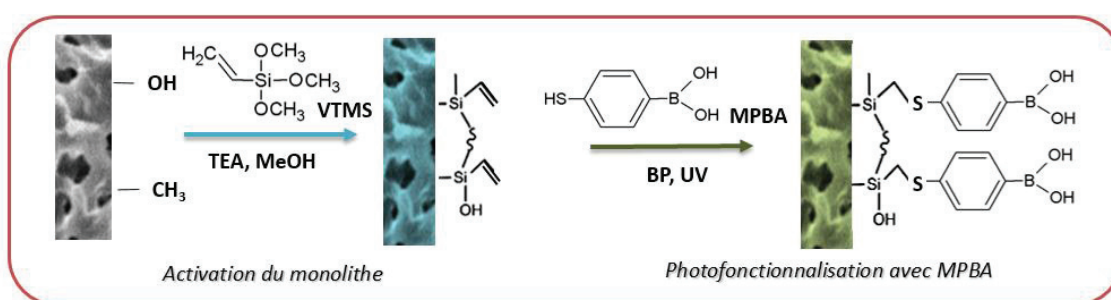


Figure 15. Réaction de photogreffage du MPBA par méthode « ène-thiol ».

Les capillaires monolithiques greffés MPBA ont été caractérisés par analyse frontale. Si de l'affinité a pu être mise en évidence, les résultats d'analyse frontale ont montré une perte continue de sites actifs MPBA au cours de son utilisation, perte accrue pendant le rinçage du monolithe avec du solvant organique.

Cette perte progressive de sites actifs révèle soit un greffage non covalent (adsorption du dérivé) soit un greffage peu stable. Des analyses par RMN du solide (^{13}C) ont été réalisées sur du monolithe en batch afin de confirmer cette hypothèse.

Comme illustré dans la Figure 16, le spectre du monolithe vinylicé (en rouge) présente des signaux à -5, 50, 127 et 137 ppm attribués respectivement aux groupements $-\text{Si}-\underline{\text{C}}\text{H}_3$ du MTMS présent dans le squelette du monolithe, $-\text{Si}-\underline{\text{O}}-\underline{\text{C}}\text{H}_3$, $-\text{Si}-\underline{\text{C}}\text{H}=\text{CH}_2$ et $-\text{Si}-\text{CH}=\underline{\text{C}}\text{H}_2$ du VTMS greffé en surface. La réaction du MPBA sur ces groupements vinylics de surface devrait modifier les signaux spécifiques de la fonction vinyle, conjointement à l'apparition de signaux spécifiques à la liaison thio-éther formée : $-\text{Si}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{Aromatique}$ à environ 17 ppm, $-\text{Si}-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{S}-\text{Aromatique}$ à 19 ppm ainsi que les carbones du cycle aromatiques (à 122 et 138 ppm). Cependant la comparaison des deux spectres (avant et après photoclick) montre qu'il n'y a pas de différence significative et confirme que le greffage n'est pas covalent. Des analyses en spectrométrie Raman ont confirmé ces résultats.

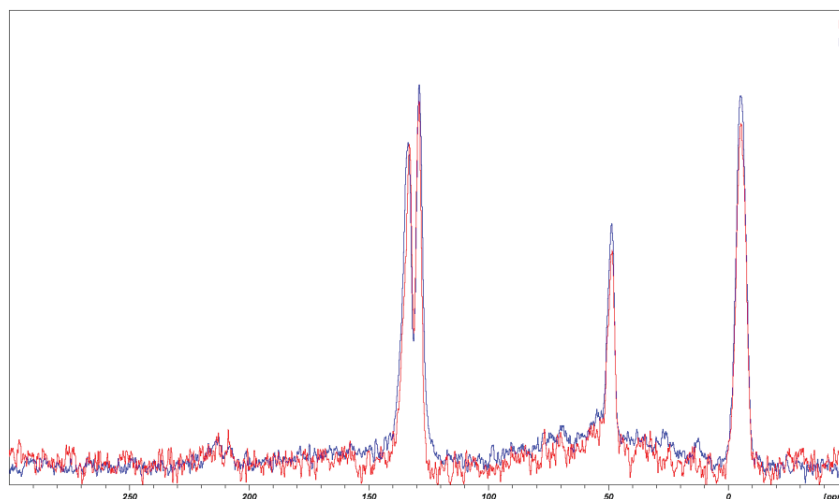


Figure 16. Superposition des spectres ^{13}C CPMAS : *monolithe classique greffé*, *monolithe classique*

Ainsi, l'ensemble de ces expériences a montré que le greffage par photoclick chemistry du MPBA sur un monolithe activé vinyl n'est pas efficace même si les supports présentent une activité de reconnaissance non négligeable à l'issue du greffage. Cette reconnaissance est probablement liée à des molécules de MPBA adsorbées à la surface du monolithe vinyl : si le monolithe est rincé de façon prolongée avec de l'acétonitrile, le phénomène de reconnaissance ne se produit plus, suite à la désorption du MPBA.

L'hypothèse formulée pour expliquer l'absence de réactivité est reliée à la conjugaison des doublets non-liants du soufre avec les doubles liaisons du groupement phényle, qui diminue la réactivité du dérivé thiolé, ce qui entrave la réaction du dérivé avec le groupement vinyle sur le support monolithique. La

synthèse d'un nouveau dérivé de l'acide phénylboronique avec un groupement thiol plus éloigné du noyau aromatique a ainsi été considérée. L'acide 3-(3-mercaptopropanamide) phénylboronique (MPPBA) a été synthétisé en collaboration avec M. Lei DONG et M. Sébastien VIDAL de l'équipe de Chimie Organique 2-Glycochimie de Lyon. Cette synthèse est basée sur une réaction entre un acide 3-aminophénylboronique pinacol ester et un acide activé avec une fonction thiol. Les détails de la synthèse sont décrits dans la partie matériel et méthode.

Afin d'élargir l'étude du greffage par voie « ène-thiol », ce dérivé MPPBA de synthèse a été utilisé pour comparer la réactivité de différents types de double liaison, à savoir les groupements vinyliques du VTMS et les groupements méthacrylate issus de la modification de la surface des monolithes avec le γ -MAPS (Figure 17).

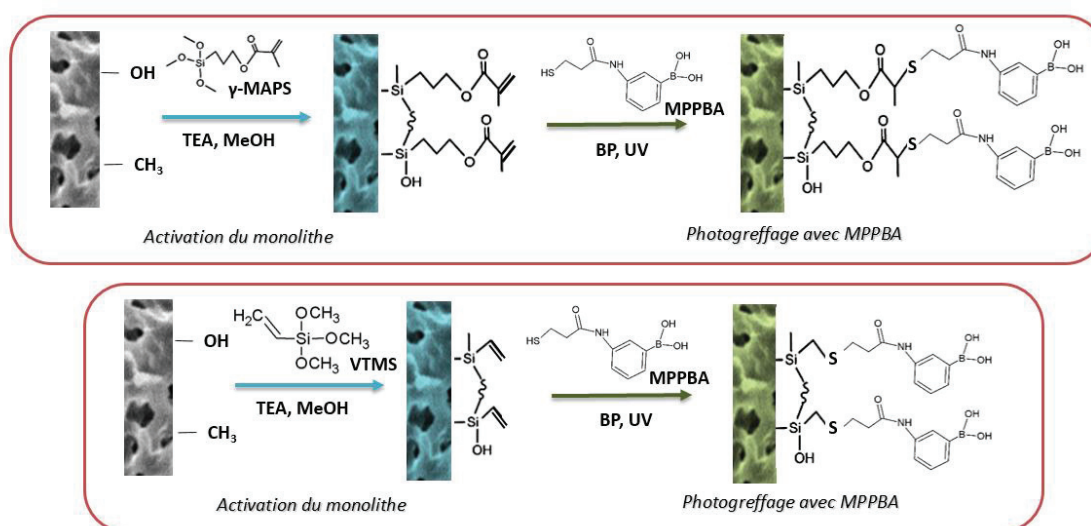


Figure 17. Voies de photogreffage du MPPBA par la méthode « ène-thiol ».

a) Sur support acrylate ; b) sur support vinyle

Les tests par analyse frontale sur monolithes activés au VTMS ont permis d'estimer une quantité de sites actifs de $0,17 \text{ nmol cm}^{-1}$ (soient $5,5 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1}$), valeur deux fois plus élevée que le nombre de sites actifs obtenus sur γ -MAPS ($2,6 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1}$). Cependant, cette valeur reste nettement inférieure à celle obtenue par photopolymérisation de l'AAPBA ($13,9 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1}$) avec une valeur de K_d 3-4 fois supérieure. En d'autres termes, ce mode de fonctionnalisation donne des supports présentant moins de sites actifs et ces sites MPPBA ont moins d'affinité pour le catéchol que les dérivées AAPBA.

La solubilité limitée du MPPBA (évaluée dans de multiples solvants dichlorométhane, méthanol, eau, mélange méthanol / eau et méthanol / eau à pH 9) n'a pas permis de préparer des solutions à des concentrations supérieures à 89 mM (dans le méthanol) pour augmenter la quantité de sites actifs, alors que des travaux antérieurs ont montré qu'une concentration 1 M était optimale [55].

Etant donné les résultats de purification du produit final, il est possible que la solubilité soit affectée par la présence de dimères de MPPBA par formation de liaisons disulfure. L'ajout d'un réducteur (tris (2-carboxyéthyl) phosphine, TCEP) au mélange réactionnel n'a cependant pas amélioré la solubilité du MPPBA. En conséquence, un procédé avec plusieurs étapes de greffage successives à 89 mM a été évalué afin d'augmenter la "couverture" de surface. Une expérience de greffage en 10 étapes successives de chargement de la colonne avec renouvellement de la solution dans le capillaire et irradiation a été réalisée. Dans ces conditions, une quantité plus élevée de sites actifs ($0,27 \text{ nmol cm}^{-1}$, soit $8,7 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1}$) a été atteinte par rapport à un greffage en une étape. Cependant cette valeur reste inférieure à celle obtenue avec l'AAPBA par photopolymérisation. Par conséquent, la version « thiol-ène » a été envisagée.

5.1.3.2. Voie « thiol-ène »

La procédure d'élaboration d'une colonne monolithique de silice fonctionnalisée phénylboronate par chimie click « thiol-ène » est présentée schématiquement Figure 18.

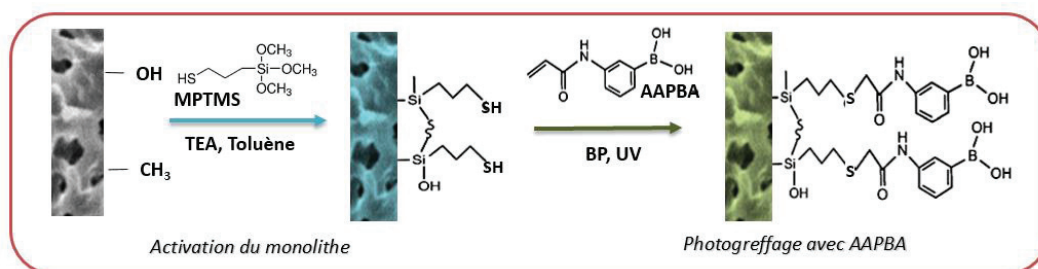


Figure 18. Photogreffage de l'AAPBA par photoclick « thiol-ène ».

Le monolithe de silice est dans un premier temps modifié en surface avec le 3-(mercaptopropyl)triméthoxy silane (MPTS). Ces groupements thiols sont ensuite engagés dans une réaction « thiol-ène » avec l'AAPBA en présence de la benzophénone qui joue le rôle de photoinitiateur. La réaction est initiée par irradiation UV (365 nm). Le protocole de silanisation au MPTS a tout d'abord été optimisé en s'appuyant sur le protocole de silanisation au γ -MAPS. La forte réactivité du MPTS en solution (mélange trouble après une heure à température ambiante) nous a conduits à adapter le protocole de façon à augmenter la stabilité du mélange réactionnel pour limiter la polycondensation du silane en solution. Trois protocoles de silanisation issus de la littérature [54,74–76] ont été évalués pour assurer l'activation de la surface monolithique avec la fonction thiol et *in-fine* déterminer le protocole permettant d'obtenir la plus grande quantité de sites actifs d'AAPBA (protocoles a à c décrit dans la partie matériel et méthode).

Les capillaires silanisés selon les protocoles b et c sont bouchés ou ont vu leur perméabilité fortement diminuée. La présence d'eau ou les traces d'eau dans les solvants utilisées pour ces deux protocoles est supposée favoriser la polycondensation du MPTS en solution, ce qui explique le bouchage des colonnes. Le protocole a, conduit en solvant peu hygroscopique, permet d'éviter ce problème. Ce protocole a donc été choisi pour la suite.

Pour évaluer l'efficacité du procédé de silanisation, les colonnes capillaires ont ensuite été photofonctionnalisées avec l'AAPBA par réaction thiol-ène. Les conditions de photogreffage ont été adaptées des travaux de Marechal et al. [55,71]. Après optimisation de conditions de silanisation et de photogreffage, cette version « thiol-ène » de réaction click permet la préparation de supports monolithiques en capillaire comportant $0,93 \text{ nmol cm}^{-1}$ (soit $30,1 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1}$) de sites actifs caractérisés par un K_d de $280 \text{ } \mu\text{M}$ environ. Cette approche de greffage « thiol-ène » de l'AAPBA permet d'augmenter le nombre de sites actifs d'un facteur 2 par rapport à la photopolymérisation du même dérivé AAPBA. De même que pour la version « ène-thiol » avec le dérivé MPPBA, la réalisation de plusieurs étapes de photogreffage successives (de 1 à 10) a été envisagée pour densifier le greffage (Figure 19).



Figure 19. Variation du m_B en fonction du nombre de greffages successifs de l'AAPBA en mode « thiol-ène ».

Comme proposé par Marechal et al, il est possible d'améliorer la densité de greffage jusqu'à obtenir une moyenne de $1,93 \pm 0,17 \text{ nmol cm}^{-1}$ à partir de 3 étapes de greffage successives, sans changement de la valeur du K_d .

5.1.4. Conclusion sur les procédés de fonctionnalisation des monolithes de silice

La comparaison des critères de performance (m_B et K_d) pour les différentes approches étudiées pour fonctionnaliser des colonnes monolithiques de silice par des acides phénylboroniques est présentée dans le Tableau 2.

Tableau 2. Comparaison du m_B et K_d entre les différents procédés de « thiol-ène ».

Approche	Photopolymérisation	Photoclick "thiol-ène"				Photoclick "ène-thiol"			
Silanisation	γ -MAPS	MPTS				VTMS	γ -MAPS	VTMS	
Nb de greffages	1	1	3	5	10	1	1	1	10
Temps total de fonctionnalisation (h) ^a	4	15	16,5	17,5	20	4	4	4	4
Dérivé greffé	AAPBA	AAPBA				MPBA	MPPBA		
K_d (μ M)	290 (12 %)	288 (19 %)				Pas de greffage	1118	1401	1158
m_B nmol cm ⁻¹	0,43 (14 %)	0,93 (21 %)	1,88	1,79	2,12		0,08	0,17	0,27
m_B μ mol g ⁻¹	13,90	30,07	60,79	57,88	68,55		2,59	5,50	8,73

^a Le temps total comprend : temps de silanisation + temps de photopolymérisation ou photoclick

Il est important de noter qu'il n'y a pas de différence significative entre les K_d (AAPBA/catéchol) obtenus par photopolymérisation et par photogreffage, ce qui démontre que la constante d'affinité ne dépend que du dérivé d'APBA, du composé cis-diol choisi, et des conditions d'analyse, et que le mode de greffage n'a pas d'incidence sur l'affinité du support qui en résulte. La quantité de sites actifs obtenue en photogreffage thiol-ène est supérieure (à minima d'un facteur 2) à celle obtenue par photopolymérisation, mettant en évidence, un des avantages de la chimie click par rapport à la photopolymérisation. En plus de sa plus grande efficacité, le photogreffage « thiol-ène » n'entraîne pas de diminution de la perméabilité comme observé en photopolymérisation. Quant au photogreffage « ène-thiol » il conduit à des résultats non concluants en termes de quantités de sites actifs et d'affinité (Valeur élevée de K_d).

5.2. Synthèse et évaluation de colonnes monolithiques organiques poly(GMA-co-EDMA) d'affinité boronate

La plupart des colonnes monolithiques organiques fonctionnalisées APB destinées à la chromatographie d'affinité sont synthétisées par copolymérisation d'un dérivé d'acide phénylboronique avec un cross-linker comme l'éthylène diméthacrylate ou le N,N'-méthylènebis-acrylamide. [22–

24,28,29,31,32,50,51,53,77–79]. Cependant, la mise en œuvre de dérivés APB différents requiert une ré-optimisation complète et difficile du protocole de synthèse. Une alternative plus simple à mettre en place consiste à utiliser un monolithe organique dit « générique », porteur en surface de fonctions chimiques réactives ou activables qui pourra être modifié à façon. Les monolithes poly(GMA-co-EDMA), dont la synthèse a été proposée par Bruchet et al. [80] répondent à cette attente. Ils sont préparés *in-situ* dans le capillaire, à partir d'un mélange réactionnel contenant un monomère (GMA), un agent de réticulation (EDMA), un solvant porogène et un photoinitiateur. Leur synthèse est initiée par irradiation UV (30 minutes) et peut être localisée en utilisant des masques UV.

Ce monolithe a été ensuite fonctionnalisé selon plusieurs voies de greffage. Étant donnée la présence du groupements époxy sur le monolithe poly(GMA-co-EDMA), il est possible de fonctionnaliser la surface avec de dérivés d'APB par le biais de réactions époxy-amine ou aldéhyde-amine (méthode base de Schiff) [9,10,27,81–92]. Pour ces deux voies de greffage un dérivé aminé de l'APB est nécessaire, l'acide 3-aminophénylboronique(APBA).

5.2.1. Présentation des propriétés des monolithes poly(GMA-co-EDMA)

Le monolithe poly(GMA-co-EDMA) obtenu par photopolymérisation est constitué d'agglomérats très denses de nucléis en globules d'une taille d'environ 1 μm et de macropores d'environ 1 μm (Figure 20) . Ce monolithe se caractérise par une perméabilité moyenne de $5 \times 10^{-14} \text{ m}^2$, typique des monolithes organiques, et par une porosité totale (ϵ_T) de 0,86. La masse volumique du monolithe a été estimée à $0,32 \text{ g cm}^{-3}$.

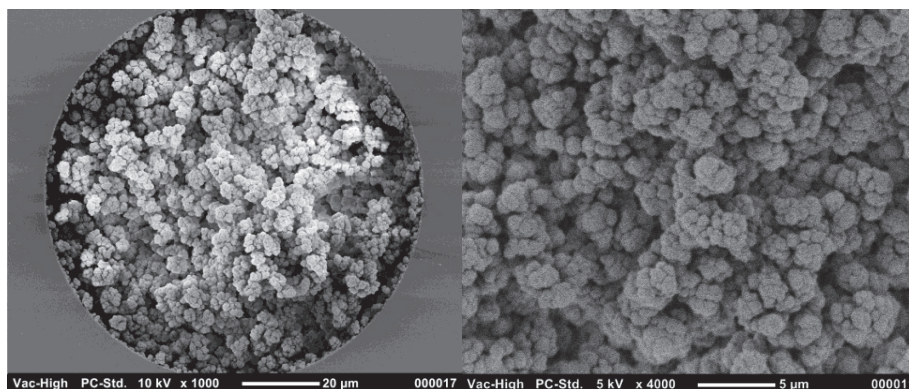


Figure 20. Photographies MEB du monolithe poly(GMA-co-EDMA) synthétisé en colonne capillaire

La surface spécifique développée par ces matériaux est relativement faible, environ $10 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ (déterminée par adsorption/désorption d'azote). Contrairement aux monolithes de silice, ces matériaux ne possèdent pas de mésoporosité. L'efficacité optimale ($H_{\min} = 10 \text{ }\mu\text{m}$) est obtenue pour une vitesse optimale de phase mobile de $0,5 \text{ mm s}^{-1}$.

5.2.2. Fonctionnalisation des monolithe poly(GMA-co-EDMA) par réaction époxy-amine

La réaction époxy-amine consiste en la formation d'une liaison covalente entre une amine (primaire ou secondaire) et un groupement époxyde (Figure 21). Cette réaction est couramment utilisée pour la fixation de protéines sur des matériaux fonctionnalisés par des époxydes [9,83,84,87–92]. Le couplage de dérivés phénylboronates par cette voie sur support monolithique a rarement été décrite dans la littérature [27,82,89].

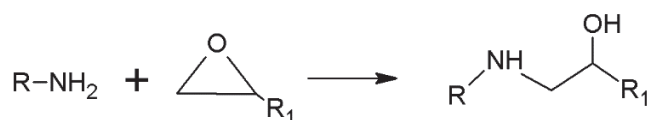


Figure 21. Réaction époxy-amine avec une amine primaire.

De façon usuelle, l'immobilisation de protéines sur support époxy est réalisée à pH supérieur à 7 en solution tampon concentrée (de l'ordre de la centaine millimolaire). La stabilité des protéines étant fonction de la température les couplages sont réalisés à $28 \text{ }^\circ\text{C}$. La durée de ces réactions s'étend souvent sur des périodes supérieures à 24h avec des concentrations de protéines de l'ordre du μM [92,93]. D'un point de vue chimique, l'utilisation de pH basique déplace l'équilibre de dissociation des fonctions amines vers la forme déprotonée, qui est la forme réactive vis-à-vis des groupements époxydes. L'augmentation de la concentration et/ou de la température de réaction accroît la cinétique réactionnelle mais la durée de réaction reste le facteur prépondérant sur les taux de greffage [94]. L'efficacité du greffage est également améliorée avec un renouvellement de la solution de greffage en continu, c'est-à-dire lorsque le greffage est réalisé en mode dynamique (sous pression) plutôt qu'en mode statique. Cependant, une adaptation de ces conditions par rapport aux petites molécules, et plus particulièrement aux acides phénylboroniques, est nécessaire.

Pour cette étude du couplage d'un dérivé aminé sur support époxy, l'acide 3-aminophénylboronique (APBA) a été choisi. Le schéma réactionnel est présenté dans la Figure 22.

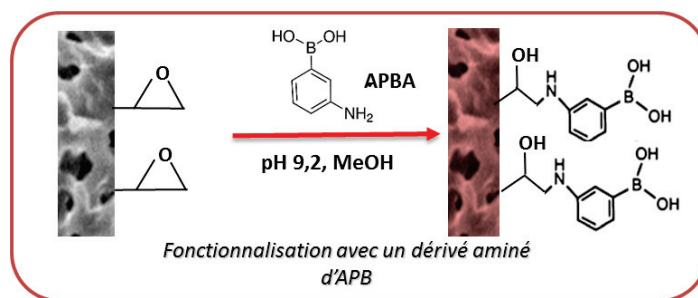


Figure 22. Procédé de fonctionnalisation du monolithe poly(GMA-co-EDMA) avec l'APBA par réaction époxy-amine.

Les couplages de dérivés aminés d'acide phénylboronique sur support époxyde décrits dans la littérature utilisent des solutions concentrées (400 mM) à haute température (jusqu'à 60 °C) sur des temps de réaction allant de 20h à 72h [27,82].

Deux procédures de greffages inspirées de ces conditions ont été testées. La première procédure (mode dynamique) correspond à une réaction conduite en percolant en continu un mélange réactionnel à 60 μM en APBA dans la colonne. La deuxième procédure est réalisée en remplissant la colonne avec un mélange réactionnel beaucoup plus concentré en APBA (621 μM) et en laissant la réaction se faire en statique. Pour les deux procédures, la réaction est conduite à 60 °C pendant 62 h.

La Figure 23 compare les résultats de quantité de sites actifs en fonction du protocole de greffage. Bien que la solution soit renouvelée en permanence pour la procédure en mode dynamique, le nombre de sites actifs déterminé par analyse frontale avec le catéchol en mode dynamique, 0,06 nmol cm^{-1} (4,7 $\mu\text{mol g}^{-1}$), est significativement plus faible que celui estimé après la procédure de greffage en mode statique, 0,16 cm^{-1} (12,1 $\mu\text{mol g}^{-1}$), avec une solution beaucoup plus concentrée. Avec cette durée de greffage, la concentration de la solution en APBA est le facteur prépondérant. Il n'est cependant pas envisageable de travailler avec des solutions plus concentrées en APBA en raison de sa solubilité limitée dans la solution de réaction. En comparaison avec le nombre de sites obtenus sur monolithe de silice en utilisant l'AAPBA (photopolymérisation (0,43 nmol cm^{-1} , soit 13,9 $\mu\text{mol g}^{-1}$) ou photogreffage « thiol-ène » (0,93 nmol cm^{-1} , soit 30,1 $\mu\text{mol g}^{-1}$), le couplage sur support poly(GMA-co-EDMA) par voie époxy-amine conduit à des densités massiques ou volumiques de dérivé phénylboronate immobilisé plus faibles. Cette plus faible quantité de sites actifs est probablement liée à la faible surface spécifique du monolithe poly(GMA-co-EDMA) (4 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$) par rapport à celle des monolithes de silice (500 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$).

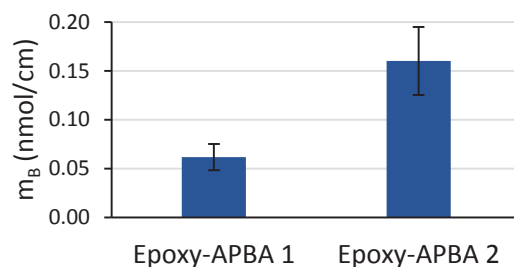


Figure 23. Effet du mode de greffage et de la concentration de l'APBA sur la quantité de sites actifs.
 Epoxy-APBA1 : mode dynamique et [APBA]= 60 μ M ; Epoxy-APBA2 : mode dynamique et [APBA]= 621 μ M

L'affinité APBA-Catéchol est caractérisée par une valeur de K_d de 224 μ M (CV = 18 %). Dans les conditions de reconnaissance utilisées pour caractériser les colonnes de silice (Tampon phosphate 15mM (pH 8,5) avec 20 % MeOH), les colonnes poly(GMA-co-EDMA) greffées APBA par voie époxy-amine ne présentent pas d'interactions non-spécifiques (évalué avec l'hydroquinone). Cependant, et contrairement à ce qui a été précédemment observé sur les monolithes de silice fonctionnalisés, la rétention de l'hydroquinone devient significative en absence de solvant organique dans le milieu de reconnaissance. Ainsi, l'utilisation de cette phase stationnaire comme support d'affinité boronate nécessite l'ajout de solvant organique pour éviter les interactions secondaires, interactions liées au caractère apolaire du support monolithique.

5.2.3. Fonctionnalisation des monolithes poly(GMA-co-EDMA) par réaction aldéhyde-amine (formation d'une base de Schiff)

Le couplage d'une amine sur un aldéhyde conduit à la formation d'une base de Schiff (imine substituée) (Figure 24). De même que pour la réaction époxy-amine, cette voie de greffage a été généralement utilisée pour la fixation de grosses molécules comme les protéines pour des applications comme l'analyse des interactions drogues-protéines et la préparation de support de séparations chirales [85,86,90,92,93,95,96].

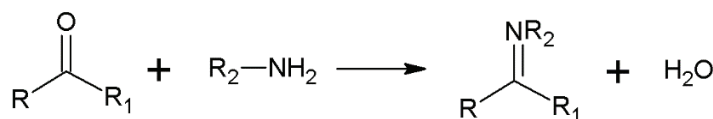


Figure 24. Réaction de base de Schiff avec une amine primaire.

Cette liaison doit ensuite être réduite pour former une liaison covalente C-N plus stable chimiquement.

A notre connaissance, il n'y a pas d'exemples, dans la littérature, de procédure de fonctionnalisation rapportant le couplage d'un dérivé aminé simple d'acide phénylboronique sur support (monolithique) fonctionnalisé avec des groupements aldéhyde. Afin de pouvoir comparer ce mode de couplage avec la méthode décrite précédemment, l'acide 3-aminophénylboronique a été utilisé. Par ailleurs, les conditions de greffage usuelles de protéines ont été le point de départ pour adapter et établir des conditions de greffage du monolithe poly(GMA-co-EDMA) avec l'APBA.

La préparation de support monolithique avec des fonctions aldéhyde ainsi que le couplage aldéhyde-amine sont présentées schématiquement dans la figure suivante :

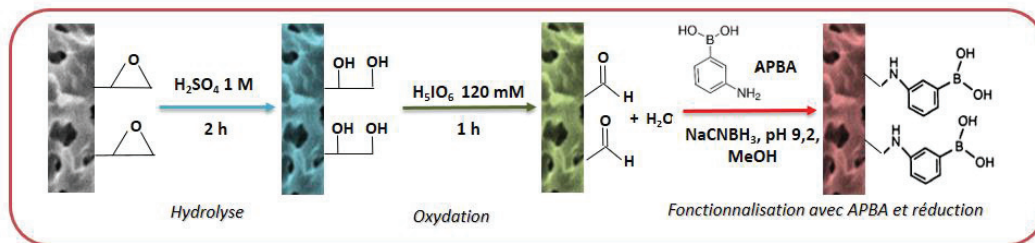


Figure 25. Procédé de fonctionnalisation du monolithe poly(GMA-co-EDMA) avec l'APBA par réaction de base de Schiff après ouverture des époxy en diols et oxydation des diols en aldéhyde.

Le support de base est le monolithe poly(GMA-co-EDMA). Les groupements époxy sont, dans une première étape, hydrolysés en milieu acide. Les diols ainsi formés sont oxydés en aldéhyde en présence d'acide périodique. Le couplage proprement dit est réalisé avec l'APBA. Les monolithes greffés ont été testés en analyse frontale avec des concentrations de catéchol entre 5 et 75 mg L^{-1} (45-681 μM).

La modification de surface des cycles époxy en aldéhydes s'accompagne de la présence significative d'interactions secondaires sur le monolithe. Ces interactions non-spécifiques compliquent la détermination du K_d par analyse frontale. De façon à s'affranchir de ces interactions, les tests d'affinité ont été réalisés en ajoutant du méthanol. Différents pourcentages de méthanol ont été testés et la valeur de 40% de MeOH est le meilleur compromis afin d'éliminer un maximum d'interactions non-spécifiques sans affecter de façon significative l'affinité. La détermination du nombre de sites actifs (avec 40% de MeOH) donne une valeur de 0,26 nmol cm^{-1} (19,6 $\mu\text{mol g}^{-1}$) et une valeur de K_d de 465 μM . La quantité de sites actifs est supérieure à celle obtenue par couplage direct de l'APBA sur le monolithe initial. Cette différence de nombre de sites actifs peut trouver une explication dans la différence de réactivité des groupes de surface.

5.2.4. Greffage haute densité avec un dérivé d'acide phényboronique d'affinité supérieure (DFFPBA)

Compte tenu des faibles densités de sites actifs obtenues avec les monolithes organiques et les voies de couplage classiques, des voies alternatives de greffage permettant d'obtenir une plus grande quantité de sites actifs, avec des dérivés phénylboronates simples ou avec des dérivés d'affinité supérieure ont été explorées. Ces voies alternatives consistent, d'une manière générale, à introduire un « intermédiaire branché » sur le support afin de multiplier les sites d'ancrage. Ces voies actuellement décrites dans la littérature sont :

- 1) L'introduction de brosses polymères par polymérisation radicalaire par transfert d'atome (ATRP) initiée depuis la surface [37]
- 2) L'introduction de dendrimères par l'addition de Michael et ensuite, une réaction de base de Schiff pour introduire le dérivé d'APB [17,25].
- 3) L'introduction du PEI branché sur un support époxy ou aldéhyde et ensuite greffage époxy-amine [95] ou aldéhyde-amine [19,21] du dérivé de l'APB portant une fonction aldéhyde.

Le Tableau 3 présente un résumé des conditions de fonctionnalisation de chaque voie développée et publiée jusqu'à présent dans la littérature. De manière générale, ces différentes voies de fonctionnalisation sont multi-étapes et chronophages.

Compte tenu de la grande variabilité des résultats en termes de capacité (de $0,1 \mu\text{mol g}^{-1}$ à plus de $300 \mu\text{mol g}^{-1}$) associée à un manque de données sur la surface spécifique de chaque support, il est difficile de conclure quant à l'efficacité relative des différentes procédures de fonctionnalisation.

Si le procédé d'élaboration de brosses de polymères à partir de la surface semble être très efficace en termes de sites actifs, par rapport à la capture de la transferrine (TRF), cette méthodologie reste très difficile à contrôler d'après les auteurs, spécialement pour éviter l'oxydation du Cu(I). De plus, les auteurs n'ont pas réussi à transposer cette approche sur monolithes de silice.

Tableau 3. Résumé de modes de greffage des acides phénylboroniques simples et d'affinité supérieure par introduction des agents de liaison intermédiaires (OVA : ovalbumine ; TRF transferrine, HRP HorseRadish Peroxydase, RNase B : Ribonucléase B)

Mode de greffage	Support	Dérivé d'APB	Nombre d'étapes	Temps (h)	Capacité ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	K_d (μM)	Application	Auteurs
Brosses polymères (ATRP)	Nanocomposites magnétiques (oxyde de graphène)	4-VPBA	3	81	329.9 OVA	-	Glycoprotéines dans le blanc d'œuf	An et al. (2016) [37]
			3	116	676.8 catéchol 771.3 dopamine 770.0 adrénaline	-	Nucléosides dans l'urine	Gao et al. (2015) [25]
Dendrimères	Nanoparticules magnétiques	4-FPBA	2	60	1.75 adénosine 0.41HRP 0.10 TRF	1800 1.0 27.3		Wang et al. (2013) [17]
			2	30	26.5 adénosine 0.35 HRP 0.18 TRF 0.27 RNase B	718 15.2 30.5 74.5		Li et al. (2015) [40]
Linker intermédiaire (EDA)	Colonne monolithique poly(MBAA-co-GMA)	DFFPBA	2	48	102.1 adénosine 0.32 HRP 0.11 TRF 0.26 RNase B	462 0.281 0.444 9.52	Glycoprotéines dans la salive humaine	Li et al. (2017) [19]
			2	62	9.75 adénosine 0.35 HRP 0.28 RNase B	419 0.209 9.97		Li et al. (2018) [21]
Linker intermédiaire (PEI branché)	Nanoparticules magnétiques	3-carboxybenzoboroxole	3	62	0.065 adénosine 0.76 HRP 0.35 TRF	1090 0.512 0.232		Li et al. (2018) [21]

Seuls deux articles, comparent l'apport des dendrimères et des polymères branchés (PEI) comme linkers par rapport à des linkers simples sur un même support. Le premier article [25] propose une illustration de l'apport des dendrimères pour le couplage du 4-FPBA sur des particules de silice mésoporeuse (Figure 27). Si la capacité maximale (de l'ordre de $700 \mu\text{mol g}^{-1}$) n'est indiquée que pour les matériaux avec les dendrimères et pour des petites molécules (pas de comparaison avec le matériau obtenu avec un couplage simple avec une diamine), les auteurs montrent que le gain sur le facteur d'enrichissement obtenu est de 25 à 50 fois supérieur avec les matériaux dendritiques (pour des petites molécules).

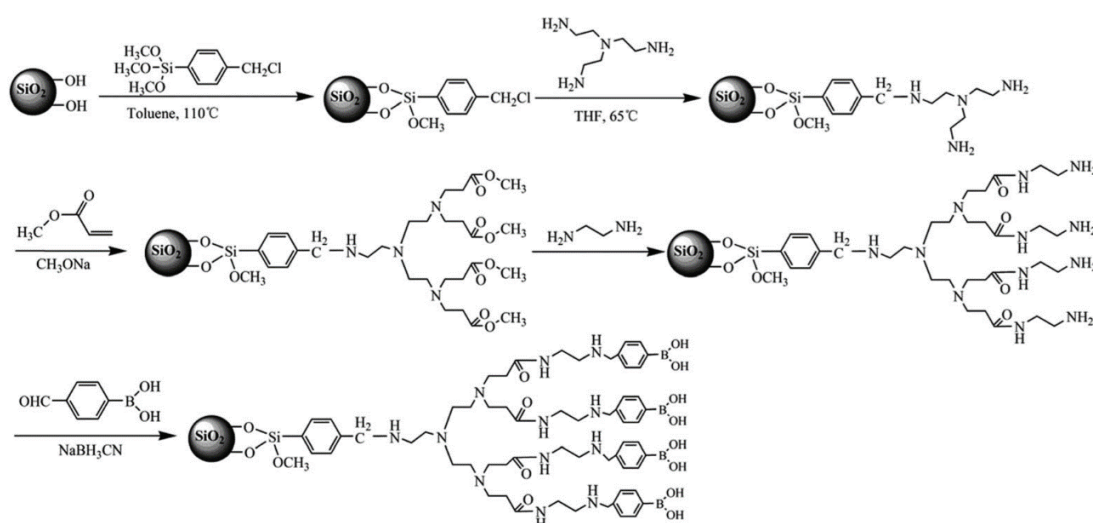


Figure 27. Synthèse de particules de silice fonctionnalisées avec le 4-FPBA sur dendrimères afin d'augmenter la densité de sites boronates [25].

Dans le second article beaucoup plus complet, Li et al décrivent une étude comparative portant sur des colonnes monolithiques fonctionnalisées avec le DFFPBA. Le couplage de la DFFPBA a été réalisé sur un monolithe à base de GMA modifié soit par l'éthylène diamine (appelé EDMC) soit par un PEI branché (monolithe appelé PDMC) [40].

L'affinité d'une petite molécule comme l'adénosine, qui ne s'engage dans une interaction avec le support que par un seul site d'interaction, semble comparable pour les deux supports (K_d comparable). Par contre, la capacité des supports PEI est près de 4 fois plus élevée que celle des supports EDMC pour l'adénosine. Les conclusions sont différentes avec des glycoprotéines (Horseradish peroxydase (HRP, 44 kDa), Transferrine (TRF, 77 kDa) et RNase B (15 kDa)). En effet, les valeurs de capacité mesurées avec les glycoprotéines sont comparables pour les deux types de supports (mais beaucoup plus faibles que

celles mesurées pour les petites molécules) et semblent être liées à la taille des protéines. Pour des petites molécules, la capacité est directement liée au nombre de sites actifs, alors que pour des molécules plus encombrantes, le nombre de sites n'est plus limitant. En termes d'affinité, le couplage par le biais du PEI augmente considérablement l'affinité des protéines glycosylées, et ce d'autant plus que le degré de glycosylation est élevé (diminution du K_d d'un facteur 50 pour la HRP et d'un facteur 8 pour la RNase B). D'après Wang et al. un effet synergique lié à de multiples liaisons établies entre les deux partenaires peut être à l'origine de cette forte affinité encore appelée avidité (Figure ci-dessous) [17].

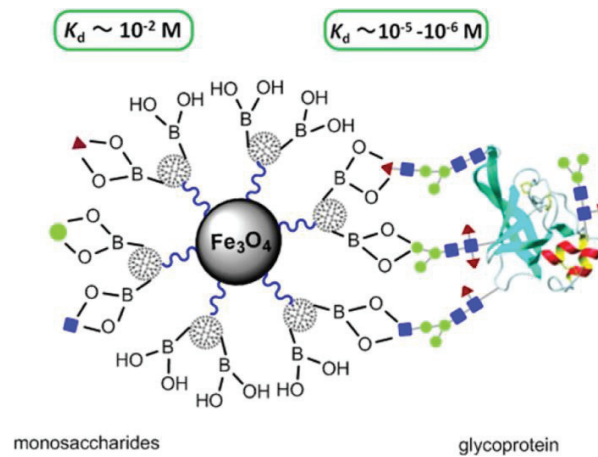


Figure 28. Affinité augmentée par interactions multiples. Adapté de [17].

Le greffage par l'intermédiaire d'un linker branché tel que le polyéthylèneimine (PEI) semble être une méthode simple à mettre en place d'après les nombres d'étapes (2) et le temps total du procédé de fonctionnalisation (60h). Nous nous sommes basés sur ces résultats et la similitude du support monolithique comme point de départ pour l'élaboration de supports combinant une grande densité de sites et l'utilisation d'un dérivé de plus grande affinité. Le protocole de fonctionnalisation initial est basé sur le protocole décrit par Li et al. [40]. Brièvement, le support monolithique époxy est modifié par greffage d'un PEI branché. Le DFFPBA dans une dernière étape réagit sur les fonctions amines de surface. Le schéma réactionnel de fonctionnalisation des monolithes poly(GMA-co-EDMA) avec de la DFFPBA et le PEI en tant que linker intermédiaire est présenté ci-dessous (Figure 29).

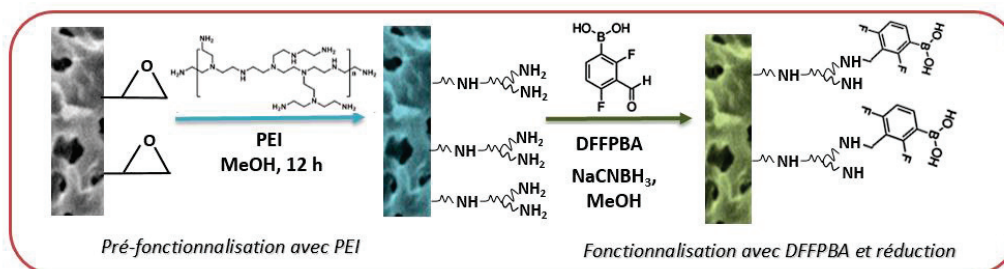


Figure 29. Procédé de fonctionnalisation du monolithe poly(GMA-co-EDMA) avec la DFFPBA par introduction du PEI branché.

Les monolithes fonctionnalisés DFFPBA ont été testés par analyse frontale avec le catéchol à des concentrations entre 200 et 600 mg L⁻¹ (1816-5449 μM) pour différentes concentrations de MeOH (de 0 et 40 %) (Figure 30).

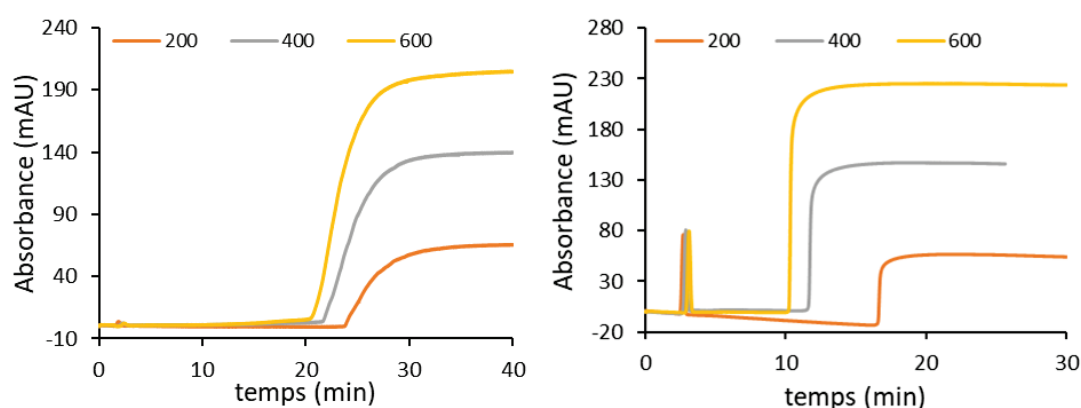


Figure 30. Analyse frontale à plusieurs concentrations du catéchol (mg L⁻¹) avec 0 % (à gauche) et 40 % MeOH (à droite), et monolithe fonctionnalisé DFFPBA via PEI branché.

Sans ajout de méthanol dans le milieu de reconnaissance, les courbes de percée sont atypiques. En effet, la variation de la concentration en catéchol ne se traduit pas par une évolution nette du temps de pallier. Ce comportement est attribué à un phénomène de rétention lié à de l'adsorption non-spécifique. Il est donc impossible sans ajout de modificateur organique d'avoir une capture sélective. Avec 40 % de méthanol dans le tampon de reconnaissance, les courbes de percée retrouvent l'allure attendue pour un mécanisme d'affinité.

Afin de remonter aux valeurs d'affinité et de nombre de sites actifs, il est cependant indispensable, dans ces conditions, de corriger les quantités de catéchol capturé aux différentes concentrations (de l'adsorption estimée avec l'hydroquinone) avant de tracer les courbes $1/m_{Bapp}=f(1/[catéchol])$. Les résultats obtenus se trouvent dans les Tableaux 4 et 5.

Dans ces conditions, les supports PEI-DFFPBA présentent une affinité de 208 μM (K_d) avec le catéchol et un nombre de site de 0,82 mol de site actif par cm de monolithe ce qui correspond à un gain d'un facteur 4 par rapport au même monolithe greffé aldéhyde/amine, avec une durée de greffage moindre (Tableau 4). En ce qui concerne l'affinité, les valeurs de K_d indiquent une affinité similaire tant pour l'APBA (utilisée dans les greffages époxy-amine et aldéhyde-amine) que pour le DFFPBA, ce qui est généralement obtenu lors de la complexation avec les petites molécules [17,19,40].

Tableau 4. Comparaison entre les différentes voies de fonctionnalisation du monolithe poly(GMA-co-EDMA).

Approche	Epoxy-amine	Aldéhyde-amine	Greffage haute densité (PEI)
Nb d'étapes	1	4	3
Temps de greffage	62	28	19
Dérivé greffé	APBA	APBA	DFFPBA
K_d (μM)	224 (18 %)	465 (1 %)*	206*
m_B $\frac{\text{nmol cm}^{-1}}{\mu\text{mol g}^{-1}}$	0,16 (22 %)	0,26 (8 %)	0,82
	12,07	16,62	61,9

* Mesuré avec 40 % MEOH

6. Conclusion sur les procédés de fonctionnalisation de monolithes

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail est résumé dans le tableau suivant qui reprend, pour chaque type de monolithe (silice ou organique) les informations sur les constantes d'affinité mesurées avec le catéchol, le nombre de sites actifs évalué avec le catéchol en chromatographie d'affinité frontale et l'importance relative des interactions secondaires mesurées avec l'hydroquinone, isomère de position du catéchol (Tableau 5). Le tableau 6 regroupe, quant à lui, les résultats de constantes d'affinité et les nombres de sites actifs mesurés avec le catéchol, ou l'adénosine, et la présence ou absence des interactions secondaires trouvés dans la littérature.

Les monolithes de silice, en raison de leur très grande surface spécifique conduisent, quel que soit le mode de greffage (photopolymérisation ou photogreffage) aux plus grandes densités volumiques de sites actifs, avec un maximum de $43,7 \mu\text{mol mL}^{-1}$ (soit $1,93 \text{ nmol cm}^{-1}$ ou $62,4 \mu\text{mol g}^{-1}$) pour un greffage thiol-ène par photoclick avec au moins 3 étapes de greffage. Les résultats obtenus montrent également que l'affinité catéchol/acide boronique est indépendante du mode de greffage. Ces valeurs de quantités de sites actifs sont comparables, voire supérieures à celles rapportées dans la littérature pour les supports monolithiques fonctionnalisés avec des dérivés simples de l'acide phénylboronique et avec des procédés classiques, tels que la polymérisation radicalaire *in-situ* ou la synthèse one-pot. Néanmoins, la fonctionnalisation via photopolymérisation et/ou thiol-ène, offre l'avantage d'être rapide, localisable tout en minimisant la présence d'interactions secondaires.

La mise en œuvre des monolithes organiques, caractérisés par des surfaces spécifiques beaucoup plus faibles que les monolithes de silice, a été envisagée en raison de leur plus grande résistance physicochimique aux pH extrêmes. Compte tenu de leur faible surface spécifique, le couplage simple d'un dérivé phénylboronique par couplage époxy-amine ou aldéhyde-amine a conduit à des faibles densités volumiques de greffage ($3 - 6 \mu\text{mol mL}^{-1}$). Seule la mise en œuvre d'un couplage amplifié à l'aide d'un linker branché (le polyéthylène imine ou PEI) a permis d'augmenter la densité volumique de greffage jusqu'à $18,6 \mu\text{mol mL}^{-1}$ (soit $0,82 \text{ nmol cm}^{-1}$ ou $61,2 \mu\text{mol g}^{-1}$) sans toutefois atteindre les densités mesurées sur la silice. De plus, l'évaluation avec un isomère non-cis diol du catéchol (hydroquinone) a montré l'existence non négligeable d'interactions non-spécifiques avec le support, interactions qui peuvent être néanmoins minimisées en ajoutant 40% de méthanol dans le solvant de reconnaissance sans altérer de façon significative l'affinité de reconnaissance.

Tableau 5. Résultats de l'analyse frontale de monolithes d'affinité boronate développés dans ce travail.

Voie de fonctionnalisation	Support	Dérivé utilisé	K _d (μM)	m _B		Interactions secondaires
				nmol cm ⁻¹	μmol g ⁻¹	
Directe	Photopolymérisation N=1	AAPBA	290	0,43	13,9	9,7
	Thiol-ène N≥3	AAPBA	288	0,93	30,1	21,1
	Epoxy-amine	APBA	224	1,93	62,4	43,7
Haute densité	Aldéhyde-amine	APBA	465	0,16	12,1	3,6
	Via PEI	DFFPBA	206	0,26	19,6	5,9
				0,82	61,9	18,6

Tableau 6. Résultats de K_d, capacité et interactions secondaires des supports boronates développés dans la littérature.

Voie de fonctionnalisation	Support	Dérivé utilisé	K _d (μM)	m _B		Interactions secondaires	Réf.
				μmol g ⁻¹	μmol mL ⁻¹		
One-pot	Colonne monolithique hybride silice-AAPBA	AAPBA	-	-	49,5	Oui	[29]
One-pot	Colonne monolithique hybride silice-VPBA	VPBA	-	-	10,6	Oui	[31]
Aldéhyde-amine	Nanoparticules magnétiques Fe ₃ O ₄	4-FPBA	-	66,0	-	-	[13]
Polymérisation <i>in-situ</i>	Colonne monolithique poly(AAPBA-co-EDMA)	AAPBA	-	79,9	-	Oui	[28]
Polymérisation <i>in-situ</i>	Capillaire monolithique poly(VPBA-co-MBAA)	VPBA	-	-	9,6	Oui	[51]
Polymérisation <i>in-situ</i>	Capillaire monolithique poly(VPBA-co-EDMA)	VPBA	-	-	10,8	Oui	[50]
ATRP + chimie clic Via dendrimères	Silice	AAPBA	-	513,6	-	-	[41]
	Particules de silice	4-FPBA	-	676,8	-	-	[25]
Haute densité/ affinité supérieure	Via PEI	3-carboxybenzoboroxole	1090	0,07 ^a	-	-	[21]
	Via dendrimères	Nanoparticules magnétiques	1800	1,8 ^a	-	-	[17]
Epoxy-amine (EDA intermédiaire) ^b Via PEI	Nanoparticules magnétiques	DFFPBA	419	9,8 ^a	-	Oui	[19]
	Colonne monolithique poly(MBAA-co-GMA)	DFFPBA	718	26,5 ^a	-	-	[40]
			462	102,1 ^a	-	-	

^a Analyte utilisé: Adénosine

Les résultats publiés dans la littérature concernant les modes de greffages haute densité ou avec des dérivés d'affinité supérieure sont difficilement comparables compte tenu de la diversité des supports utilisés. En général, les supports qui offrent les plus grandes densités de sites actifs ($513,6$ et $676,8 \mu\text{mol g}^{-1}$), sont ceux à base de silice [25,41] ce qui n'est sans doute pas exclusivement dû à la fonctionnalisation via ATRP et dendrimères : la surface spécifique élevée de la silice explique aussi au moins partiellement ce résultat.

La fonctionnalisation via PEI-DFFPBA réalisée lors de ce travail a conduit à une densité de sites actifs comparable, voire supérieure à celle des supports fonctionnalisés de façon similaire dans la littérature [17,19,40]. Cependant, il est important de noter la présence d'interactions secondaires qui ne semblent pas avoir été prises en compte dans la littérature lors de la détermination des capacités.

Les matériaux utilisés et les voies de fonctionnalisation étudiées dans ce travail de thèse couvrent une grande gamme d'utilisation potentielle. Afin d'étendre la gamme de molécules d'intérêt, l'affinité de ces supports pour des composés glycosylés a été évaluée. Des tests d'affinité par analyse frontale et zonale ont été réalisés avec des peptides et des protéines glycosylés (HRP, fétuine et lactoferrine) et également la HSA glyquée. Malgré des tests similaires à ceux réalisés dans la littérature, sur des supports de chimie comparable, l'ensemble des tests effectués (quel que soit le type de support, la voie de fonctionnalisation, et les conditions de reconnaissance (présence de sels, pH) n'ont pas été concluants pour montrer une reconnaissance spécifique de ces composés glycosylés ou glyqués.

Ainsi, l'affinité boronate de ces colonnes monolithiques pour les composés cis-diols de petite taille a été exploitée pour l'analyse de neurotransmetteurs cis-diols par coulage en ligne d'une étape d'affinité boronate miniaturisée (μBAMC) avec une étape de séparation par électrophorèse capillaire de zone ou par focalisation isoélectrique capillaire. Ces applications sont décrites dans les chapitres suivants.

7. Références bibliographiques

- [1] J.A. Peters, Interactions between boric acid derivatives and saccharides in aqueous media: Structures and stabilities of resulting esters, *Coordination Chemistry Reviews*. 268 (2014) 1–22. doi:10.1016/j.ccr.2014.01.016.
- [2] H.G. Kuivila, A.H. KEOUGH, E.J. SOBOCZENSKI, Areneboronates from diols and polyols, *J. Org. Chem.* 19 (1954) 780–783. doi:10.1021/jo01370a013.
- [3] H.G. Kuivila, A.G. Armour, Electrophilic Displacement Reactions. IX. Effects of Substituents on Rates of Reactions between Hydrogen Peroxide and Benzeneboronic Acid1-3, *J. Am. Chem. Soc.* 79 (1957) 5659–5662. doi:10.1021/ja01578a020.
- [4] R. Pizer, L. Babcock, Mechanism of the complexation of boron acids with catechol and substituted catechols, *Inorg. Chem.* 16 (1977) 1677–1681. doi:10.1021/ic50173a021.
- [5] R. Nishiyabu, Y. Kubo, T.D. James, J.S. Fossey, Boronic acid building blocks: tools for sensing and separation, *Chem. Commun.* 47 (2011) 1106–1123. doi:10.1039/C0CC02920C.
- [6] H.L. Weith, J.L. Wiebers, P.T. Gilham, Synthesis of cellulose derivatives containing the dihydroxyboryl group and a study of their capacity to form specific complexes with sugars and nucleic acid components, *Biochemistry*. 9 (1970) 4396–4401. doi:10.1021/bi00824a021.
- [7] M. Glad, S. Ohlson, L. Hansson, M.-O. Månsson, K. Mosbach, High-performance liquid affinity chromatography of nucleosides, nucleotides and carbohydrates with boronic acid-substituted microparticulate silica, *Journal of Chromatography A*. 200 (1980) 254–260. doi:10.1016/S0021-9673(00)84944-4.
- [8] T. Koyama, K. Terauchi, Synthesis and application of boronic acid-immobilized porous polymer particles: a novel packing for high-performance liquid affinity chromatography, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 679 (1996) 31–40. doi:10.1016/0378-4347(96)00006-0.
- [9] X. Sun, W. Yang, T. Pan, A.T. Woolley, Affinity Monolith-Integrated Poly(methyl Methacrylate) Microchips for On-Line Protein Extraction and Capillary Electrophoresis, *Anal Chem.* 80 (2008) 5126–5130. doi:10.1021/ac800322f.
- [10] W. Yang, X. Sun, T. Pan, A.T. Woolley, Affinity monolith preconcentrators for polymer microchip capillary electrophoresis, *Electrophoresis*. 29 (2008) 3429–3435. doi:10.1002/elps.200700704.
- [11] C. Cakal, J.P. Ferrance, J.P. Landers, P. Caglar, Microchip extraction of catecholamines using a boronic acid functional affinity monolith, *Analytica Chimica Acta*. 690 (2011) 94–100. doi:10.1016/j.aca.2011.02.009.
- [12] Y. Ladner, A. Bruchet, G. Crétier, 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. doi:10.1039/C2LC21211K.
- [13] J. Du, M. He, X. Wang, H. Fan, Y. Wei, Facile preparation of boronic acid-functionalized magnetic nanoparticles with a high capacity and their use in the enrichment of cis-diol-containing compounds from plasma, *Biomed. Chromatogr.* 29 (2015) 312–320. doi:10.1002/bmc.3277.

- [14] J. Wang, X. He, L. Chen, Y. Zhang, Boronic acid functionalized magnetic nanoparticles synthesized by atom transfer radical polymerization and their application for selective enrichment of glycoproteins, *RSC Adv.* 6 (2016) 47055–47061. doi:10.1039/C6RA05848E.
- [15] P. Dou, L. Liang, J. He, Z. Liu, H.-Y. Chen, Boronate functionalized magnetic nanoparticles and off-line hyphenation with capillary electrophoresis for specific extraction and analysis of biomolecules containing cis-diols, *Journal of Chromatography A.* 1216 (2009) 7558–7563. doi:10.1016/j.chroma.2009.04.040.
- [16] P. Dou, Z. Liu, At-line coupling of magnetic-nanoparticle-based extraction with gel isoelectric focusing for protein analysis, *Anal Bioanal Chem.* 399 (2011) 3423–3429. doi:10.1007/s00216-010-4447-4.
- [17] H. Wang, Z. Bie, C. Lü, Z. Liu, Magnetic nanoparticles with dendrimer-assisted boronate avidity for the selective enrichment of trace glycoproteins, *Chem. Sci.* 4 (2013) 4298–4303. doi:10.1039/C3SC51623G.
- [18] S. Zhang, X. He, L. Chen, Y. Zhang, Boronic acid functionalized magnetic nanoparticles via thiol–ene click chemistry for selective enrichment of glycoproteins, *New J. Chem.* 38 (2014) 4212–4218. doi:10.1039/C4NJ00424H.
- [19] D. Li, Z. Bie, Branched polyethyleneimine-assisted boronic acid-functionalized magnetic nanoparticles for the selective enrichment of trace glycoproteins, *Analyst.* 142 (2017) 4494–4502. doi:10.1039/C7AN01174A.
- [20] D. Li, T. Tu, M. Yang, C. Xu, Efficient preparation of surface imprinted magnetic nanoparticles using poly (2-anilinoethanol) as imprinting coating for the selective recognition of glycoprotein, *Talanta.* 184 (2018) 316–324. doi:10.1016/j.talanta.2018.03.012.
- [21] D. Li, H. Xia, L. Wang, Branched polyethyleneimine-assisted boronic acid-functionalized silica nanoparticles for the selective enrichment of trace glycoproteins, *Talanta.* 184 (2018) 235–243. doi:10.1016/j.talanta.2018.02.021.
- [22] M. Chen, Y. Lu, Q. Ma, L. Guo, Y.-Q. Feng, Boronate affinity monolith for highly selective enrichment of glycopeptides and glycoproteins, *Analyst.* 134 (2009) 2158–2164. doi:10.1039/B909581K.
- [23] Z.A. Lin, J.L. Pang, Y. Lin, H. Huang, Z.W. Cai, L. Zhang, G.N. Chen, Preparation and evaluation of a phenylboronate affinity monolith for selective capture of glycoproteins by capillary liquid chromatography, *Analyst.* 136 (2011) 3281–3288. doi:10.1039/C1AN15180K.
- [24] X. Yang, Y. Hu, G. Li, Online micro-solid-phase extraction based on boronate affinity monolithic column coupled with high-performance liquid chromatography for the determination of monoamine neurotransmitters in human urine, *Journal of Chromatography A.* 1342 (2014) 37–43. doi:10.1016/j.chroma.2014.03.041.
- [25] L. Gao, J. Du, C. Wang, Y. Wei, Fabrication of a dendrimer-modified boronate affinity material for online selective enrichment of cis-diol-containing compounds and its application in determination of nucleosides in urine, *RSC Adv.* 5 (2015) 106161–106170. doi:10.1039/C5RA18443F.
- [26] S. Janků, M. Komendová, J. Urban, Development of an online solid-phase extraction with liquid chromatography method based on polymer monoliths for the determination of dopamine, *J. Sep. Science.* 39 (2016) 4107–4115. doi:10.1002/jssc.201600818.
- [27] O.G. Potter, M.C. Breadmore, E.F. Hilder, Boronate functionalised polymer monoliths for microscale affinity chromatography, *Analyst.* 131 (2006) 1094–1096. doi:10.1039/B609051F.

- [28] F. Yang, Z. Lin, X. He, L. Chen, Y. Zhang, Synthesis and application of a macroporous boronate affinity monolithic column using a metal-organic gel as a porogenic template for the specific capture of glycoproteins, *Journal of Chromatography A*. 1218 (2011) 9194–9201. doi:10.1016/j.chroma.2011.10.049.
- [29] Q. Li, C. Lü, H. Li, Y. Liu, H. Wang, X. Wang, Z. Liu, Preparation of organic-silica hybrid boronate affinity monolithic column for the specific capture and separation of cis-diol containing compounds, *Journal of Chromatography A*. 1256 (2012) 114–120. doi:10.1016/j.chroma.2012.07.063.
- [30] Q. Li, C. Lü, Z. Liu, Preparation and characterization of fluorophenylboronic acid-functionalized monolithic columns for high affinity capture of cis-diol containing compounds, *Journal of Chromatography A*. 1305 (2013) 123–130. doi:10.1016/j.chroma.2013.07.007.
- [31] Q. Yang, D. Huang, S. Jin, H. Zhou, P. Zhou, One-step synthesis of an organic–inorganic hybrid boronate affinity monolithic column with synergistic co-monomers, *Analyst*. 138 (2013) 4752–4755. doi:10.1039/C3AN00847A.
- [32] H. Li, Z. Liu, Recent advances in monolithic column-based boronate-affinity chromatography, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 37 (2012) 148–161. doi:10.1016/j.trac.2012.03.010.
- [33] Z. Lin, H. Huang, S. Li, J. Wang, X. Tan, L. Zhang, G. Chen, Preparation of phenylboronic acid-silica hybrid monolithic column with one-pot approach for capillary liquid chromatography of biomolecules, *Journal of Chromatography A*. 1271 (2013) 115–123. doi:10.1016/j.chroma.2012.11.038.
- [34] F. Svec, Y. Lv, Advances and Recent Trends in the Field of Monolithic Columns for Chromatography, *Anal. Chem.* 87 (2015) 250–273. doi:10.1021/ac504059c.
- [35] Z. Liu, H. He, Synthesis and Applications of Boronate Affinity Materials: From Class Selectivity to Biomimetic Specificity, *Acc. Chem. Res.* 50 (2017) 2185–2193. doi:10.1021/acs.accounts.7b00179.
- [36] D. Li, Y. Chen, Z. Liu, Boronate affinity materials for separation and molecular recognition: structure, properties and applications, *Chem. Soc. Rev.* 44 (2015) 8097–8123. doi:10.1039/C5CS00013K.
- [37] X. An, X. He, L. Chen, Y. Zhang, Graphene oxide-based boronate polymer brushes via surface initiated atom transfer radical polymerization for the selective enrichment of glycoproteins, *J. Mater. Chem. B*. 4 (2016) 6125–6133. doi:10.1039/C6TB01489E.
- [38] C. Lü, H. Li, H. Wang, Z. Liu, Probing the Interactions between Boronic Acids and cis-Diol-Containing Biomolecules by Affinity Capillary Electrophoresis, *Anal. Chem.* 85 (2013) 2361–2369. doi:10.1021/ac3033917.
- [39] T. Cheng, H. Li, Y. Ma, X. Liu, H. Zhang, Synthesis of boronic-acid-functionalized magnetic attapulgite for selective enrichment of nucleosides, *Anal Bioanal Chem.* 407 (2015) 3525–3529. doi:10.1007/s00216-015-8550-4.
- [40] D. Li, Y. Li, X. Li, Z. Bie, X. Pan, Q. Zhang, Z. Liu, A high boronate avidity monolithic capillary for the selective enrichment of trace glycoproteins, *Journal of Chromatography A*. 1384 (2015) 88–96. doi:10.1016/j.chroma.2015.01.050.
- [41] W. Wang, M. He, C. Wang, Y. Wei, Enhanced binding capacity of boronate affinity adsorbent via surface modification of silica by combination of atom transfer radical polymerization and chain-end functionalization for high-efficiency enrichment of cis-diol molecules, *Analytica Chimica Acta*. 886 (2015) 66–74. doi:10.1016/j.aca.2015.06.015.

- [42] B. Preinerstorfer, M. Lämmerhofer, W. Lindner, Synthesis and application of novel phenylboronate affinity materials based on organic polymer particles for selective trapping of glycoproteins, *J. Sep. Science*. 32 (2009) 1673–1685. doi:10.1002/jssc.200800679.
- [43] V.L. Dhadge, A. Hussain, A.M. Azevedo, R. Aires-Barros, A.C.A. Roque, Boronic acid-modified magnetic materials for antibody purification, *J R Soc Interface*. 11 (2014). doi:10.1098/rsif.2013.0875.
- [44] H. Li, X. Zhang, L. Zhang, X. Wang, F. Kong, D. Fan, L. Li, W. Wang, Preparation of a boronate affinity silica stationary phase with enhanced binding properties towards cis-diol compounds, *Journal of Chromatography A*. 1473 (2016) 90–98. doi:10.1016/j.chroma.2016.10.050.
- [45] Q. Dong, S.-S. Chi, X.-Y. Deng, Y.-H. Lan, C. Peng, L.-Y. Dong, X.-H. Wang, Boronate affinity monolith via two-step atom transfer radical polymerization for specific capture of cis-diol-containing compounds, *European Polymer Journal*. 100 (2018) 270–277. doi:10.1016/j.eurpolymj.2018.02.007.
- [46] D.S. Hage, High-performance affinity chromatography: a powerful tool for studying serum protein binding, *Journal of Chromatography B*. 768 (2002) 3–30. doi:10.1016/S0378-4347(01)00482-0.
- [47] X. Sun, R. Liu, X. He, L. Chen, Y. Zhang, Preparation of phenylboronic acid functionalized cation-exchange monolithic columns for protein separation and refolding, *Talanta*. 81 (2010) 856–864. doi:10.1016/j.talanta.2010.01.029.
- [48] F.B. Anspach, H.-J. Wirth, K.K. Unger, P. Stanton, J.R. Davies, M.T.W. Hearn, High-performance liquid affinity chromatography with phenylboronic acid, benzamidine, tri-l-alanine, and concanavalin A immobilized on 3-isothiocyanatopropyltriethoxysilane-activated nonporous monodisperse silicas, *Analytical Biochemistry*. 179 (1989) 171–181. doi:10.1016/0003-2697(89)90220-0.
- [49] Y. Egawa, R. Miki, T. Seki, Colorimetric Sugar Sensing Using Boronic Acid-Substituted Azobenzenes, *Materials*. 7 (2014) 1201–1220. doi:10.3390/ma7021201.
- [50] L. Ren, Z. Liu, M. Dong, M. Ye, H. Zou, Synthesis and characterization of a new boronate affinity monolithic capillary for specific capture of cis-diol-containing compounds, *Journal of Chromatography A*. 1216 (2009) 4768–4774. doi:10.1016/j.chroma.2009.04.036.
- [51] L. Ren, Y. Liu, M. Dong, Z. Liu, Synthesis of hydrophilic boronate affinity monolithic capillary for specific capture of glycoproteins by capillary liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*. 1216 (2009) 8421–8425. doi:10.1016/j.chroma.2009.10.014.
- [52] Y. Lu, Z. Bie, Y. Liu, Z. Liu, Fine-tuning the specificity of boronate affinity monoliths toward glycoproteins through pH manipulation, *Analyst*. 138 (2012) 290–298. doi:10.1039/C2AN36048A.
- [53] Y. Liu, L. Ren, Z. Liu, A unique boronic acid functionalized monolithic capillary for specific capture, separation and immobilization of cis-diol biomolecules, *Chem. Commun*. 47 (2011) 5067–5069. doi:10.1039/C0CC05675H.
- [54] C.R. Vistas, A.C.P. Águas, G.N.M. Ferreira, Silanization of glass chips—A factorial approach for optimization, *Applied Surface Science*. 286 (2013) 314–318. doi:10.1016/j.apsusc.2013.09.077.
- [55] A. Marechal, A. Laaniste, R. El-Debs, V. Dugas, C. Demesmay, Versatile ene-thiol photoclick reaction for preparation of multimodal monolithic silica capillary columns, *Journal of Chromatography A*. 1365 (2014) 140–147. doi:10.1016/j.chroma.2014.09.017.
- [56] P.N. Scheller, M. Lenz, S.C. Hammer, B. Hauer, B.M. Nestl, Imine Reductase-Catalyzed Intermolecular Reductive Amination of Aldehydes and Ketones, *ChemCatChem*. 7 (n.d.) 3239–3242. doi:10.1002/cctc.201500764.

- [57] L. Li, L.A. Colón, Hydrosilylated allyl-silica hybrid monolithic columns, *Journal of Separation Science*. 32 (n.d.) 2737–2746. doi:10.1002/jssc.200900147.
- [58] H. Colón, X. Zhang, J.K. Murphy, J.G. Rivera, L.A. Colón, Allyl-functionalized hybrid silica monoliths, *Chem. Commun.* 0 (2005) 2826–2828. doi:10.1039/B502870A.
- [59] Polyhedral Oligomeric Silsesquioxane as a Cross-linker for Preparation of Inorganic–Organic Hybrid Monolithic Columns - *Analytical Chemistry (ACS Publications)*, (n.d.). <https://pubs-acsc-org.docelec.univ-lyon1.fr/doi/10.1021/ac1003147> (accessed May 29, 2018).
- [60] R. El-Debs, 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, (2013). <http://www.theses.fr/188931252> (accessed June 26, 2018).
- [61] 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. Science*. 36 (2013) 993–1001. doi:10.1002/jssc.201200878.
- [62] 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, *Journal of Chromatography A*. 1326 (2014) 89–95. doi:10.1016/j.chroma.2013.12.038.
- [63] Z. Guo, A. Lei, Y. Zhang, Q. Xu, X. Xue, F. Zhang, X. Liang, “Click saccharides”: novel separation materials for hydrophilic interaction liquid chromatography, *Chem. Commun.* 0 (2007) 2491–2493. doi:10.1039/B701831B.
- [64] Y. Liu, Q. Du, B. Yang, F. Zhang, C. Chu, X. Liang, Silica based click amino stationary phase for ion chromatography and hydrophilic interaction liquid chromatography, *Analyst*. 137 (2012) 1624–1628. doi:10.1039/C2AN16277F.
- [65] M. Ortega-Muñoz, J. Lopez-Jaramillo, F. Hernandez-Mateo, F. Santoyo-Gonzalez, Synthesis of Glyco-Silicas by Cu(I)-Catalyzed “Click-Chemistry” and their Applications in Affinity Chromatography, *Advanced Synthesis & Catalysis*. 348 (2006) 2410–2420. doi:10.1002/adsc.200600254.
- [66] H. Yu, C. Yin, C. Jia, Y. Jin, Y. Ke, X. Liang, Evaluation of “click” binaphthyl chiral stationary phases by liquid chromatography, *Chirality*. 24 (2012) 391–399. doi:10.1002/chir.22039.
- [67] K.L. Zhao, C. Song, F. Wang, Q. Bai, “Click chemistry” preparation of WCX packings for protein separation, *Chinese Chemical Letters*. 23 (2012) 305–308. doi:10.1016/j.ccllet.2012.01.010.
- [68] K. Zhao, Q. Bai, C. Song, F. Wang, F. Yang, Preparation of weak cation exchange packings for chromatographic separation of proteins using “click chemistry,” *Journal of Separation Science*. 35 (2012) 907–914. doi:10.1002/jssc.201101097.
- [69] A. Marechal, R. El-Debs, V. Dugas, C. Demesmay, Is click chemistry attractive for separation sciences?, *J. Sep. Science*. 36 (2013) 2049–2062. doi:10.1002/jssc.201300231.
- [70] A. Marechal, Colonnes monolithiques multimodales photofonctionnalisées dédiées aux techniques séparatives miniaturisées, (2015). <http://www.theses.fr/193093472> (accessed June 27, 2018).
- [71] A. Laaniste, A. Marechal, R. El-Debs, J. Randon, V. Dugas, C. Demesmay, “Thiol-ene” photoclick chemistry as a rapid and localizable functionalization pathway for silica capillary monolithic columns, *Journal of Chromatography A*. 1355 (2014) 296–300. doi:10.1016/j.chroma.2014.06.031.
- [72] Y. Lv, Z. Lin, F. Svec, “Thiol-ene” click chemistry: a facile and versatile route for the functionalization of porous polymer monoliths, *Analyst*. 137 (2012) 4114–4118. doi:10.1039/C2AN35706B.

- [73] M. Uygun, M.A. Tasdelen, Y. Yagci, Influence of Type of Initiation on Thiol–Ene “Click” Chemistry, *Macromolecular Chemistry and Physics*. 211 (2009) 103–110. doi:10.1002/macp.200900442.
- [74] C.M. Halliwell, A.E.G. Cass, A Factorial Analysis of Silanization Conditions for the Immobilization of Oligonucleotides on Glass Surfaces, *Anal. Chem.* 73 (2001) 2476–2483. doi:10.1021/ac0010633.
- [75] R. Dabre, A. Schwämmle, M. Lämmerhofer, W. Lindner, Statistical optimization of the silylation reaction of a mercaptosilane with silanol groups on the surface of silica gel, *Journal of Chromatography A*. 1216 (2009) 3473–3479. doi:10.1016/j.chroma.2009.01.016.
- [76] J.-J. Chen, K.N. Struk, A.B. Brennan, Surface Modification of Silicate Glass Using 3-(Mercaptopropyl)trimethoxysilane for Thiol–Ene Polymerization, *Langmuir*. 27 (2011) 13754–13761. doi:10.1021/la202225g.
- [77] J. He, Z. Liu, L. Ren, Y. Liu, P. Dou, K. Qian, H.-Y. Chen, On-line coupling of in-tube boronate affinity solid phase microextraction with high performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry for the determination of cis-diol biomolecules, *Talanta*. 82 (2010) 270–276. doi:10.1016/j.talanta.2010.04.033.
- [78] Z. Lin, H. Huang, X. Sun, Y. Lin, L. Zhang, G. Chen, Monolithic column based on a poly(glycidyl methacrylate-co-4-vinylphenylboronic acid-co-ethylene dimethacrylate) copolymer for capillary liquid chromatography of small molecules and proteins, *Journal of Chromatography A*. 1246 (2012) 90–97. doi:10.1016/j.chroma.2012.02.056.
- [79] X.-J. Li, M. Jia, Y.-X. Zhao, Z.-S. Liu, H. Akber Aisa, Preparation of phenylboronate affinity rigid monolith with macromolecular porogen, *Journal of Chromatography A*. 1438 (2016) 171–178. doi:10.1016/j.chroma.2016.02.031.
- [80] 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, *Journal of Separation Science*. 34 (n.d.) 2079–2087. doi:10.1002/jssc.201100180.
- [81] M.-F. Grenier-Loustalot, P. Grenier, Reaction epoxy-amine: Suivi du mecanisme reactionnel et de la cinetique par RMN 13C, 15N et HPLC, *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* 22 (1984) 4011–4033. doi:10.1002/pol.1984.170221236.
- [82] S. Hjerter, J.-P. Li, High-performance liquid chromatography of proteins on deformed non-porous agarose beads, *Journal of Chromatography A*. 500 (1990) 543–553. doi:10.1016/S0021-9673(00)96091-6.
- [83] C. Mateo, G. Fernández-Lorente, O. Abian, R. Fernández-Lafuente, J.M. Guisán, Multifunctional Epoxy Supports: A New Tool To Improve the Covalent Immobilization of Proteins. The Promotion of Physical Adsorptions of Proteins on the Supports before Their Covalent Linkage, *Biomacromolecules*. 1 (2000) 739–745. doi:10.1021/bm000071q.
- [84] C. Mateo, R. Torres, G. Fernández-Lorente, C. Ortiz, M. Fuentes, A. Hidalgo, F. López-Gallego, O. Abian, J.M. Palomo, L. Betancor, B.C.C. Pessela, J.M. Guisan, R. Fernández-Lafuente, Epoxy-Amino Groups: A New Tool for Improved Immobilization of Proteins by the Epoxy Method, *Biomacromolecules*. 4 (2003) 772–777. doi:10.1021/bm0257661.
- [85] R. Mallik, D.S. Hage, Development of an affinity silica monolith containing human serum albumin for chiral separations, *J Pharm Biomed Anal.* 46 (2008) 820–830. doi:10.1016/j.jpba.2007.03.017.

- [86] M. Nandi, H. Uyama, Porous acrylate monolith supported Pd nanoparticles: highly active and reusable catalyst for Suzuki–Miyaura reaction in water, *RSC Advances*. 4 (2014) 20847–20855. doi:10.1039/C4RA02057J.
- [87] A. Monzo, T. Rejtar, A. Guttman, Optimization of poly(GMA-co-EDMA) Monolithic Support for Trypsin Nanoreactor Fabrication, *Journal of Chromatographic Science*. 47 (2009) 467–472. doi:10.1093/chromsci/47.6.467.
- [88] V. Shkolnikov, J.G. Santiago, Coupling Isotachopheresis with Affinity Chromatography for Rapid and Selective Purification with High Column Utilization, Part 2: Experimental Study, *Anal. Chem*. 86 (2014) 6229–6236. doi:10.1021/ac5011074.
- [89] S. Currivan, P. Jandera, Post-Polymerization Modifications of Polymeric Monolithic Columns: A Review, *Chromatography*. 1 (2014) 24–53. doi:10.3390/chromatography1010024.
- [90] Z. Li, E. Rodriguez, S. Azaria, A. Pekarek, D.S. Hage, Affinity monolith chromatography: A review of general principles and applications, *Electrophoresis*. 38 (2017) 2837–2850. doi:10.1002/elps.201700101.
- [91] R.D. Arrua, C.I.A. Igarzabal, Macroporous monolithic supports for affinity chromatography, *Journal of Separation Science*. 34 (2011) 1974–1987. doi:10.1002/jssc.201100197.
- [92] E.L. Pfaunmiller, M.L. Paulemond, C.M. Dupper, D.S. Hage, Affinity monolith chromatography: a review of principles and recent analytical applications, *Anal Bioanal Chem*. 405 (2013) 2133–2145. doi:10.1007/s00216-012-6568-4.
- [93] T. Jiang, R. Mallik, D.S. Hage, Affinity Monoliths for Ultrafast Immunoextraction, *Anal. Chem*. 77 (2005) 2362–2372. doi:10.1021/ac0483668.
- [94] A. Bruchet, V. Dugas, I. Laszak, C. Mariet, F. Goutelard, J. Randon, Synthesis and Characterization of Ammonium Functionalized Porous Poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) Monoliths for Microscale Analysis and Its Application to DNA Purification, *Journal of Biomedical Nanotechnology*. (2011). doi:info:doi/10.1166/jbn.2011.1291.
- [95] R. Mallik, T. Jiang, D.S. Hage, High-Performance Affinity Monolith Chromatography: Development and Evaluation of Human Serum Albumin Columns, *Anal. Chem*. 76 (2004) 7013–7022. doi:10.1021/ac049001q.
- [96] M.J. Yoo, D.S. Hage, Evaluation of silica monoliths in affinity microcolumns for high-throughput analysis of drug–protein interactions, *Journal of Separation Science*. 32 (2009) 2776–2785. doi:10.1002/jssc.200900346.

Chapitre III

Couplage « in-line » de supports
 μ BAMC à des techniques
séparatives miniaturisées

Introduction

Dans ce chapitre, nous aborderons la faisabilité et l'utilisation d'un couplage en ligne d'une étape de préconcentration et purification basée sur un mécanisme d'affinité boronique avec une étape de séparation électrocinétique. La faisabilité d'un tel couplage repose sur l'intégration des supports monolithiques développés dans le chapitre II au format capillaire en vue de leur utilisation dans un appareil commercial d'électrophorèse capillaire. La démonstration de l'utilisation de ce type de couplage concerne l'analyse de 3 catécholamines comme composés cis-diols d'intérêt. En effet, la dopamine, l'adrénaline et la noradrénaline (Figure ci-dessous) sont des neurotransmetteurs impliqués dans le diagnostic de diverses maladies tels que les cancers paragangliome ou phéochromocytome, l'Alzheimer, le Parkinson, la dépression et l'anxiété, ainsi que dans le suivi des addictions aux drogues.

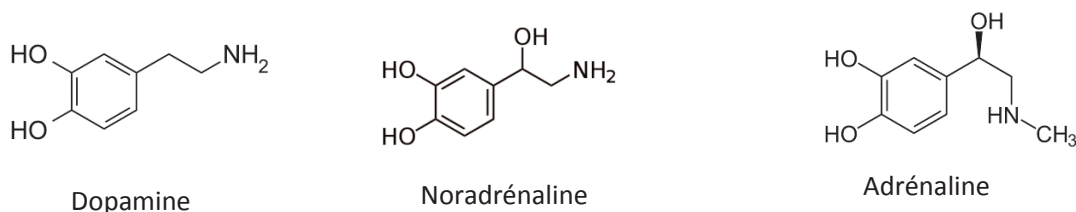


Figure 1. Structure chimique des catécholamines.

Ces composés cis-diols sont présents dans différentes matrices à des niveaux de concentration relativement bas (tableau 1). En outre, ces catécholamines sont des composés ionisables amphotères ce qui en fait de bons candidats pour une séparation électrocinétique. Leur niveau de concentration dans des matrices biologiques peut nécessiter, pour une détection par absorbance UV, une étape préalable de préconcentration voire de purification selon la matrice.

Tableau 1. Exemple de volumes d'échantillon à prélever afin d'analyser des neurotransmetteurs (catécholamines), et les concentrations de ces derniers couramment trouvées dans ces échantillons.

Matrices biologiques	Volume d'échantillon (mL)	Concentration (ng mL ⁻¹)
Urine	1500	15-400
Plasma	10	9-750
Sang	5	22-150
LCR	3	25

A côté des enjeux pratiques liés par exemple à l'intégration d'un support miniaturisé d'affinité boronique à l'entrée d'un capillaire de silice fondue de 75 μm de diamètre interne, la réussite de ce type de couplage dépend de la conception du fonctionnement du couplage. En effet, l'avantage du couplage en ligne dans un capillaire est de limiter les sources de dispersion lors du transfert de l'échantillon de la zone de préconcentration /purification (injection) dans la zone de séparation. Les défis à relever ou contraintes liées à ce type de couplage concernent la compatibilité et l'interdépendance des étapes sur le résultat final : la capture des composés cis-diols implique de travailler à pH basique. L'échantillon injecté traverse le support μBAMC mais également l'ensemble du capillaire de séparation. Après le chargement de l'échantillon, il faut déterminer des conditions permettant d'une part de laver le support pour éliminer les composés retenus de façon non-spécifique mais également de remplir le capillaire de séparation avec le tampon de séparation. Comme tous les liquides traversent les deux zones successives, ce tampon doit éviter l'élution des composés cis-diols retenus. Compte tenu de l'affinité relativement faible (μM) par rapport à l'immunoaffinité par exemple, les volumes percolés doivent forcément être maîtrisés. Deux modes différents de séparation électrocinétiques en capillaire ont été alors envisagés pour réaliser ces couplages : l'électrophorèse capillaire en zone (CZE) et la focalisation isoélectrique capillaire (CIEF).

La faisabilité du couplage d'un support d'affinité boronique a dans un premier temps été évaluée avec une séparation par électrophorèse capillaire de zone. Ce couplage a été mis en œuvre en utilisant une colonne monolithique d'affinité boronique miniaturisée de silice (μBAMC , micro-boronate affinity monolithic column). Le support de silice a été initialement privilégié en raison de sa plus grande surface spécifique par rapport aux supports organiques. La fonctionnalisation de ces monolithes de silice activés avec le γ -MAPS a été réalisée par photopolymérisation de l'AAPBA. Ce mode de fonctionnalisation représente le premier support développé au cours de ces travaux de thèse. Ces supports ont donc été utilisés rapidement au cours de ces travaux de thèse pour valider le concept du couplage d'une colonne monolithique d'affinité boronique miniaturisée en ligne avec une séparation électrophorétique.

Cette étude a porté sur l'optimisation des deux étapes séparément, à savoir l'extraction et la séparation en prenant en compte les spécificités du couplage. Les paramètres expérimentaux de l'extraction tels que la nature, la concentration et le pH du tampon ont été étudiés afin d'améliorer les performances de capture. Il a par exemple été montré que l'ajout de solvant à hauteur de 40% pour le méthanol n'influence pas significativement l'interaction (affinité) entre les phénylboronates immobilisés et les composés cis-diols libre. L'ajout de solvant permet d'améliorer la spécificité du support en limitant l'adsorption non-spécifique de composés non-polaires par exemple. Les conditions de séparation des 3

catécholamines a en parallèle été étudiée et optimisée afin de permettre leur séparation avec un retour à la ligne de base dans des conditions compatibles avec les conditions d'utilisation du μ BAMC. En effet, avant d'éluer les composés retenus du support d'affinité, il est impératif de remplir le capillaire d'un électrolyte adapté à la séparation des trois composés. Enfin, les conditions d'élution (longueur (volume) du μ BAMC, longueur (volume) du créneau d'élution, nature et concentration du milieu d'élution) ont été étudiées. Les critères retenus pour cette étape critique étaient de pouvoir éluer l'ensemble des composés retenus sur le monolithe dans un volume le plus faible, en limitant les phénomènes de dispersion. Ce couplage a permis, après optimisation des différentes étapes de purifier, préconcentrer, séparer et détecter en ligne des catécholamines dans l'urine. L'analyse est réalisée de façon automatisée dans un appareil d'électrophorèse. Des limites de détection de l'ordre de la dizaine de ppb ont été atteintes avec l'utilisation d'un système de détection UV simple. Pour atteindre des limites encore plus basses il pourrait être envisagé d'augmenter les performances de l'unité μ BAMC (Kd, capacité). Nous avons montré dans le chapitre précédent qu'à la suite du développement des monolithes fonctionnalisés par photopolymérisation, les monolithes de silice fonctionnalisés boronate via une réaction de photoclick « thiol-ène » permettent de préparer des supports de plus grande capacité par unité de volume de monolithe (3 fois plus que la μ BAMC par photopolymérisation).

Dans la continuité de cette première expérience réussie de couplage en ligne, nous avons cherché à élargir le champ d'application de ces systèmes couplés à d'autre type de séparation. La focalisation isoélectrique est une technique puissante d'analyse et de caractérisation des protéines ainsi que des petites molécules amphotères sur la base de leur point isoélectrique. Son couplage avec une unité μ BACM a donc été envisagé comme possible application d'analyse en ligne et automatisée de ces biomolécules. Le développement de ce nouveau couplage a été réalisé avec les catécholamines comme molécules modèles avant d'être appliqué aux biomolécules. Cependant, et comme mentionné précédemment, les tests d'affinité réalisés avec les glycoprotéines n'ont pas été concluants limitant notre champ d'application aux petites molécules.

Etant donnée la plus grande capacité des unités μ BAMC développées via une fonctionnalisation par photoclick « thiol-ène », leur couplage avec la CIEF été envisagé dans un premier temps. Cependant, il a été observé que la capacité de ces supports se dégradait assez rapidement au fur et à mesure des analyses. Bien que ces unités soient stables vis-à-vis des cycles capture/élution acide, il a été supposé que les conditions de pH extrêmes des solutions d'anolyte /catholyte aux extrémités du capillaire durant une analyse par CIEF étaient responsables de la dégradation des couches de fonctionnalisation. Les supports

organiques étant plus résistant au pH, ceux-ci ont été préférés. Parmi les μ BAMC organiques développées au cours de ce travail, celles fonctionnalisés via PEI-DFFPBA ont présenté une plus grande capacité mais aussi une présence significative des interactions secondaires, c'est pourquoi la μ BAMC développée via « époxy-amine » a été sélectionnée. La focalisation isoélectrique est une technique qui présente l'avantage de lutter contre la dispersion. D'un point de vue du couplage, cette caractéristique est très importante. En effet, l'étape d'élution est critique en couplage en ligne, il est crucial de limiter les sources de dispersion. En CIEF, l'élution n'est plus un problème. Une fois éluées du support, les molécules amphotères migrent jusqu'à atteindre la zone de pH où leur charge nette devient nulle (pI de la molécule). Lorsqu'une molécule sort de sa zone de charge nulle (par diffusion par exemple), cette molécule se recharge (en fonction du pH) et retrouve de la mobilité électrophorétique qui la redirige vers sa zone de charge nulle. C'est le processus de focalisation. Après avoir vérifié qu'il était possible de conditionner un capillaire portant à son entrée une unité μ BMAC avec le mélange d'ampholytes nécessaire à l'établissement du gradient de pH sans risque de perdre les molécules capturées, nous avons recherché à optimiser les conditions d'analyse de façon à :

Les résultats obtenus sur les deux approches de couplage « in-line » développées sont présentés dans les articles suivants :

- « Development and application of a new in-line coupling of a miniaturized boronate affinity monolithic column with capillary zone electrophoresis for the selective enrichment and analysis of cis-diol-containing compounds » pour le couplage μ BAMC-CZE. Publié dans *Journal of Chromatography A* (2017) 1494, 65–76, DOI: 10.1016/j.chroma.2017.03.014.
- « Evaluation of boronate affinity solid-phase extraction coupled in-line to capillary isoelectric focusing for the analysis of catecholamines in urine » pour le couplage μ BAMC-CZE. Publié dans *Analytica Chimica Acta* (2018) In Press, DOI: 10.1016/j.aca.2018.06.017.

Development and application of a new in-line coupling of a miniaturized boronate affinity monolithic column with capillary zone electrophoresis for the selective enrichment and analysis of cis-diol-containing compounds

Published in *Journal of Chromatography A* (2017) 1494, 65–76, DOI: 10.1016/j.chroma.2017.03.014

Maria Betzabeth Espina-Benitez*, Jérôme Randon, Claire Demesmay, Vincent Dugas

Université de Lyon, CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, ENS de Lyon, Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280, 5 rue de la Doua, F-69100 VILLEURBANNE, France

* Corresponding author. Tel.: +33437423552

E-mail address: maria.espina-benitez@isa-lyon.fr

Abstract:

An integrated, miniaturized and fully automated system was developed for the analysis (preconcentration/purification, separation and detection) of cis-diol containing molecules in complex matrices. This innovative in-line coupling system was achieved via the *in-situ* and localized synthesis of a short segment of silica-based monolith at the inlet of a 75- μm inner diameter fused silica capillary. The monolithic segment was locally functionalized with an acrylamide derivative of phenylboronic acid by free radical photopolymerization within 10 min of irradiation time. Efficiency of the photopolymerization reaction was followed by frontal affinity chromatography of 1,2-dihydroxybenzene (catechol) as cis-diol model solute. An active-site amount of 0.43 nmol cm^{-1} (9.8 nmol μL^{-1}) of phenylboronic acid moieties was obtained, with a K_d value of about 290 μM close to reported value for the phenyl boronate-catechol complex. The optimal conditions of use of the miniaturized boronate affinity monolithic column (μBAMC) were determined and adapted to the in-line coupling with capillary electrophoresis. Catechol was specifically preconcentrated in a pH 8.5 phosphate buffer/MeOH (80/20, v/v) mixture. A volume up to 20 times the monolith volume can be percolated with a quantitative recovery yield. Three catecholamines were purified, preconcentrated and in-line separated. Elution from the μBAMC was performed with a small plug of acidic solution, allowing field amplified sample stacking of solutes within the plug before their in-

line electrophoretic separation at pH 8.75. This unique in-line coupling was successfully used for the fully automated analysis of catecholamines neurotransmitters in urine samples, highlighting the purification efficiency of the μ BAMC and the potential of such a fully integrated approach. In addition to the low sample volume required (less than 2 μ l), the limits of detection (LOD) accomplished with this coupling were estimated at 9.0, 9.5 and 4.8 ng mL⁻¹ for dopamine, adrenaline and noradrenaline respectively, which improves the LOD of these solutes compared to other CE methods.

Key words: boronate affinity chromatography, silica monolith, capillary electrophoresis, in-line coupling, urine, catecholamines.

Table of contents

1. Introduction.....	129
2. Materials and methods	131
2.1. Reagents and chemicals	131
2.2. Instrumentation	132
2.3. Preparation of acrylate pre-functionalized monolith at capillary head	132
2.3.1. Synthesis of silica monoliths.....	132
2.3.2. Silica surface activation by grafting of γ -MAPS	133
2.4. AAPBA photo-polymerization of monoliths	133
2.5. Determination of the number of active sites and K_d by in-capillary frontal analysis [57].....	133
2.6. Recovery yields experiments.....	134
2.7. Protocol for percolation, elution and separation of catecholamines	135
2.8. Preparation of solutions and real sample	136
3. Results and discussion.....	136
3.1. Preparation of the miniaturized boronate affinity monolithic column (μ BAMC)	136
3.1.1. Capillary silica monolithic support	136
3.1.2. Optimization of AAPBA photopolymerization reaction	138
3.2. Optimization of the operating conditions of the μ BAMC unit	141
3.2.1. In-capillary percolation and recognition step	141
3.2.2. In-capillary recovery yield	143
3.3. Application of the in-line coupling for catecholamines purification/preconcentration, separation and detection	145
3.4. Linearity and limits of detection.....	147
3.5. Recovery yield of catecholamines using the in-line coupling	148
3.6. Proof of feasibility: Application of the in-line coupling to urine real sample analysis.....	148

3.7. Stability and lifetime of the μ -SPE unit.....	149
4. Conclusion	150
5. Supplementary Material.....	151
6. References.....	157

1. Introduction

Analysis of complex samples available in minute amounts and at very low concentrations has pushed forward the development of miniaturized and/or fully integrated methods, i.e. in-line/on-line coupled methods including all the analytical steps (sample preparation, separation and detection) to by-pass the multiple disadvantages associated with off-line coupling processes (tedious, labor-intensive and time consuming). The integration of the whole analytical process from sample preparation to detection is also a response to the demand of increasingly rapid analysis since such approaches allow automation of the analysis and thus, reduce human intervention and sources of error. In addition, miniaturization allows the analysis of sample available in small volumes and/or can reduce the cost associated to the use of expensive reagents and limits the exposition of manipulators to toxic ones [1,2]. In spite of their almost identical name, on-line and in-line modes present different features. The on-line approach is referred as the physical coupling of preparation and separation steps through specific interfaces [3–5], like a 10-port valve. This approach is usually technically complex, and band broadening consecutive to the transfer of the sample from the preconcentration unit to the separation column may occur and be detrimental in miniaturized systems. With in-line coupling, the preparation unit is an integral part of the capillary column making its inlet [6–16], thus reducing technical coupling issues i.e. leakage or bubbles formation. In such integrated capillary system, the elution of the preconcentration unit is achieved with a very small volume directly going to the separation zone without any dilution (the large scale shift from the injection volume to the elution one is designed to result in a high preconcentration factor [14,17]) and without any band broadening effects which is a critical factor in miniaturized systems. Conversely, the designing of such in-line miniaturized systems represents a real analytical challenge to integrate the different steps within a single capillary of reduced dimensions and to optimize the multiple analytical steps in order to be fully compatible among them.

This innovative approach has been successfully implemented for the preconcentration and/or purification of various compounds such as antidepressants [18], neurotransmitters [11], mycotoxins [17,19], peptides [9,12,14–16,20] or proteins [21], followed by their separation by capillary zone electrophoresis (CZE). Indeed, CZE is the most suitable separation technique to be in-line coupled in miniaturized systems. For these previously described systems, in-line preconcentration/purification was implemented with various miniaturized solid phase extraction supports (μ SPE) ranging from conventional hydrophobic phases to high affinity and specificity supports grafted with aptamers or antibodies [14,17,19]. Whereas conventional hydrophobic phases are effective to preconcentrate, they are not able

to purify i.e. to remove interfering compounds that are co-extracted. Therefore, sorbents affording specific molecular recognition are preferred if purification is required. High affinity receptors like antibodies and aptamers were used for immunopreconcentration in such miniaturized tools. Solid supports modified with phenyl boronic acids belong to these affinity ligands. These ligands are interesting in the sense that they exhibit a rather larger spectrum of targeted molecules. Indeed, phenyl boronate functionality presents specific affinity towards a whole class of molecules: the cis-diol-containing compounds that cover a wide range of molecules of interest in pharmaceutical and biomedical research (catecholamines, glycoproteins, RNA, etc) [22–24]. However, the reversible “covalent complexes” between phenyl boronate and cis-diol groups have lower affinity ($10^{-1} < K_d < 10^{-4}$ M) compared to immunoaffinity interactions ($K_d > 10^{-7}$ M) [25,26].

The present work aims to develop and optimize an innovative miniaturized analytical system composed of a home-made boronate affinity column in-line coupled to capillary zone electrophoresis for the analysis of cis-diol-containing compounds. Catecholamines (CAs), including noradrenaline (NA), adrenaline (A) and dopamine (DA), have been chosen as model molecules for several reasons. Given their important role in several physiological processes and regulations of the immune system [27–32], their analysis in biological fluids such as blood or urine where they are present in minute concentrations while the interfering substances are present in abundance has a great clinical importance [33]. Moreover, these monoamine neurotransmitters can be separated by capillary electrophoresis [33,34].

Figure 1 is a sketch of the proposed in-line coupling method. A short segment of miniaturized boronate affinity monolithic column (μ BAMC) at the inlet of an open fused silica capillary was used to preconcentrate and purify cis-diol containing molecules. After their capture under alkaline conditions, catecholamines were eluted in a short acidic plug before their subsequent in-line capillary electrophoresis separation and UV detection.

To achieve this goal, a short-length preconcentration zone has to be inserted at the inlet of the capillary. Since several years our group develops efficient and versatile photochemical approaches for the in-situ and localized surface functionalization of monolithic silica capillary column [35,36]. Such strategy was successfully used to develop miniaturized multidimensional tools, i.e. in-line coupling of miniaturized SPE with CE separation [14,17] fractionation and separation on multimodal biphasic monolithic column [37]. Despite the great portfolio of materials (MNPs [38–40], monoliths [23,24,41–45], particulates [46–49]), functionalization strategies (co-polymerization [42,43,50–52], post-synthesis functionalization [23,41], surface polymer-modification [44,48], dendrimer-modification [53,54]) and analytical tools (SPME

[43,55,56], on-line analysis [22,24,45,56]) already reported on boronate affinity chromatography, in-line integration of boronate affinity column to miniaturized separation has not been yet investigated. In the present work, we propose to take advantage of the photo-functionalization process to develop a micro-boronate affinity monolithic column (μ BAMC) using 3-(acrylamido)phenylboronic acid (AAPBA) as photopolymerizable derivative. The preparation of the μ BAMC was optimized and its use extensively characterized with respect to its subsequent in-line coupling. The coupling conditions for the preconcentration/elution, electrophoretic separation and detection of three catecholamines were tuned to be fully compatible and taking full advantage of each step. The fully automated method was used to analyze catecholamines in urine sample.

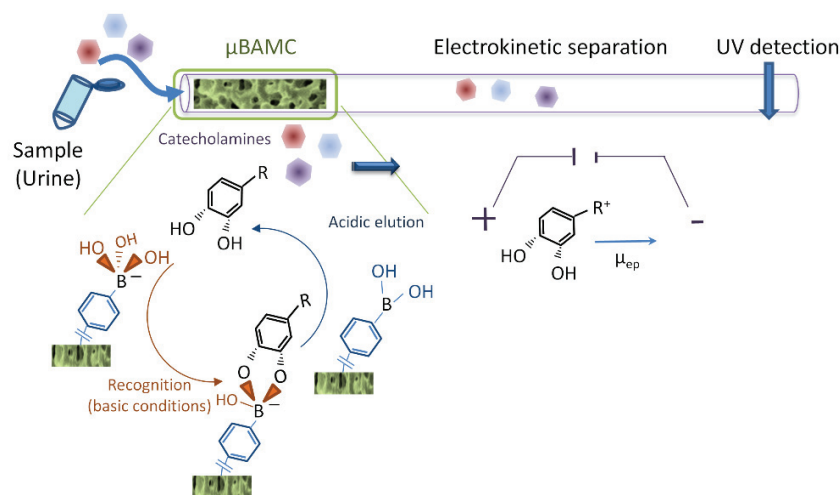


Figure 1. Schematic illustration of the different steps of cis-diols compounds analysis: preconcentration and purification on the integrated μ BAMC unit, acidic elution and capillary zone electrophoresis separation and UV detection.

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), 3-(acrylamido)phenylboronic acid (AAPBA), triethylamine (TEA), dimethylsulfoxidemethanol (DMSO), (MeOH, HPLC grade), 1,2-dihydroxybenzene (catechol), 1,4-Benzenediol (hydroquinone), epinephrine (A), norepinephrine (NA), dopamine (DA),

thiourea, γ -methacryloxypropyltrimethoxysilane (γ -MAPS), benzoin methylether (BME), 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 (AcOH) 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 μm i.d.) were purchased from Polymicro Technologies (Polymicro Technologies, Arizona, USA).

2.2. 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 bars. System control and data acquisition were carried out using the Chemstation software (Agilent).

Nitrogen adsorption isotherms were measured at 77 K on a BELSORP Mini volumetric adsorption analyzer (Bel Instruments, Japan). Before the measurements, the samples were outgassed under vacuum for 4 h at 373 K. The surface area was determined by the Brunauer-Emmett-Teller (BET) approach. The total porous volume was measured at $P/P_0 = 0.98$. The pore size distribution (max radius) and the mesoporous volume were calculated from the adsorption branch of the isotherms using the Barrett-Joyner-Halenda (BJH) method. Scanning electron microscopy (SEM) was performed with a JEOL Neoscope JCM 5000 (Jeol, Japan).

2.3. Preparation of acrylate pre-functionalized monolith at capillary head

2.3.1. Synthesis of silica monoliths

The silica monolith preparation followed our reported procedure [35]. 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- μm 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 urea

decomposition gently raising the capillary temperature at $0.5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ up to 120°C maintained for 4 hours. After cooling, the monolith was washed with methanol and the capillary was cut to desired length at the μ -SPE monolith side (about 1-3 cm) and at the open tubular CE side (about 10 cm for affinity nano-LC characterization after photografting and about 35 cm for in-line coupling optimization).

The hydrodynamic permeability was determined using Darcy's law and naphthalene as t_0 marker for bare silica in the HILIC mode 95/5 (v/v) acetonitrile/water mobile phase.

2.3.2. Silica surface activation by grafting of γ -MAPS

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

2.4. AAPBA photo-polymerization of monoliths

The capillary with the acrylate-silanized monolith head and the open CZE segment was filled with a solution containing the monomer (100 mM AAPBA unless otherwise specified), a photoinitiator (9 mM BME unless otherwise specified) in water (pH 9, adjusted with TEA) /acetonitrile (50/50, v/v) mixture. A nanobaume packing system (Western Fluids, Wildomar, 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 was 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 8 W 365 nm UV tubes. The monolithic segment was photografted for 10 min at 365 nm. The capillary was then washed with water/acetonitrile (50/50, v/v) and with methanol. In the case of multiple successive graftings, the operation was repeated as needed.

2.5. Determination of the number of active sites and K_d by in-capillary frontal analysis [57]

A 1-3-cm length silica monolithic segment at the inlet of a 10-cm length fused silica capillary was used to determine the total number of active sites (m_B) on boronate affinity monolithic column by frontal

analysis. Breakthrough curves with catechol as model solute at 5, 10 and 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in phosphate buffer (15 mM Na_2HPO_4 , pH 8.5)/MeOH (80/20, v/v) were used to determine the apparent number of active binding sites ($m_{B \text{ app}}$) at different catechol concentrations [L]. The total number of active sites on the column and the dissociation equilibrium constant (K_D) of the boronate / catechol complex were determined according to equation (1) after plotting $1/m_{B \text{ app}}$ versus $1/[L]$

$$\frac{1}{m_{B \text{ app}}} = \frac{K_D}{m_B[L]} + \frac{1}{m_B} \quad (1)$$

2.6. Recovery yields experiments

In order to study the recovery yield of the μ -SPE unit, known quantities of catechol were percolated on a 1.8 cm AAPBA monolith at the entrance of a 10-cm length capillary tubing using either constant volume or constant catechol concentration solution:

- *Constant volume experiments:* A fixed volume of 24 nL of standard solutions of catechol ranging between 0.23 and 2.3 mM was percolated.

- *Constant concentration experiments:* A standard catechol solution at 0.18 mM was percolated at a flow rate of 2.28 nL s^{-1} , i.e. a linear velocity of 0.05 cm s^{-1} , during various durations corresponding to injection volumes ranging from 28 to 335 nL.

The μ BAMC was rinsed with a 15 mM phosphate solution (pH 8.5)/MeOH (80/20, v/v) mixture before the elution step. The elution was promoted by percolating a 50 mM AcOH / MeOH (80/20, v/v) mixture. The recovered quantity was determined using the peak area and migration time of the eluted catechol peak according to equation (2) [19].

$$Quantity_{Rec} = \frac{\ell \times \pi \times d_{cap}^2}{4 \times K_{Catechol} \times t_{mig}(Catechol)} \times A \quad (2)$$

where ℓ is the effective length (from injection to detection) in cm, d_{cap} the capillary inner diameter in cm, $t_{mig}(Catechol)$ the migration time of catechol in seconds, A the peak area in mAU s and $K_{Catechol}$ the UV response factor of catechol.

The response factor $K_{Catechol}$ in UV mode was determined to be 0.122 mAU mL μg^{-1} (in a 75- μm -i.d capillary) at 275 nm by frontal analysis of 30-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (0.27-0.91 mM) catechol solutions prepared in 50 mM AcOH / MeOH, 80/20 (v/v) mixture, the height of the concentration plateau being directly proportional to the solution concentration, i.e. height of the concentration plateau = $K_{Catechol} \times C_{Catechol}$.

Likewise, the recovery yields of DA, A and NA by the in-line coupling of preconcentration, electrophoretic separation and UV detection were determined. Known quantities of these three catecholamines were percolated on 2.7 cm AAPBA monolith at the entrance of a 35.7-cm length capillary tubing using a constant 2.5 μL volume of standard solutions of catecholamines ranging between 50 and 300 ng mL^{-1} .

The recovered quantities of DA, A and NA were determined using the peak areas and migration times of the eluted catecholamines peaks, and substituting them in equation (4). The UV response factor of each catecholamine, $K_{\text{Catecholamine}}$, were determined to be 0.106, 0.085 and 0.125 $\text{mAU mL } \mu\text{g}^{-1}$ (in a 75- μm -i.d capillary) at 282 nm for DA, A and NA respectively, by frontal analysis of 5-10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ catecholamines solutions separately prepared in a 15 mM phosphate buffer, 35.7 mM TEA (pH 8.75)/MeOH, 60/40 (v/v) mixture.

2.7. Protocol for percolation, elution and separation of catecholamines

The total capillary length was adjusted to about 35 cm, with a short monolith inlet of about 1 to 3 cm (depending on the capillary tested). The length from injection to detection was about 26.5 cm. In the first step, solutions of catecholamines solubilized in the percolation buffer (15 mM phosphate solution, 35.7 mM TEA (pH 8.75)/MeOH, 60/40 (v/v)) were percolated through the column at a linear velocity of about 0.09 cm s^{-1} (6 bars/cm of monolith) the percolation duration depending on the volume to be percolated. Thiourea was injected at the beginning of the percolation step to determine accurately the linear flow velocity, hence the percolated volume. A washing step was then carried out by percolating a total capillary volume with the BGE at 0.09 cm s^{-1} .

The elution step could then be realized by injecting a desorbing plug of 2 volumes of monolith at a linear velocity of 0.02 cm s^{-1} of 50 mM AcOH/MeOH (60/40) mixture. Next, the electrokinetic separation was performed by applying a short voltage step of 3 min at 15 kV between elution solution (anode) and BGE (cathode). The anode vial was then replaced by BGE and separation was further obtained by applying voltage (15 KV) and pressure at both capillary ends. Catecholamines were detected by UV-Vis absorption at 214 and 282 nm.

2.8. Preparation of solutions and real sample

- *Background electrolyte (BGE) and percolation buffer preparation:* 0.05 % in volume of TEA is added to a 15 mM Na₂HPO₄ phosphate buffer. The pH is adjusted to pH 8.75 with diluted hydrochloric acid. BGE and percolation buffers were obtained by adding 40 % of MeOH to the prepared phosphate buffer.

- *Urine sample preparation:* Urine samples were collected from healthy volunteers. In order to avoid catecholamines oxidation, 0.5 mL of 1 M HCl was added to 10 mL of urine sample and stored at -20°C. Hours before the analysis was performed, urine sample were defrosted at room temperature, then centrifuged at 13 000 rpm during 10 min and filtered through 0.22 µm membrane filter. In order to avoid substantial changes of the sample matrix and to reach a 15 mM concentration of Na₂HPO₄, urine samples were diluted with a solution of 100 mM Na₂HPO₄ in a buffer / urine ratio of 3/17. Then, TEA was added to reach a concentration of 35.7 mM TEA and pH was adjusted at 8.75. For sample percolation, 40 % of MeOH was added to the prepared urine.

3. Results and discussion

3.1. Preparation of the miniaturized boronate affinity monolithic column (µBAMC)

3.1.1. Capillary silica monolithic support

Bare silica monoliths were *in-situ* synthesized at the inlet of 75-µm UV-transparent silica capillary by simple capillarity according to the procedure established by El-Debs et al. [35], which yields highly efficient silica monoliths with an average minimum plate height of 8 ± 2 µm at the optimum mobile phase velocity of about 0.1 cm s⁻¹. Figure 2 illustrates the morphology of the silica based monoliths observed by scanning electron microscopy (SEM), showing a homogeneous monolith, with a macropore diameter of 2.5 µm. The specific surface area estimated by nitrogen adsorption-desorption isotherm measurement on silica monolith synthesized in batch-mode was of 580 m² g with a mean mesopore diameter of 7.0 nm. The monolith is anchored to the inner wall of the capillary, and displays a well-distributed network channel. The average permeability ($K_{p,f}$) of the monolith is $8 \pm 2 \times 10^{-14}$ m². Such a relatively high permeability values is a critical parameter for in-line coupling with CE. Low permeability materials are detrimental to current stability and band broadening during CE separation [58,59].

Photo-polymerization of phenyl boronic acid derivatives on silica surface was investigated in order to address the optimization requirements. The photografting procedure was performed on silica monoliths pre-functionalized with γ -MAPS using an acrylamide derivative of phenyl boronic acid (AAPBA), as shown in Figure 3.

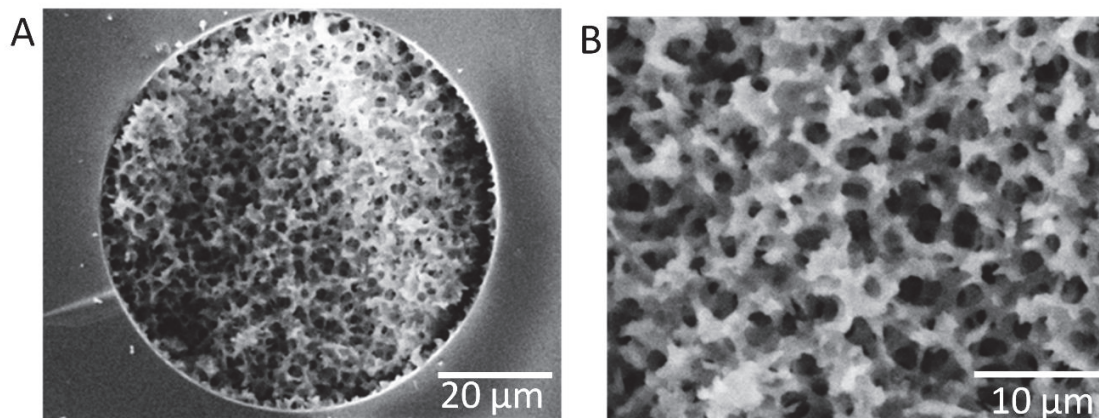


Figure 2. Scanning electron micrographs of monolithic silica columns prepared from tetramethoxysilane and methyltrimethoxysilane in a 75- μ m fused-silica capillary (2A, left) and magnification of the monolithic structure (2B, right).

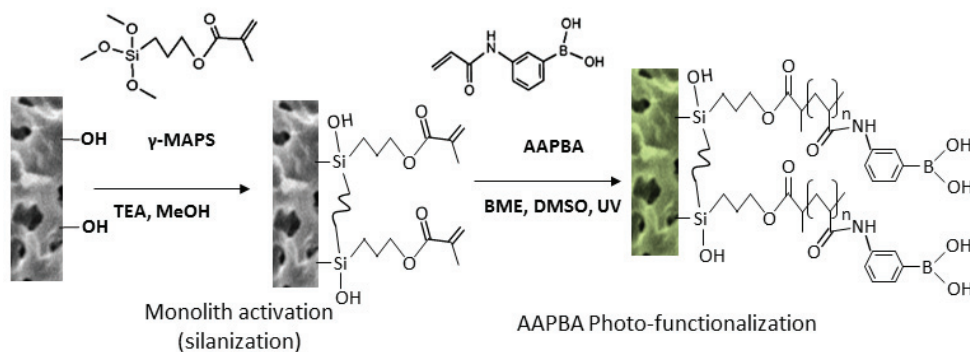


Figure 3. Schematic illustration of the silica monolith surface photo-functionalization with 3-(acrylamido)phenylboronic acid.

The free radical photopolymerization of AAPBA was initiated by UV irradiation (365 nm) using (benzoin methyl ether) BME or azobisisobutyronitrile (AIBN) as photoinitiator. The reaction conditions (concentration of monomer and co-monomer, concentration and type of photoinitiator, number of consecutive steps of photografting and UV irradiation time) were thus optimized in order to yield high surface grafting densities. It is worth noticing that, whatever the grafting conditions, the permeability of the monolithic columns was not significantly altered, thus leading to the conclusion that the

photofunctionalization 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 μm). No morphological modification was observed by SEM.

3.1.2. Optimization of AAPBA photopolymerization reaction

The total number of active sites is a key feature for affinity chromatographic columns. The higher the total number of active sites, the higher the binding capacity of the monolith and the higher the volume that can be percolated without any loss of analyte.

In batch mode, the direct determination of the binding capacity is often achieved by overloading the boronate affinity material using a solution with a high concentration (0.5-1.0 mg mL^{-1}) of cis-diol ligands: the decrease of the cis-diol ligand concentration in the solution is used to estimate the quantity of ligand that is complexed, which represents the binding capacity at a given concentration and not the number of total active sites. An issue with this direct method concerns the potential overestimation of the binding capacity if non-specific interactions (e.g. adsorption, electrostatic interactions) are not negligible [42,51,60]. In capillary, this binding capacity can be determined with a unique breakthrough curve registered at a high ligand concentration [23,52,61].

According to the work of Hage group [57,62], weak affinity chromatography in frontal mode is the most relevant method for the simultaneous determination of the total number of active sites and of the K_d value of the complex. Breakthrough curves with increasing ligand concentration solutions ($[L]$) are used to determine the number of apparent binding sites ($m_{B \text{ app}}$). The ligand concentrations have to be lower than the K_d value. The number of active AAPBA sites and the K_d value are obtained from the slope and y-axis intercept of the linear plot $1/m_{B \text{ app}}$ versus $1/[L]$. This methodology is useful for an in-capillary characterization of the photopolymerization reaction.

Catechol was used as cis-diol model molecule to probe the photografting reaction and hydroquinone was used to evaluate the specificity of the μBAMC . Indeed, hydroquinone is a positional isomer (non cis-diol) with comparable non-specific interaction than catechol with the solid support. Whatever the hydroquinone concentration (from 50 to 100 mg L^{-1}), the breakthrough curves of hydroquinone appear at the column dead-time, whereas the breakthrough curve plateaus are delayed for catechol. This result clearly indicates that no non-specific interactions occur and that the retention of catechol is solely due to boronate affinity (Supplementary material, Figure S1A).

Given the recognition experimental conditions used in this section, a K_d value of 290 μM (CV= 12 %, $n=6$ capillaries) was obtained for catechol from the plot $1/m_{B\text{ app}}$ versus $1/[L]$ (Supplementary material, Figure S1B) that is consistent with the reported value in the literature for catechol and phenyl boronic acid ($\sim 300 \mu\text{M}$) [63].

The screening of the experimental photografting conditions concerns first the concentration of monomer and the nature and concentration of the photoinitiator. Given the specific surface area of about $580 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, a density of silica monolith of about 0.3 g cm^{-3} (evaluated experimentally by weighing a monolith synthesized in batch mode) and a grafting density of γ -MAPS of about $1.4 \mu\text{mol m}^{-2}$ (determined by TGA in batch mode), the complete conversion of acrylate groups should require an AAPBA monomer concentration of 0.5-0.6 M (the grafting solution volume being limited to the void volume of the column) [36]. DMSO with a few quantity of water was reported to be a good solvent candidate for AAPBA solubilization [39]. Reaction was thus conducted in a DMSO/ H_2O , 97/3 (v/v) mixture. Figure 4A shows the straightforward relation between AAPBA concentration in the reaction mixture and the amount of active binding sites on the monolith. However, due to solubility and capillary clogging issues the monomer concentration was limited to 100 mM.

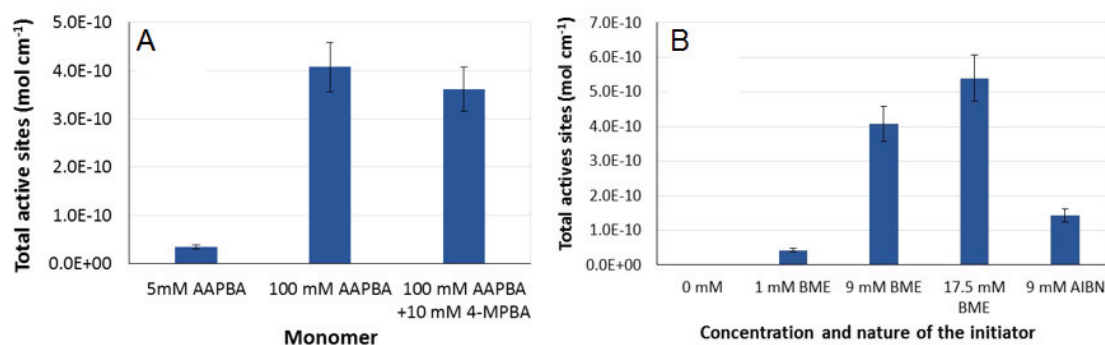


Figure 4. Number of total active sites measured by frontal analysis for different monomer concentrations (A, left) and nature and concentration of photoinitiators (B, right). Experimental conditions: capillary monolith was preconditioned with 15 mM Na_2HPO_4 pH 8.5 / MeOH (80/20, v/v) and then catechol solutions in 15 mM Na_2HPO_4 pH 8.5 / MeOH (80/20, v/v) were percolated at 0.09 cm s^{-1} till breakthrough. Thiourea was used as dead time marker. Total capillary length: 10 cm; length from injection to detection: 8.5 cm, i.d.: 75 μm , monolith length: 1-3 cm. Errors bars represent the standard deviation ($n=3$).

An attempt to increase the radical reaction and the incorporation of phenyl boronic acid derivatives, has concerned the addition of a small amount of 4-mercaptophenyl boronic acid (4-MPBA) to AAPBA in the reaction mixture. Indeed, thiol groups are known to be good chain transfer agents in free radical polymerization [64]. Neither the chain agent transfer effect nor the increase of the concentration of phenyl

boronic acid derivatives (acrylamide or thiol) has improved the amount of active sites (Figure 4A). Several successive irradiations with 50 mM or 100 mM AAPBA solution renewals [17] showed no significant difference on the binding capacity compared to a single step at 100 mM AAPBA (Supplementary material, Figure S2), which can be attributed to steric hindrance. Indeed, a second grafting step into the inner mesopores become poorly accessible after the first grafting step seems to limit the interest of this multiple grafting steps approach. Furthermore, two consecutive photopolymerization steps at 100 mM led to the clogging of the monolith during the percolation of the reaction mixture, which is why a single step photografting procedure at 100 mM AAPBA was selected.

The effect of the concentration and nature of the photoinitiator was evaluated as well (Figure 4B). All things being equals, BME led to a 2.5 times higher AAPBA binding sites content than AIBN. Subsequently, the concentration of BME was studied in a range between 1.0 and 17.5 mM, showing an increase in the AAPBA active sites content with increasing BME concentration. A concentration in BME of 9 mM was chosen for further experiments to ensure good solubility.

UV irradiance was a fixed parameter at 2.96 mW cm^{-2} at 365 nm, and the duration of irradiation was varied between 10 and 30 minutes (Supplementary material, Figure S3). The reaction reaches a threshold value as early as 10 minutes of irradiation. This result shows the high speed of mechanism of action of BME [65], i.e. the radicals are generated within the first minutes of UV irradiation. Furthermore, in order to verify the immobilization of AAPBA on the activated substrate through covalent bond (and not adsorption), the same photografting procedure was tested without photoinitiator. The frontal affinity chromatogram of this monolith showed no catechol retention, excluding any adsorption of AAPBA on the surface.

Finally, after the grafting step, the column-to-column reproducibility in terms of number of active sites was estimated through the relative standard deviation (RSD) to be 24 % ($n = 3$). This low photopolymerization reproducibility was attributed to AAPBA solubility and viscosity issues. Indeed, the high viscosity of the photografting solution prepared in DMSO (1.99 mPa s), as well as the possible partial precipitation of AAPBA (undetectable to the human eye) may hinder the reproducibility of the percolation of the reaction mixture inside the μBAMC (at constant pressure). As a consequence, the photografting procedure may differ significantly between monoliths depending on their permeability. Solvent replacement was thus investigated. Acetonitrile was chosen for its lower viscosity, even in mixture with water. Best results concerning the solubility of AAPBA were obtained with a water (pH 9) /acetonitrile (50/50, v/v) mixture. Triethylamine (TEA) was used to increase the pH of the aqueous fraction and to increase the ionization degree of AAPBA and thus its solubility. In addition to the hydrodynamic benefit,

this reaction solvent mixture yielded comparable results in terms of total active binding sites (Supplementary material, Figure S4) with an improved reproducibility of the photopolymerization reaction (RSD=14 %). The total active binding sites amount reached with these optimized experimental conditions was 0.43 ± 0.06 nmol of AAPBA per cm of monolith (i.e. about $32.7 \mu\text{mol g}^{-1}$ and $9.8 \mu\text{mol ml}^{-1}$). Our photochemical functionalization strategy, aiming to trigger locally the reaction onto the short monolithic segment at the inlet of the monolith, gives rise to binding capacity in the same order of magnitude than reported values for phenylboronate monolithic capillary columns [23,24,42,44,52,66,67]. Higher binding capacities were obtained via strategies that increase the number of reactive sites, i.e post-synthesis modification of organic monolith surface with polyethyleneimine [44], surface-initiated controlled radical polymerization and dendrimer on particulate materials [46,54]. Such functionalization pathways are not easily amenable in capillary format. For instance, in addition to generate undesirable secondary electrostatic interactions, PEI surface modification, if residual reactive amine groups persist after PEI surface modification, would lead to reversed electroosmotic flow in the monolithic segment that is detrimental to the in-line coupling.

3.2. Optimization of the operating conditions of the μBAMC unit

3.2.1. In-capillary percolation and recognition step

The affinity of cis-diol-containing compounds for boronic acids depends greatly on the experimental conditions of recognition (pH, ionic strength, addition of organic modifier) i.e. on the conditions of in-line percolation. Catechol was chosen as model compound owing to the similarity of its structure with the catecholamines of interest. The cyclic ester formation is promoted for the anionic tetrahedral species (boronate anions) at a pH value higher than the pKa value of AAPBA (pKa 8.2). However, some studies have demonstrated the ability to capture cis-diol-containing compounds by phenyl boronic acids at a lower pH than their pKa [52]. The influence of pH on the K_d value was thus investigated in a pH range between 7 and 9.5 (Figure 5A). From pH 7 to pH 9, the K_d value drops drastically to a threshold value. At a pH value higher than pH 9, the partial ionization of one hydroxyl group of catechol may impair the complex formation (increase of the K_d value) owing to electrostatic repulsions with boronate ions [68,69,67].

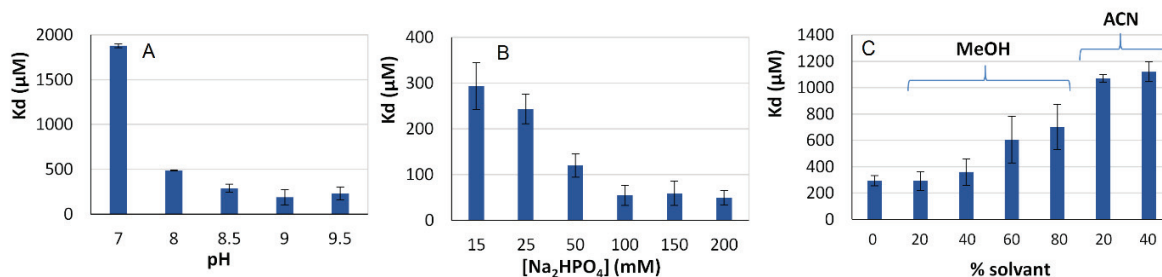


Figure 5. Influence of the experimental conditions on the catechol-boronate affinity. Thiourea was used as dead time marker before percolation of each catechol solution at $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. Total capillary length: 10 cm; length from injection to detection: 8.5 cm, i.d.: $75 \mu\text{m}$, monolith length: 2.4 cm. The optimization of the recognition conditions was studied for several pH at 15 mM Na_2HPO_4 / MeOH (80/20, v/v) (A), Na_2HPO_4 concentration at pH 8.5 and without solvent (B) and nature and concentration of organic modifier at 15 Na_2HPO_4 pH 8.5 (C), of the solution of percolation. Error bars represent the standard deviation ($n=3$).

The ionic strength of the percolation solution also influences the affinity. Indeed, a high ionic strength is usually used to screen electrostatic interactions. Such a high ionic strength solution can increase the affinity of anionic cis-diol compounds for boronate (electrostatic repulsion screened) and could decrease non-specific interactions of cationic compounds to boronate. Conversely, it can increase non-specific hydrophobic interactions [68]. The influence of the concentration of Na_2HPO_4 in the percolation solution was studied between 15 and 200 mM (Figure 5B). The K_d value decreases between 15 and 100 mM phosphate concentration (i.e. the affinity increases) without significant variation at higher ionic strengths.

The addition of an organic modifier to the percolation solution may be helpful to reduce non-specific interactions with the solid support, i.e. to increase the specificity of the preconcentration step. However, it may impair the affinity. The influence of the nature and concentration of two organic modifiers (acetonitrile and methanol) on boronate affinity was investigated (Figure 5C). Whereas the addition of acetonitrile drastically decreases the affinity (K_d increases), methanol can be added up to 40 % in volume without any significant affinity variation.

Further percolation experiments were realized using a 100 mM phosphate buffer at pH 8.5 with addition of 20 % in volume of methanol, since these conditions allow a high affinity of catechol towards the μBAMC ($K_d = 290 \mu\text{M}$) without the presence of non-specific interactions (Supplementary material, Figure S5). The performances of the μBAMC were then evaluated through the estimation of extraction yields, the determination of the linearity and the determination of the maximum volume to be percolated.

3.2.2. In-capillary recovery yield

The quantitative recovery of the percolated molecules is important for quantitative analysis. Given the small volume occupied by the μ BAMC at the inlet of the capillary (few tenth of nL), flow the conditions of percolation need to be investigated in order to avoid breakthrough of the solutes and/or overloading of the column. The recovery yields were studied (i) by percolating a constant volume of increasing catechol concentration solutions (Figure 6A) and (ii) by percolating variable volumes of constant catechol concentration solution (Figure 6B). The elution was promoted by percolating a 50 mM AcOH / MeOH (80/20, v/v) mixture and the recovered quantity was determined using the peak area of the eluted catechol peak.

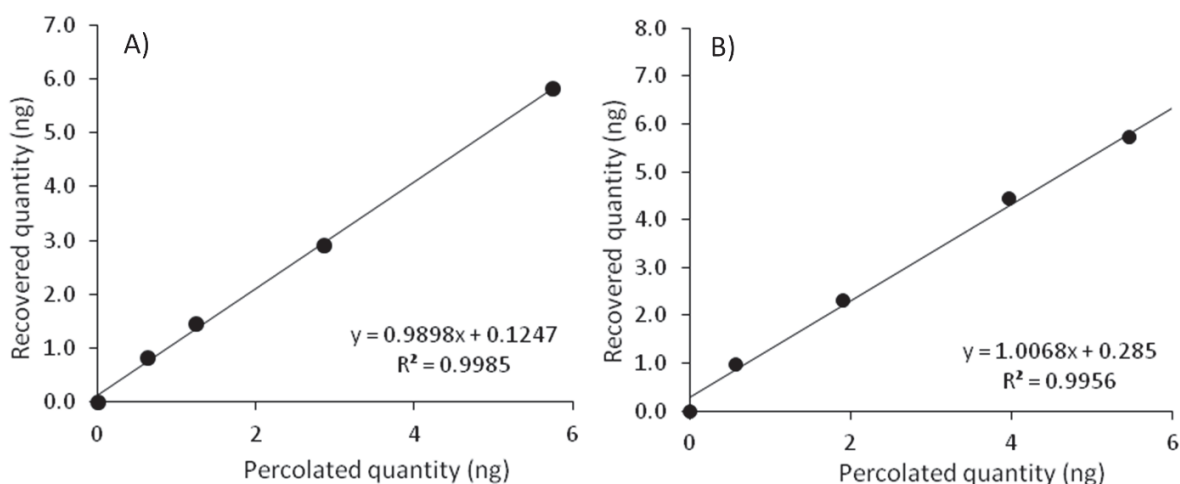


Figure 6. Plots of the recovery yields obtained on the μ BAMC for increasing quantities of catechol. A) percolation of a constant volume (24 nL) of catechol solutions ranging from 0.23 to 2.3 mM, B) percolation of various volumes (ranging from 28 nL to 335 nL) of a constant catechol solution concentration (0.18 mM). All catechol solutions were prepared in 15 mM Na_2HPO_4 pH 8.5 / MeOH (80/20, v/v). Thiourea was used as dead time marker. Total capillary length: 10 cm; length from injection to detection: 8.5 cm, i.d.: 75 μm ; monolith length: 1.8 cm.

The percolation of a small volume of catechol solution (about 30 % of the monolith dead volume) ensures that recovery yields are directly related to the catechol quantities (from 0 to 6 ng i.e. from 0 to 0.06 nmol) injected into the monolithic column (no volume overload, no quantity overload). In the investigated concentration range (from 0.23 to 2.3 mM), the plot of the recovered quantity versus the percolated quantity follows a linear relationship ($R^2 > 0.99$) with a slope of 0.99 indicating a quantitative recovery of the percolated catechol (Figure 6A). Further experiments were performed by percolating (at 0.05 cm s^{-1}) increasing volumes of a low concentration of standard catechol solution (0.18 mM). The

recovery of catechol is about 100 % (Figure 6B) demonstrating the suitability of the μ BAMC to preconcentrate catechol.

It was determined that the recovery yield drops after percolation of 20 to 25 dead volumes of monolith (total amount percolated largely inferior to the total capacity of the monolith). This result is consistent with numerical simulation based on the K_d value according to Kim et Wainer [57].

The retention factor (k) for catechol can be estimated through the K_d value according to equation (3)

$$k = \frac{1}{K_d} \frac{m_B}{V_m} \quad (3)$$

A retention factor of about 30 is calculated with the experimental K_d value of 290 μ M, a total number of active sites (m_B) of 0.4 nmol cm^{-1} of monolith and a dead volume (V_m) of 40 nL for a 1-cm monolithic column length.

The migration velocity of catechol in the μ BAMC (u') can be estimated by equation 4,

$$u' = \frac{u}{1+k} \quad (4)$$

where u is the mobile phase velocity. In other words, the maximum volume of percolation before elution of a fraction of catechol should be about 30 times the monolith dead volume.

Experimentally, the breakthrough is obtained between 20 to 25 dead volumes that is in good agreement with the estimated value. This is a key specification to the implementation of μ BAMC. Indeed, preconcentration factor is directly related to the volume of sample that can be percolated into the analytical microsystem. Such maximum volume of percolation is a limitation compared to high affinity SPE (immunopreconcentration) or reversed-phase chromatography when highly apolar compounds (exhibiting high retention factors in aqueous mobile phase) are targeted. In order to avoid misinterpretation standing from the widespread “covalent bonding” concept, we think that it is important here to highlight that the extraction/elution process is not an on/off process where the volume of sample being loaded would be dictated solely by the total binding capacity of the column. Limit of detection is thus related to the maximum of sample volume that can be percolated until breakthrough. A compromise has to be made between the length of monolithic the preconcentration unit, the time of percolation and the limit of detection. Anyway, higher surface density of boronate sites is benefit.

3.3. Application of the in-line coupling for catecholamines purification/preconcentration, separation and detection

For further experiments, a 35-cm composite capillary containing a 1.2 cm μ BAMC unit at its head was used. Such configuration is able to capture up to 0.5 nmol of small cis-diol-containing compounds, which is high enough regarding the catecholamines concentration expected in real samples.

One key feature of in-line coupling is to ensure a full compatibility of all individual steps gathered in a single capillary tubing: μ BAMC preconditioning, sample percolation at basic pH, washing, elution-desorption at acidic pH, CZE separation and UV-Vis detection.

For example, preconcentration of catechol was optimized, herein, in basic conditions, whereas electrophoretic separation of dopamine, noradrenaline and adrenaline (DA, NA, A) is usually performed in an acidic background electrolyte (BGE) [70–73] or under basic conditions using borate buffers [34,74,75]. Flushing the capillary with acidic BGE or borate buffer after sample percolation is precluded. Such incompatibility was addressed by investigating the electrophoretic separation of catecholamines in basic BGE. Since the electrophoretic mobility differences between DA, A and NA are larger at pH values close to their pKa values (8.89, 8.55 and 8.40 for DA, A and NA respectively), the electrophoretic separation was investigated between pH 8.3 and 9. The highest resolution was obtained in phosphate buffer at pH 8.75. In order to maintain a solvent continuity with the percolation solvent, dibasic sodium phosphate buffer was selected but at a lower concentration (15 mM) to limit joule effect. Addition of an organic modifier to the BGE was also studied (data not shown). MeOH gave better results than acetonitrile. Indeed, the higher viscosity of the H₂O/MeOH solution yields to lower electroosmotic mobilities and higher resolution for the three catecholamines. The optimum MeOH content, in terms of resolution, was obtained at 40 %. Triethylamine (TEA) was added to the BGE in order to further reduce the electroosmotic flow and to participate to the reduction of the interaction of catecholamines with the silanoates (Supplementary material, Figure S6). The addition of 0.05 % of TEA (35.7 mM) to the 15 mM Phosphate buffer/MeOH (60/40, v/v) results in an overall increase of the peak resolution, especially for A and NA peaks which have closer pKa.

The performances (in terms of dispersion) of the electrophoretic separation are intimately related to the initial conditions of the sample zone (especially its conductivity and its length). The elution of CAs from the μ BAMC is realized in acidic conditions. The in-line coupling design implies to inject an acidic plug in a basic BGE. Since the length of the acidic elution plug should be at least larger than the μ BAMC, the volume of the acidic elution plug is large compared to a standard injection length plug in capillary

electrophoresis. The conductivity of this zone and the nature of the acid used can be judiciously selected to limit the dispersion (band broadening) due to this sample zone. Ideally, field amplified sample stacking in the sample zone can drastically reduce dispersion and thus increase resolution and detection. Among the different acids tested (acetic acid, ortho-phosphoric acid, formic acid and iminodiacetic acid), acetic acid at 50 mM was chosen for the elution plug with respect to peak asymmetry, conductivity and resolution parameters. The conductivity differences between the BGE and the acidic plug with 40 % (v/v) MeOH (2.9 and 0.16 μS , respectively) promotes sample stacking effect.

Final experimental coupling conditions were (i) percolation of sample on the μBAMC in a 15 mM phosphate buffer, 35.7 mM TEA (pH 8.75)/MeOH, 60/40 (v/v) solvent, (ii) elution of catecholamines from the μBAMC by injecting a 50 mM AcOH / 40 % MeOH plug and (iii) electrophoretic separation of catecholamines in a 15 mM Na_2HPO_4 , 35.7 mM TEA pH 8.75 / 40 % MeOH BGE. Moreover, during the separation step, the higher voltage applied, avoiding joule effect, was 15 kV, and it was noted that a better peak symmetry was obtained when a voltage step of 15 kV having the acidic elution solution at the anode and BGE at the cathode during 3 min is added between the elution and separation steps. The sketch of the whole process is presented in Figure S7 (Supplementary material).

Figure 7 shows a comparison of the electropherogram obtained in a fused silica capillary without any preconcentration step, with the electropherogram obtained after in-line preconcentration of a 25 times diluted CAs sample highlighting the preconcentration effect.

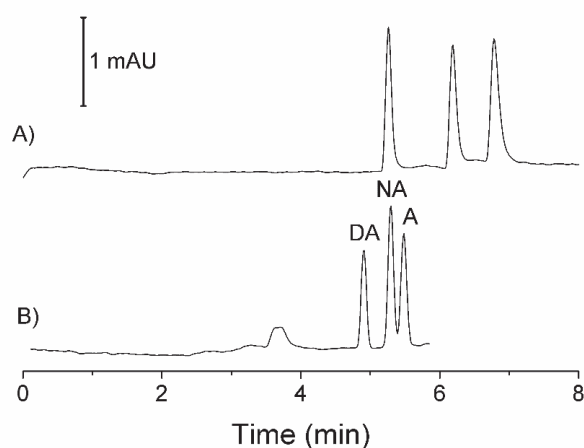


Figure 7. Electrophoretic separation of DA, A and NA in 15 mM phosphate, 35.7 mM TEA (pH 8.75) / MeOH (60/40, v/v) BGE. A) Catecholamines at $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ in 50 mM AcOH / MeOH (60/40, v/v) was injected at 0.03 cm s^{-1} (10 mbar during 64 s) in a silica fused capillary, then 15 kV were applied using 15mM phosphate 35.7 mM TEA (pH 8.75) / MeOH (60/40, v/v) as BGE. B) In-line analysis using catecholamines at 200 ng mL^{-1} (in 15mM phosphate (pH 8.5) / MeOH (60/40, v/v)) with μBAMC monolith. The percolation volume represents 25 dead volumes, equivalent to 1.3

μL and was percolated at 0.09 cm s^{-1} ; the elution plug equivalent to 1.5 monolith volume was injected at 0.02 cm s^{-1} and 15 kV voltage was applied during 3 minutes with elution solution at the anode and BGE at the cathode during 3 min, then, 15 kV was applied with BGE at anode and cathode. Total capillary length: 32.6 cm, i.d.: $75\mu\text{m}$; μBAMC length: 1.2 cm.

3.4. Linearity and limits of detection

The linearity and limits of detection (LOD) were determined for the in-line coupling strategy using a composite capillary containing a 2.7-cm μBAMC monolith at its head. Considering the maximum volume of percolation previously determined, i.e. 20 dead volumes of monolith (equivalent to $2.5\text{ }\mu\text{L}$), standard solutions of DA, A and NA at concentrations between 50 and 300 ng/mL were percolated. . Figure 8 shows an electropherogram at 50 ng mL^{-1} of catecholamines, where it can be noted the three peaks with a ratio S/N of about 20. The linearity of the overall method is demonstrated by plotting the corrected peak areas versus the analyte concentration (Supplementary material, Figure S8).

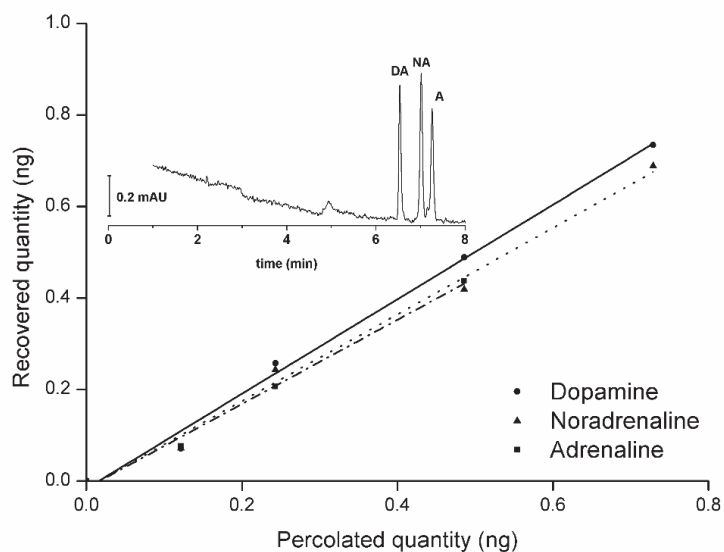


Figure 8. Plot of the recovery yields obtained for increasing quantities of catecholamines by in-line coupling of preconcentration, separation and detection on a composite capillary, and electropherogram at 50 ng mL^{-1} . Catecholamines standard solutions at 50, 100, 200 and 300 ng mL^{-1} were analyzed with μBAMC monolith. 20 dead volumes of catecholamines solution in 15mM phosphate, 35.7 mM TEA (pH 8.75) / MeOH (60/40, v/v), equivalent to $2.5\text{ }\mu\text{L}$, were percolated at 0.09 cm s^{-1} , elution plug equivalent to 1.5 monolith volume was injected at 0.02 cm s^{-1} and 15 kV voltage was applied during 3 minutes with elution solution at the anode and BGE at the cathode during 3 min, then, 15 kV was applied with BGE at anode and cathode. Total capillary length: 35.7 cm, i.d.: $75\mu\text{m}$; μBAMC length: 2.7 cm.

In addition, LODs ($S/N=3$) were estimated at 9.0, 9.5 and 4.8 ng mL⁻¹ for DA, A and NA respectively. Compared to other CE methods used in the literatures, this in-line coupling largely improves reported LODs [70–72,76]. Indeed, it is well-known that capillary electrophoresis is a powerful separation technique but that its sensitivity (i.e. UV detection) can be seen as its Achilles heel. The in-line coupling with a boronate affinity-based sample preparation step allows reaching LODs comparable to those of standard off-line and on-line HPLC UV methods [33,45,46].

Thus, this in-capillary μ -SPE-CZE coupling allows to reach LODs close to the concentrations found in urine sample without the need of complex detection (electrochemical detection, mass spectrometry or fluorescence system) or derivatization step of analytes. Indeed, the concentration of catecholamines in urine samples usually ranges between 10 and 400 ng mL⁻¹ [22,30,56,71,77] depending on the health condition of the patient.

3.5. Recovery yield of catecholamines using the in-line coupling

The recovery yields for DA, A and NA were studied by percolating a constant volume (20 monolith dead volumes equivalent to 2.5 μ L) of increasing catecholamines' concentration solutions and following the preconcentration, separation and detection steps for in-line coupling as described in Figure S7 (Supplementary material).

The plot of the recovered quantity versus the percolated quantity (Figure 8) follows a linear relationship ($R^2 > 0.99$) for all catecholamines with a slope of 0.103, 0.920 and 0.946 for DA, A and NA respectively, indicating a quantitative recovery of the percolated catecholamines. The recovery yield of these 3 catecholamines are between 92 and 103 % demonstrating the suitability of the in-line coupling.

3.6. Proof of feasibility: Application of the in-line coupling to urine real sample analysis

The purification capacity of the developed in-line μ -SPE-CZE system was evaluated through urine samples analysis. To outline the purification requirement of catecholamines analysis in complex matrices like urine, non-spiked urine samples (adjusted at pH 2.9 with pure AcOH, centrifuged and 0.22- μ m-filtered) were analyzed with and without the preconcentration step on the μ BAMC. The corresponding electropherograms are given (Figure 9A and 9B). It is impossible to distinguish the catecholamine peaks when no preconcentration/purification step is performed (Figure 9A). The electropherogram exhibits a

massive and broad terminal band attributed to interfering solutes. Conversely, when the same urine sample was analyzed according to the procedure sketched in Figure S7, the three catecholamines were detected (Figure 9B). Peak attribution was confirmed by spiking urine with one catecholamine (Supplementary materials, Figure S9). The in-line coupling allows not only to preconcentrate cis-diols containing compounds in presence of interfering substances but also to purify the sample prior to the elution and their electrokinetic analysis.

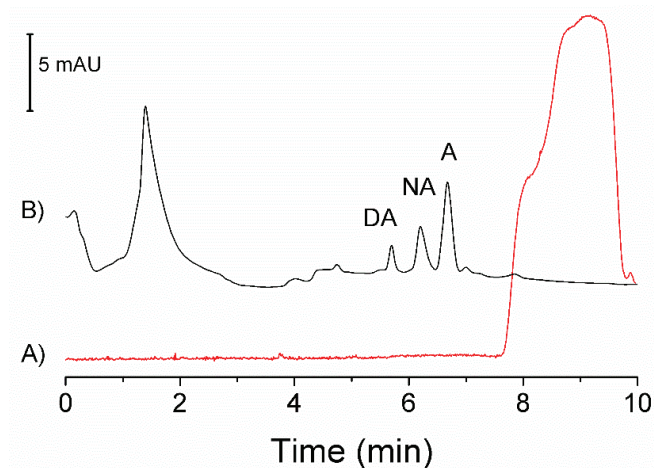


Figure 9. CE analysis of urine sample without monolith A) 0.2 μL of non-spiked urine was injected at 0.03 cm s^{-1} (10 mbar during 150 s) in a silica fused capillary, then 15 kV were applied using 15mM phosphate, 35.7 mM (pH 8.75) / MeOH (60/40, v/v) as BGE. B) In-line analysis of DA, A and NA in non-spiked urine sample, 20 dead volumes of urine sample (15mM phosphate, 35.7 mM TEA (pH 8.75) / MeOH (60/40, v/v)), equivalent to 2.5 μL , were percolated at 0.09 cm s^{-1} , elution plug equivalent to 1.5 monolith volume was injected at 0.02 cm s^{-1} and 15 kV voltage was applied during 3 minutes with elution solution at the anode and BGE at the cathode during 3 min, then, 15 kV was applied with BGE at anode and cathode. Total capillary length: 36.3 cm, i.d.: 75 μm ; μBAMC length: 2.8 cm.

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

The stability and lifetime of the AAPBA functionalized monolith was satisfactory since more than 70 analyses could be done with the same 1-3 cm monolith at the capillary head. The only concern that was observed was clogging of the monolith after long periods of use, even when all the solutions were filtered on 0.22 μm filter before percolation. However, this issue can be easily circumvented with long-lasting rinsing with MeOH or by cutting 1 mm at the inlet end of the monolith to eliminate the clogged section and restore permeability.

4. Conclusion

A new miniaturized and localized boronate affinity monolithic column (μ BAMC) was developed at the inlet extremity of a 75- μ m inner diameter fused silica capillary tube. The obtained composite capillary was used for the in-line preconcentration and purification of cis-diol neurotransmitters before by their in-line separation and UV-detection. The monolith (1-3-cm length) was locally synthesized at the inlet the capillary tube by sol-gel process. Photopolymerization of 3-(acrylamido)phenylboronic acid (AAPBA) monomer on the acrylated prefunctionalized silica monolith was investigated to locally functionalize the monolith with phenylboronate moieties. Frontal affinity chromatography was used to characterize the μ BAMC using catechol as model solute. The miniaturized affinity columns present a total number of active phenyl boronate grafted sites of 0.43 nmol per cm of monolith with a K_D value of 290 mM. Capture conditions were fully optimized. Percolation in a 100 mM phosphate solution buffered at pH 8.5 in presence of 20 % (in volume) of methanol as organic modifier was demonstrated to be optimal with respect to affinity and non-specific interaction issues. A volume up to 20 times the monolith volume can be percolated with a quantitative recovery yield allowing preconcentration of catecholamines. The elution and electrophoretic separation steps were adapted and optimized to ensure their full compatibility for the in-line coupling. The elution of the captured cis-diol compounds in a small acidic plug was demonstrated to allow their quantitative elution as well as their field-amplified stacking before their capillary zone electrophoresis separation. The separation conditions were optimized for the separation of adrenaline, noradrenaline and dopamine. The in-line coupling was successfully implemented to analyze catecholamines neurotransmitters in less than 2 μ l of complex urine samples within 10 minutes and in a fully automated way. The potential of this innovative in-line approach using this new μ BAMC will be further explored for the analysis of other cis-diol compounds, sialic acids, glycoproteins and glycans.

5. Supplementary Material

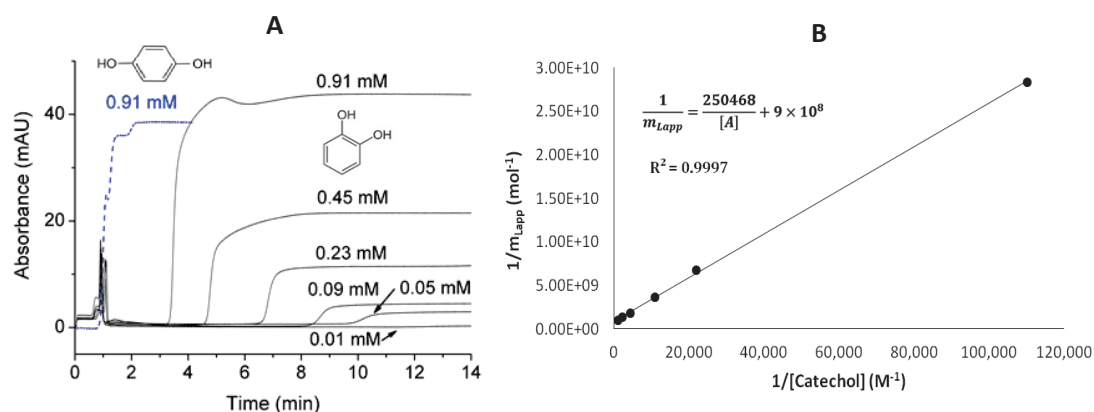


Figure S1. A) Breakthrough curves obtained for different concentrations of catechol solutions and hydroquinone at 100 mg L^{-1} in phosphate buffer $15 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, pH 8.5 / MeOH (80/20, v/v) and B) plot of the $1/m_{B \text{ app}}$ versus $1/[A]$ for catechol.

Hydroquinone and catechol are two positional isomers. Hydroquinone is eluted at the dead-volume while catechol (cis-diol compound) exhibits retention times that depend of the solution concentration. The volume of retention at each concentration condition ($[L]$) was used to estimate the quantity of “captured” catechol ($m_{B \text{ app}}$). The plot of $1/m_{B \text{ app}}$ versus $1/[L]$ for catechol is linear. This plot was used to determine the total number of active sites (m_B) and the K_d of the catechol- μBAMC interaction.

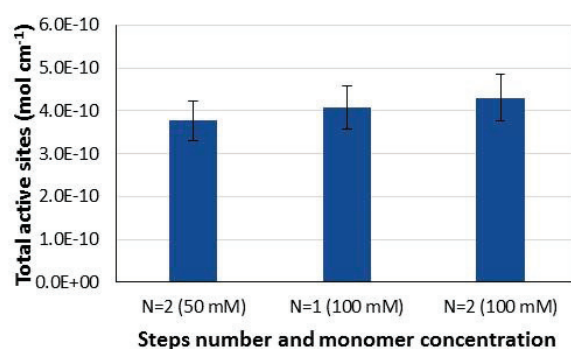


Figure S2. Influence of the number of successive grafting steps and concentration in AAPBA on the number of total active sites grafted on the silica monolithic column. The concentrations of BME was set at 9 mM respectively, in a DMSO/ H_2O (97/3, v/v) mixture and a single irradiation at 365 nm for 10 min was used. Total actives sites were determined by frontal analysis as described in Figure S1. Errors bars represent the standard deviation ($n=3$).

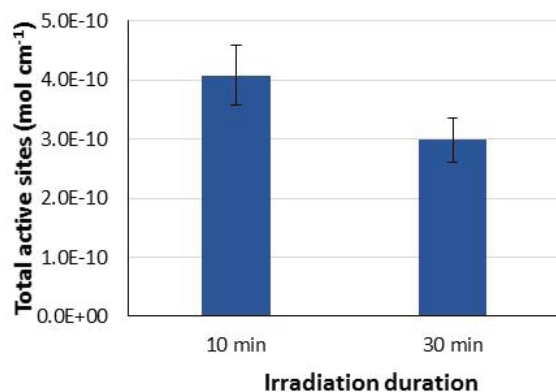


Figure S3. Influence of the duration of single irradiation at 365 nm on the number of total active sites on the silica monolithic column. The concentrations of AAPBA and BME were set at 100 mM and 9 mM respectively, in a DMSO/H₂O (97/3, v/v) mixture. Total active sites were determined by frontal analysis as described in Figure S1. Errors bars represent the standard deviation (n=3).

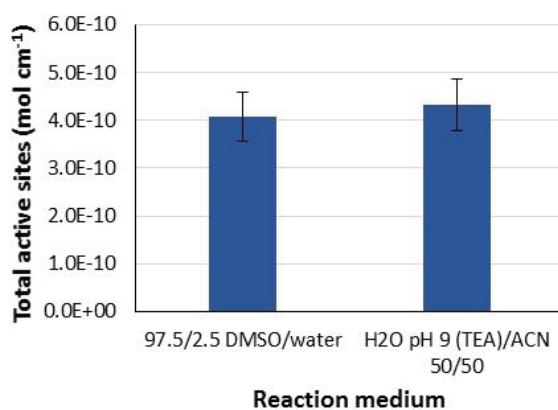


Figure S4. Influence of the solvent mixture on the number of total active sites grafted on the silica monolithic column. The concentrations of AAPBA and BME were set at 100 mM and 9 mM respectively, and a single irradiation at 365 nm for 10 min was used. Total number of active sites was determined by frontal analysis as describe in Figure S1. Errors bars represent the standard deviation (n=3).

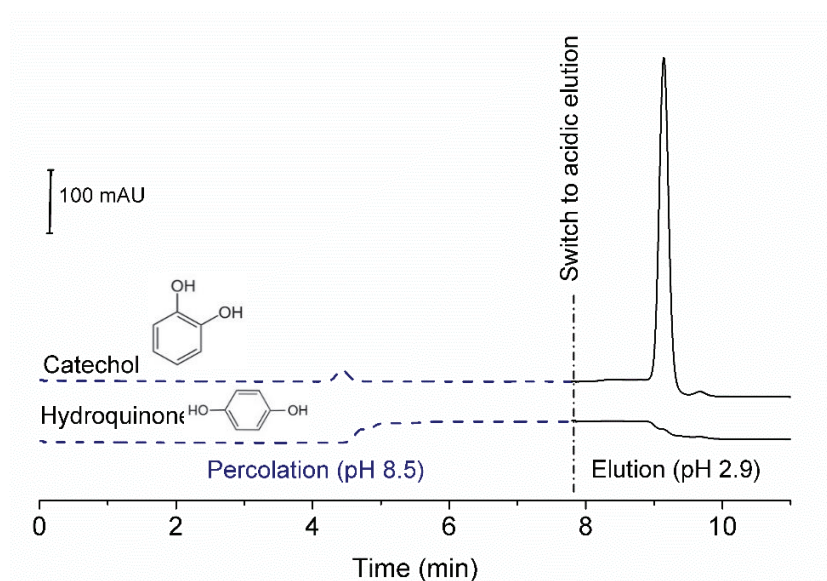


Figure S5. Comparison of the profile plot of the percolation and elution obtained with a standard solution of catechol and hydroquinone at 100 mg L^{-1} . The μBAMC length was 2-cm at the inlet of a 10-cm total length fused silica capillary. Solution of percolation was 15 mM Na_2HPO_4 phosphate buffer (pH 8.5) / MeOH (80/20, v/v). The percolation was carried out at 6 bar. Elution solution consists of a 50 mM acetic acid (pH 2.9) / MeOH (80/20, v/v). The elution was performed at 0.04 cm s^{-1} .

The specificity of the AAPBA monolithic support in terms of cis-diols compounds retention was studied using two structurally analogous molecules, catechol as cis-diol molecule model and its position isomer hydroquinone as a possible interference, both at a concentration of $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ in 15 mM Na_2HPO_4 pH 8.5 / MeOH (80/20, v/v). Each compound was percolated continuously and separately at alkaline pH and then eluted at acid pH. During percolation of each compound at basic pH, it can be noted that hydroquinone, unlike catechol, is detected at the dead time represented by a height change of the base line at this time, which suggest no retention on the monolith. Additionally, during the acid elution a peak corresponding to the previously captured catechol can be observed, meanwhile for hydroquinone there is no peak indicating that it has been retained. This results indicates the capture of cis-diols compounds is highly specific. Nor the underlying silica network or the phenylboronic acid moieties gave rise to non-specific interaction with compounds of similar structures.

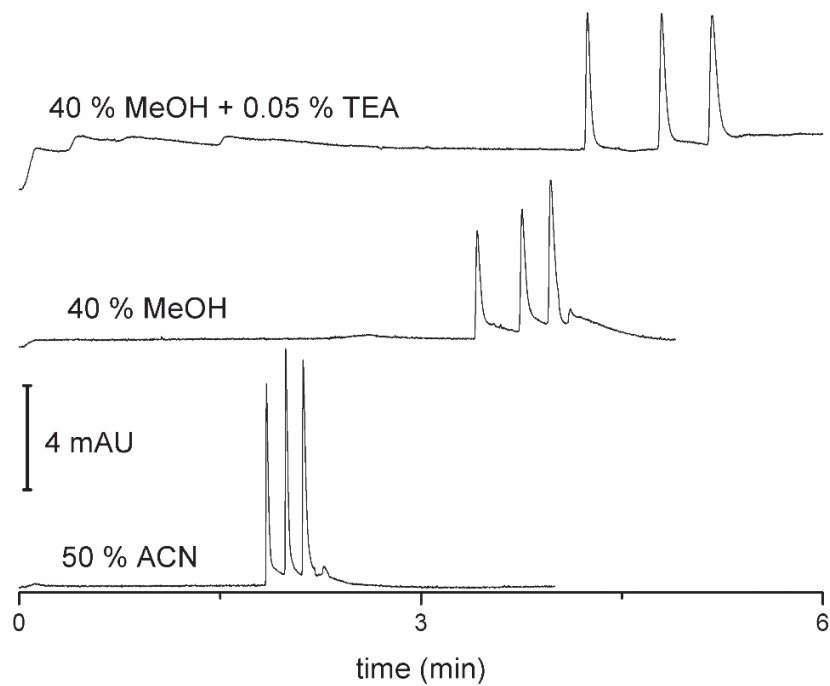


Figure S6. Electrophoretic separation of DA, A and NA at $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ in water. Sample was injected at 0.03 cm s^{-1} (10 mbar during 2 s) in a silica fused capillary, then 15 kV were applied using 15mM phosphate (pH 8.75) as BGE with the addition of 50 % (v/v) ACN, 40 % (v/v) MeOH, and with 0.05 % (v/v) TEA before pH adjusting and 40 % (v/v) MeOH .

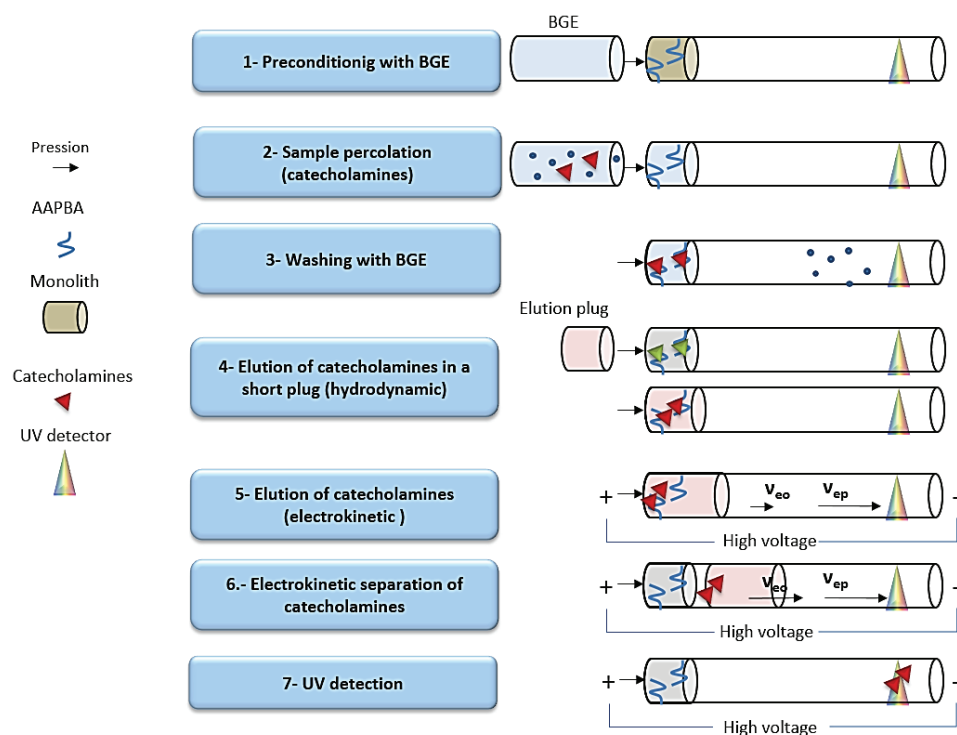


Figure S7. Principle of the in-line coupling of purification/preconcentration and CE separation of catecholamines.

Figure S7 is a sketch of the optimized in-line coupling method. Step 1, the preconditioning of the monolith with BGE to activate the AAPBA for complexation. Step 2, the sample containing the catecholamines (CAs) at alkaline pH is percolated through the monolith. Step 3, the boronate affinity monolith is washed with the BGE to eliminate non-retained compounds. Step 4, a short plug of elution solution allows for disrupting the cis-diol-boronate complexes releasing the CAs in the open section of the capillary. Step 5, a short voltage step of 3 min is applied at 15 kV between elution solution (anode) and BGE (cathode). Step 6, the electrokinetic separation is achieved with the separation electrolyte and applying voltage and pressure at both capillary endings. Step 7, catecholamines are detected by UV-Vis absorbance at 214 and 282 nm.

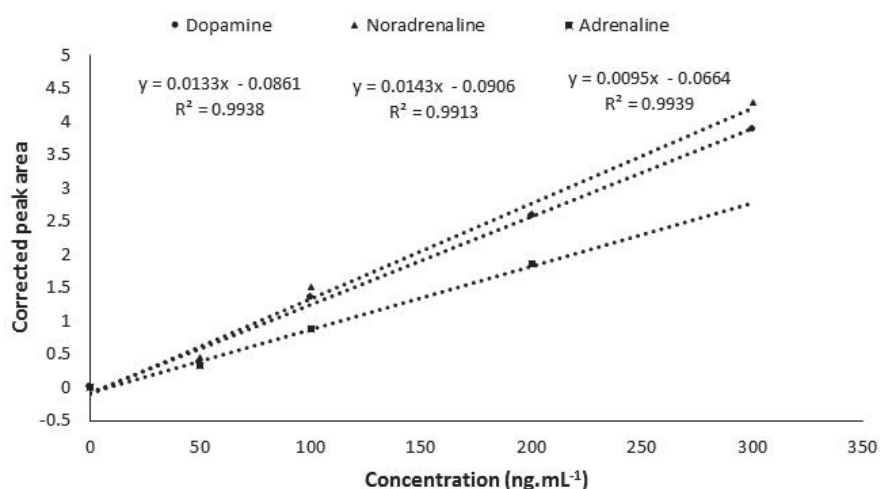


Figure S8. Plot of the corrected areas versus analytes concentration percolated on a composite capillary. Catecholamines standard solutions at 50, 100, 200 and 300 ng mL⁻¹ were analyzed with μ BAMC monolith. 20 dead volumes of catecholamines solution in 15mM phosphate, 35.7 mM TEA (pH 8.75) / MeOH (60/40, v/v), equivalent to 2.5 μ L, were percolated at 0.09 cm s⁻¹, elution plug equivalent to 1.5 monolith volume was injected at 0.02 cm s⁻¹ and 15 kV voltage was applied during 3 minutes with elution solution at the anode and BGE at the cathode during 3 min, then, 15 kV was applied with BGE at anode and cathode. Total capillary length: 35.7 cm, i.d.: 75 μ m; μ BAMC length: 2.7 cm.

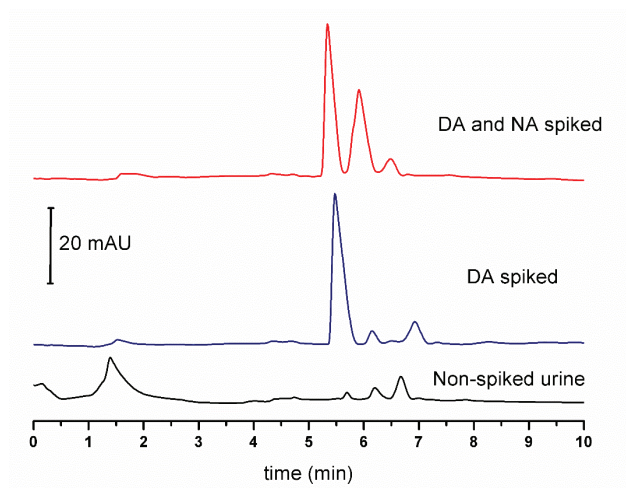


Figure S9. In-line analysis of DA, and A and NA spiked urine sample, 20 dead volumes of urine sample (15mM phosphate, 35.7 mM TEA (pH 8.75) / MeOH (60/40, v/v)), equivalent to 2.5 μ L, were percolated at 0.09 cm s⁻¹, elution plug equivalent to 1.5 monolith volume was injected at 0.02 cm s⁻¹ and 15 kV voltage was applied during 3 minutes with elution solution at the anode and BGE at the cathode during 3 min, then, 15 kV was applied with BGE at anode and cathode. Total capillary length: 36.3 cm, i.d.: 75 μ m; μ BAMC length: 2.8 cm.

6. References

- [1] L. Vio, G. Crétier, F. Chartier, V. Geertsen, A. Gourgiotis, H. Isnard, J.-L. Rocca, Separation and analysis of lanthanides by isotachopheresis coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry, *Talanta*. 99 (2012) 586–593.
- [2] J. Néri-Quiroz, F. Canto, L. Guillerme, L. Couston, A. Magnaldo, V. Dugas, Miniaturizing and automation of free acidity measurements for uranium (VI)-HNO₃ solutions: Development of a new sequential injection analysis for a sustainable radio-analytical chemistry, *Talanta*. 159 (2016) 330–335.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] Á. Yone, M.L. Rusell, 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.
- [9] E. Hernández, 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.
- [10] 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.
- [11] J.R.E. Thabano, M.C. Breadmore, 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.
- [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] 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.

- [14] 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.
- [15] S. Medina-Casanellas, F. Benavente, J. Barbosa, V. Sanz-Nebot, Transient isotachopheresis in on-line solid phase extraction capillary electrophoresis time-of-flight-mass spectrometry for peptide analysis in human plasma, *Electrophoresis.* 32 (2011) 1750–1759.
- [16] Y. Wang, B.R. Fonslow, C.C.L. Wong, A. Nakorchevsky, J.R. Yates, Improving the Comprehensiveness and Sensitivity of Sheathless Capillary Electrophoresis–Tandem Mass Spectrometry for Proteomic Analysis, *Anal. Chem.* 84 (2012) 8505–8513.
- [17] A. Marechal, F. Jarrosson, J. Randon, V. Dugas, C. Demesmay, In-line coupling of an aptamer based miniaturized monolithic affinity preconcentration unit with capillary electrophoresis and Laser Induced Fluorescence detection, *J. Chromatogr. A.* 1406 (2015) 109–117.
- [18] D. Schaller, E.F. Hilder, P.R. Haddad, Separation of antidepressants by capillary electrophoresis with in-line solid-phase extraction using a novel monolithic adsorbent, *Anal. Chim. Acta.* 556 (2006) 104–111.
- [19] 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.
- [20] S. Medina-Casanellas, Y.H. Tak, F. Benavente, V. Sanz-Nebot, J.S. Toraño, G.W. Somsen, G.J. de Jong, Evaluation of fritless solid-phase extraction coupled on-line with capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of opioid peptides in cerebrospinal fluid, *Electrophoresis.* 35 (2014) 2996–3002.
- [21] E. Giménez, F. Benavente, C. de Bolós, E. Nicolás, J. Barbosa, V. Sanz-Nebot, Analysis of recombinant human erythropoietin and novel erythropoiesis stimulating protein digests by immunoaffinity capillary electrophoresis–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 2574–2582.
- [22] X. Yang, Y. Hu, G. Li, Online micro-solid-phase extraction based on boronate affinity monolithic column coupled with high-performance liquid chromatography for the determination of monoamine neurotransmitters in human urine, *J. Chromatogr. A.* 1342 (2014) 37–43.
- [23] Q. Li, C. Lü, Z. Liu, Preparation and characterization of fluorophenylboronic acid-functionalized monolithic columns for high affinity capture of cis-diol containing compounds, *J. Chromatogr. A.* 1305 (2013) 123–130.
- [24] H.-P. Jiang, C.-B. Qi, J.-M. Chu, B.-F. Yuan, Y.-Q. Feng, Profiling of cis-Diol-containing Nucleosides and Ribosylated Metabolites by Boronate-affinity Organic-silica Hybrid Monolithic Capillary Liquid Chromatography/Mass Spectrometry, *Sci. Rep.* 5 (2015) 7785.
- [25] C. Lü, H. Li, H. Wang, Z. Liu, Probing the Interactions between Boronic Acids and cis-Diol-Containing Biomolecules by Affinity Capillary Electrophoresis, *Anal. Chem.* 85 (2013) 2361–2369.
- [26] D. Li, Y. Chen, Z. Liu, Boronate affinity materials for separation and molecular recognition: structure, properties and applications, *Chem. Soc. Rev.* 44 (2015) 8097–8123.
- [27] G. Eisenhofer, M. Peitzsch, Laboratory Evaluation of Pheochromocytoma and Paraganglioma, *Clin. Chem.* 60 (2014) 1486–1499.

- [28] T.G. Rosano, T.A. Swift, L.W. Hayes, Advances in catecholamine and metabolite measurements for diagnosis of pheochromocytoma., *Clin. Chem.* 37 (1991) 1854–1867.
- [29] D.S. Strac, D. Muck-Seler, N. Pivac, Neurotransmitter measures in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease: a review, *Psychiatr. Danub.* 27 (2015) 14–24.
- [30] L. Liu, Q. Li, N. Li, J. Ling, R. Liu, Y. Wang, L. Sun, X.H. Chen, K. Bi, Simultaneous determination of catecholamines and their metabolites related to Alzheimer's disease in human urine, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 1198–1204.
- [31] K. Mašek, J. Slánský, P. Petrovický, J.W. Hadden, Neuroendocrine immune interactions in health and disease, *Int. Immunopharmacol.* 3 (2003) 1235–1246.
- [32] J.W. Hughes, L. Watkins, J.A. Blumenthal, C. Kuhn, A. Sherwood, Depression and anxiety symptoms are related to increased 24-hour urinary norepinephrine excretion among healthy middle-aged women, *J. Psychosom. Res.* 57 (2004) 353–358.
- [33] M. Perry, Q. Li, R.T. Kennedy, Review of recent advances in analytical techniques for the determination of neurotransmitters, *Anal. Chim. Acta.* 653 (2009) 1–22.
- [34] 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.
- [35] 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.
- [36] A. Laaniste, A. Marechal, R. El-Debs, J. Randon, 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.
- [37] A. Marechal, A. Laaniste, R. El-Debs, V. Dugas, C. Demesmay, Versatile ene-thiol photoclick reaction for preparation of multimodal monolithic silica capillary columns, *J. Chromatogr. A.* 1365 (2014) 140–147.
- [38] J. Du, M. He, X. Wang, H. Fan, Y. Wei, Facile preparation of boronic acid-functionalized magnetic nanoparticles with a high capacity and their use in the enrichment of cis-diol-containing compounds from plasma, *Biomed. Chromatogr.* 29 (2015) 312–320.
- [39] B. Wang, L. Chen, Y. Sun, Y. Zhu, Z. Sun, T. An, Y. Li, Y. Lin, D. Fan, Q. Wang, Development of phenylboronic acid-functionalized nanoparticles for emodin delivery, *J. Mater. Chem. B Mater. Biol. Med.* 3 (2015) 3840–3847.
- [40] P. Dou, L. Liang, J. He, Z. Liu, H.-Y. Chen, Boronate functionalized magnetic nanoparticles and off-line hyphenation with capillary electrophoresis for specific extraction and analysis of biomolecules containing cis-diols, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 7558–7563.
- [41] O.G. Potter, M.C. Breadmore, E.F. Hilder, Boronate functionalised polymer monoliths for microscale affinity chromatography, *Analyst.* 131 (2006) 1094–1096.
- [42] L. Ren, Z. Liu, M. Dong, M. Ye, H. Zou, Synthesis and characterization of a new boronate affinity monolithic capillary for specific capture of cis-diol-containing compounds, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 4768–4774.
- [43] M. Chen, Y. Lu, Q. Ma, L. Guo, Y.-Q. Feng, Boronate affinity monolith for highly selective enrichment of glycopeptides and glycoproteins, *Analyst.* 134 (2009) 2158–2164.

- [44] D. Li, Y. Li, X. Li, Z. Bie, X. Pan, Q. Zhang, Z. Liu, A high boronate avidity monolithic capillary for the selective enrichment of trace glycoproteins, *J. Chromatogr. A.* 1384 (2015) 88–96.
- [45] S. Janků, M. Komendová, J. Urban, Development of an online solid-phase extraction with liquid chromatography method based on polymer monoliths for the determination of dopamine, *J. Sep. Sci.* 39 (2016) 4107–4115.
- [46] W. Wang, M. He, C. Wang, Y. Wei, Enhanced binding capacity of boronate affinity adsorbent via surface modification of silica by combination of atom transfer radical polymerization and chain-end functionalization for high-efficiency enrichment of cis-diol molecules, *Anal. Chim. Acta.* 886 (2015) 66–74.
- [47] Y. Xu, Z. Wu, L. Zhang, H. Lu, P. Yang, P.A. Webley, D. Zhao, Highly Specific Enrichment of Glycopeptides Using Boronic Acid-Functionalized Mesoporous Silica, *Anal. Chem.* 81 (2009) 503–508.
- [48] Y. Xue, W. Shi, B. Zhu, X. Gu, Y. Wang, C. Yan, Polyethyleneimine-grafted boronate affinity materials for selective enrichment of cis-diol-containing compounds, *Talanta.* 140 (2015) 1–9.
- [49] C. Chen, G. El Khoury, P. Zhang, P.M. Rudd, C.R. Lowe, A carbohydrate-binding affinity ligand for the specific enrichment of glycoproteins, *J. Chromatogr. A.* 1444 (2016) 8–20.
- [50] L. Ren, Z. Liu, Y. Liu, P. Dou, H.-Y. Chen, Ring-Opening Polymerization with Synergistic Co-monomers: Access to a Boronate-Functionalized Polymeric Monolith for the Specific Capture of cis-Diol-Containing Biomolecules under Neutral Conditions, *Angew. Chem. Int. Ed.* 48 (2009) 6704–6707.
- [51] Z. Lin, H. Huang, X. Sun, Y. Lin, L. Zhang, G. Chen, Monolithic column based on a poly(glycidyl methacrylate-co-4-vinylphenylboronic acid-co-ethylene dimethacrylate) copolymer for capillary liquid chromatography of small molecules and proteins, *J. Chromatogr. A.* 1246 (2012) 90–97.
- [52] Q. Li, C. Lü, H. Li, Y. Liu, H. Wang, X. Wang, Z. Liu, Preparation of organic-silica hybrid boronate affinity monolithic column for the specific capture and separation of cis-diol containing compounds, *J. Chromatogr. A.* 1256 (2012) 114–120.
- [53] H. Wang, Z. Bie, C. Lü, Z. Liu, Magnetic nanoparticles with dendrimer-assisted boronate avidity for the selective enrichment of trace glycoproteins, *Chem. Sci.* 4 (2013) 4298–4303.
- [54] L. Gao, J. Du, C. Wang, Y. Wei, Fabrication of a dendrimer-modified boronate affinity material for online selective enrichment of cis-diol-containing compounds and its application in determination of nucleosides in urine, *RSC Adv.* 5 (2015) 106161–106170.
- [55] J. He, Z. Liu, P. Dou, J. Liu, L. Ren, H.-Y. Chen, Electrochemically deposited boronate affinity extracting phase for covalent solid phase microextraction of cis-diol biomolecules, *Talanta.* 79 (2009) 746–751.
- [56] J. He, Z. Liu, L. Ren, Y. Liu, P. Dou, K. Qian, H.-Y. Chen, On-line coupling of in-tube boronate affinity solid phase microextraction with high performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry for the determination of cis-diol biomolecules, *Talanta.* 82 (2010) 270–276.
- [57] H.S. Kim, I.W. Wainer, Rapid analysis of the interactions between drugs and human serum albumin (HSA) using high-performance affinity chromatography (HPAC), *J. Chromatogr. B.* 870 (2008) 22–26.
- [58] A.J. Tomlinson, L.M. Benson, W.D. Braddock, R.P. Oda, S. Naylor, On-line preconcentration-capillary electrophoresis-mass spectrometry (PC-CE-MS), *J. High Resolut. Chromatogr.* 17 (1994) 729–731.
- [59] F.W.A. Tempels, W.J.M. Underberg, G.W. Somsen, G.J. de Jong, Design and applications of coupled SPE-CE, *Electrophoresis.* 29 (2008) 108–128.

- [60] L. Ren, Y. Liu, M. Dong, Z. Liu, Synthesis of hydrophilic boronate affinity monolithic capillary for specific capture of glycoproteins by capillary liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 8421–8425.
- [61] F. Yang, Z. Lin, X. He, L. Chen, Y. Zhang, Synthesis and application of a macroporous boronate affinity monolithic column using a metal-organic gel as a porogenic template for the specific capture of glycoproteins, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 9194–9201.
- [62] D.S. Hage, J.A. Anguizola, C. Bi, R. Li, R. Matsuda, E. Papastavros, E. Pfaunmiller, J. Vargas, X. Zheng, Pharmaceutical and biomedical applications of affinity chromatography: Recent trends and developments, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 69 (2012) 93–105.
- [63] Y. Egawa, R. Miki, T. Seki, Colorimetric Sugar Sensing Using Boronic Acid-Substituted Azobenzenes, *Materials.* 7 (2014) 1201–1220.
- [64] G.J.M. Habraken, C.E. Koning, J.P.A. Heuts, A. Heise, Thiol chemistry on well-defined synthetic polypeptides, *Chem. Commun.* (2009) 3612–3614.
- [65] Y. Ladner, A. Bruchet, G. Crétier, 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.
- [66] C. Cakal, J.P. Ferrance, J.P. Landers, P. Caglar, Microchip extraction of catecholamines using a boronic acid functional affinity monolith, *Anal. Chim. Acta.* 690 (2011) 94–100.
- [67] Y. Liu, L. Ren, Z. Liu, A unique boronic acid functionalized monolithic capillary for specific capture, separation and immobilization of cis-diol biomolecules, *Chem. Commun.* 47 (2011) 5067–5069.
- [68] H. Li, Z. Liu, Recent advances in monolithic column-based boronate-affinity chromatography, *TrAC Trends Anal. Chem.* 37 (2012) 148–161.
- [69] Z.A. Lin, J.L. Pang, Y. Lin, H. Huang, Z.W. Cai, L. Zhang, G.N. Chen, Preparation and evaluation of a phenylboronate affinity monolith for selective capture of glycoproteins by capillary liquid chromatography, *Analyst.* 136 (2011) 3281–3288.
- [70] K. Vuorensoola, H. Sirén, Determination of urinary catecholamines with capillary electrophoresis after solid-phase extraction, *J. Chromatogr. A.* 895 (2000) 317–327.
- [71] Z.D. Peterson, D.C. Collins, C.R. Bowerbank, M.L. Lee, S.W. Graves, Determination of catecholamines and metanephrines in urine by capillary electrophoresis–electrospray ionization–time-of-flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. B.* 776 (2002) 221–229.
- [72] K. Vuorensoola, H. Sirén, R. Kostianen, T. Kotiaho, Analysis of catecholamines by capillary electrophoresis and capillary electrophoresis–nanospray mass spectrometry: Use of aqueous and non-aqueous solutions compared with physical parameters, *J. Chromatogr. A.* 979 (2002) 179–189.
- [73] M.-E. Yue, T.-F. Jiang, Y.-P. Shi, Simultaneous determination of noradrenaline and dopamine in *Portulaca oleracea* L. by capillary zone electrophoresis, *J. Sep. Sci.* 28 (2005) 360–364.
- [74] K.-R. Kim, S. La, A. Kim, J.-H. Kim, H.M. Liebich, Capillary electrophoretic profiling and pattern recognition analysis of urinary nucleosides from uterine myoma and cervical cancer patients, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* 754 (2001) 97–106.
- [75] J. Liu, F. Zhu, Z. Liu, Borate complexation-assisted field-enhanced sample injection for on-line preconcentration of cis-diol-containing compounds in capillary electrophoresis, *Talanta.* 80 (2009) 544–550.

- [76] S. Wei, G. Song, J.-M. Lin, Separation and determination of norepinephrine, epinephrine and isoprenaline enantiomers by capillary electrophoresis in pharmaceutical formulation and human serum, *J. Chromatogr. A.* 1098 (2005) 166–171.
- [77] A.H.B. Wu, *Tietz Clinical Guide to Laboratory Tests*, fourth ed., Elsevier Health Sciences, Missouri, 2006.

Evaluation of boronate affinity solid-phase extraction coupled in-line to capillary isoelectric focusing for the analysis of catecholamines in urine

Published in *Analytica Chimica Acta* (2018) In Press, DOI: 10.1016/j.aca.2018.06.017

Maria Betzabeth Espina-Benitez*, Fabienne Marconi, Jérôme Randon, Claire Demesmay, Vincent Dugas
Université de Lyon, CNRS, Université Claude Bernard Lyon 1, ENS de Lyon, Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280, 5 rue de la Doua, F-69100 VILLEURBANNE, France

* Corresponding author. Tel.: +33437423552

E-mail address: vincent.dugas@univ-lyon1.fr

Abstract:

In this study, a new miniaturized and integrated analytical system was developed based on the in-line coupling of boronate affinity solid phase extraction with capillary isoelectric focusing separation and UV detection. This original coupling takes advantage of the selective enrichment of cis-diol-containing compounds using a boronate affinity sorbent and the exceptional focusing features of isoelectric focusing process. Such coupling has been used for preconcentration/purification and separation of urinary catecholamines (dopamine, adrenaline and noradrenaline) as proof of concept. Poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) monolithic capillary column (8 cm) was chosen as solid phase extraction support due to its good chemical stability and its easy and versatile surface functionalization. Characterization of the miniaturized boronate affinity monolith column (μ BAMC) was done by frontal affinity chromatography. An active-site amount of about $0.16 \text{ nmol cm}^{-1}$ ($75 \text{ }\mu\text{m i.d.}$) of phenyl boronic acid groups and K_d values ranging from 224 to $106 \text{ }\mu\text{M}$ were obtained for catechol and catecholamines. A high loading volume (up to 15 times the affinity column volume) can be introduced with quantitative recovery yields. Optimization of the in-line coupling concerned the adaptation of (i) the μ BAMC volume, (i.e. length and inner diameter of the monolithic column) for loading of large sample volumes and (ii) the CIEF experimental conditions. The ampholyte mixture was adapted (i.e. nature and concentration of carrier ampholytes, volume of sacrificial electrolytes) in order to ensure elution and separation of catecholamines

and to decrease limit of detection down to 10-20 ng ml⁻¹. The optimized method was applied to analyze urine samples.

Key words: boronate affinity chromatography, poly(GMA-co-EDMA) monolith, capillary isoelectric focusing, in-line coupling, urine, catecholamines.

Abbreviations:

AcOH – acetic acid; **AIBN** – azobisisobutyronitrile; **APBA** - 3-aminophenylboronic acid; **A** – adrenaline ; **BAC** – boronate affinity chromatography; **BGE** – Background electrolyte; **CIEF-WCID** – capillary isoelectric focusing with whole column imaging detection; **DA** -dopamine; **EDMA** – Ethylene dimethacrylate; **GMA** – glycidyl methacrylate; **ITP** – isotachophoresis **γ-MAPS** –methacryloxypropyltrimethoxysilane; **MeOH** – methanol; **μBAMC**- miniaturized boronate affinity monolithic column ; **MTMS** – methytrimethoxysilane; **NA** - noradrenaline; **PEG** - polyethylene glycol; **RSD** – relative standard deviation; **SPE** – Solid phase extraction; **SPME** – Solid phase microextraction; **TEA** - triethylamine.

Table of contents

1. Introduction.....	166
2. Materials and methods	167
2.1. Reagents and chemicals	167
2.2. Capillary synthesis protocols	168
2.2.1. HPC coating protocols	168
2.2.2. Synthesis of (poly(GMA-co-EDMA)) monoliths	168
2.2.3. 3-aminophenyl boronic acid surface functionalization (APBA-functionalized monolith) ..	169
2.3. CIEF experiments.....	169
2.4. In-line SPE-CIEF Coupling.....	169
2.5. Method validation	171
2.6. Preparation of real samples	172
3. Results and discussion.....	172
3.1. Catecholamines (adrenaline, noradrenaline and dopamine) CIEF separation.	172
3.2. Feasibility study of the in-line coupling.....	174
3.2.1. Characterization of the APBA functionalized poly(GMA-co-EDMA) monolith.....	174
3.2.2. In-line coupling development.....	176
3.2.3. Optimization of the μ BAMC - CIEF coupling.....	177
3.3. Determination of the maximum loading volume.....	179
3.4. Recovery study	180
3.5. Linearity, repeatability and limit of detection.....	180
3.6. Stability of the composite capillary	181
3.7. Analysis of catecholamines in urine	181
4. Conclusion	183
5. Supplementary material.....	184
6. References.....	187

1. Introduction

Capillary isoelectric focusing (CIEF) has become a key component of the analytical portfolio for biomolecules characterization (i.e. determination of pI, charge variants fingerprinting) and control processing. This capillary-based electrokinetic separation technique, like isotachopheresis (ITP), takes advantage of a unique peak self-sharpening feature. This feature, combined to the formation of a pH gradient within the separation column, confers to this technique its fundamental high-resolving power leading to separation of molecules according to their pI [1,2]. Another distinctive feature of CIEF concerns the sample injection step. Sample is mixed with the carrier ampholyte solution. The whole capillary is filled with this mixture whereas small injection plugs are preferred under standard capillary electrophoresis separation modes in order to limit band-broadening. Indeed, the focusing step allows to concentrate analytes in narrow bands and to separate them according to their pI. While this technique is widely applied to protein analysis, driven by the increasing development of biological drugs, few works deal with the use of CIEF for analysis of small amphoteric molecules in complex matrices. However, detection issues related to interference of carrier ampholytes (i.e. high background signal with UV and mass spectrometric [3] detection) may be seen as severe limitation. Implementation of sample preconcentration in front of CIEF analysis should be helpful to increase the specific sample signal. In addition to its interest for automation, the miniaturization and integration of the sample preparation step (preconcentration/purification) to the CIEF separation is also interesting for diluted and small volume sample analysis.

CIEF analysis has already been coupled to sample preparation (boronate affinity [4], immuno-affinity [5], metal-chelate affinity [6] and ion exchange [7]) according to different coupling strategies; (i) off-line coupling [4] and at-line coupling [7] of solid phase microextraction (SPME) and (ii) in-line coupling of open-tubular solid phase extraction (OT-SPE) [5,6]. While off-line and at-line coupling requires handling between the sample preparation step and the CIEF analysis (sample collection for off-line coupling [4] and insertion of the loaded SPME fiber into the separation capillary for at-line coupling [7]), in-line coupling represents the ultimate degree of integration. Indeed, as the preparation/purification zone is an integral part of the analytical column, the loading/elution/separation steps are performed sequentially in a fully automated way. This in-line coupling strategy is more advantageous provided that dispersion sources consecutive to the elution step do not impair the analytical performances (sensitivity and resolution). This is especially true at the miniaturized scale. The ability of CIEF to preconcentrate solutes from a large volume to sharp bands during the focusing step is thus very interesting to overcome dispersion problems associated with slow desorption kinetics [7]. If SPE in-line coupling is straightforwardly realized in open-tubular

capillaries [5,6] it suffers from a lack of capacity, which is especially critical for low-affinity interactions. This can be overcome by using porous supports (with high specific surface area) inserted at the inlet of the capillary column [8,9].

Herein we investigated a novel in-line coupling of a miniaturized boronate affinity monolithic column with CIEF for analysis of cis-diol containing molecules. Indeed, boronate affinity chromatography (BAC) is a specific and promising extraction tool offering great potential for the specific analysis of cis-diols compounds [10–12]. This class of molecules embraces small molecules (i.e. catecholamines neurotransmitters [13,14], nucleosides and ribosylated metabolites [15–17], vitamins [18]), glycans and larger ones like glycoproteins [19–25]. Most of boronate affinity applications concern the specific extraction of cis-diol compounds from aqueous media. Boronate affinity materials exhibit various underlying mechanisms affording secondary/complementary/interfering interactions [12,26–28], extraction/elution processes are mainly governed by pH. Such a pH-responsive process (i.e acidic elution) seems well-suited to a subsequent IEF analysis [4,7,29]. If the in-line coupling of BAC with capillary electrophoresis has been recently described by our group [13], its in-line coupling with CIEF has not yet been reported. For this proof of concept, miniaturized boronate affinity monolithic columns (μ BAMC) were prepared by post-modification of a well-controlled poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) (poly(GMA-co-EDMA)) monolith with 3-aminophenyl boronic acid. Characterization of the poly(GMA-co-EDMA) monolithic affinity column was done by frontal affinity chromatography. The coupling conditions for the preconcentration/elution, CIEF separation and detection were investigated using catecholamines as model molecules. Separation of catecholamines from urine sample was first done without sample pretreatment highlighting the self-purification behavior of CIEF compared to CE. In-line coupling with μ BAMC was studied in order to lower the detection limits by adapting the volume of the μ BAMC and experimental conditions to CIEF analysis.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and chemicals

Ethylene dimethacrylate (EDMA, 97%), glycidyl methacrylate (GMA, 98%), 1-propanol, 1,4-butanediol, (3-methacryloxypropyl)-trimethoxysilane (γ -MAPS), pharmalyte[®] carrier ampholyte (3-10), 3-aminophenylboronic acid (APBA), methanol (HPLC grade), triethylamine (TEA), dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4), o-phosphoric acid, sodium hydroxide (NaOH), acetic acid, hydroxypropylcellulose (HPC, Mw \sim 100,000); 1,4-benzenediol (hydroquinone), 1,2-benzenediol (catechol), epinephrine (A), norepinephrine (NA), dopamine (DA), sodium metabisulfite were

purchased from Sigma Aldrich (France). 2,2-azobisisobutyronitrile (AIBN) was from Acros Organics (France). Acetic acid (AcOH) was from Riedel-de Haënn (Riedel-de Haënn, Seelze, Germany). pI markers (CIEF peptide marker pI 7.0, pI 9.5 and pI 10 – PN A58481) from Sciex (Framingham, MA, USA). All aqueous solutions were prepared using >18 M Ω -cm water (Millipore, Molsheim, France). PTFE (TSH)- and polyimide (TSP)- coated fused-silica capillaries were purchased from Polymicro Technologies (Polymicro Technologies, Arizona, USA). Picoclear union (New objective) was from MS Will GMBH (Switzerland).

2.2. Capillary synthesis protocols

Capillary liquid manipulations were controlled by pressure using the microfluidic flow controller MFCS-100 system (Fluigent, France). This system is useful to fill, wash and dry capillary and monolithic capillary columns.

2.2.1. HPC coating protocols

The HPC coating procedure follows the protocol given by Koval et al [30]. Briefly, a 5 % (w/v) HPC aqueous solution was flushed through 1 m of polyimide coated fused silica capillary (50 and 75 μ m ID and 375 OD μ m) at 1 bar pressure. The capillary was placed in a gas chromatography oven (HP 5890 series II GC system) heated at 60°C, and flushed with nitrogen at 1 bar pressure, for 10 minutes. The temperature was increased up to 140°C with a 5°C/min ramp and kept at 140°C for 20 min.

2.2.2. Synthesis of (poly(GMA-co-EDMA)) monoliths

PTFE (TSH)- capillaries (75 and 100 μ m ID and 360 μ m OD) were flushed with a 5 % (v/v) solution of γ -MAPS in methanol/water (95/5, v/v) mixture containing 2.5 % of TEA for 1 hour. Thereafter, the capillary was rinsed with methanol for 15 min and dried under nitrogen. Polymerization mixture adapted from [31,32] was obtained by mixing 0.9 mL of GMA, 0.3 mL of EDMA, 1.05 mL of 1-propanol, 0.6 mL of 1,4-butanediol and 0.15 mL of ultra-pure water. 12 mg of 2,2-azobisisobutyronitrile were added under magnetic stirring. Prior to irradiation, dissolved oxygen in solution was degassed by sonication for 15 minutes. The pre-treated capillary was then filled with the polymerization mixture under N₂ pressure (1 bar). The photopolymerization reaction was then initiated by a 365 nm UV light source (Bio-link UV cross-linker, VWR International, France) for a total energy supply of 6 J cm⁻². In order to localize the monolith inside the capillary, a PEEK tubing (380 μ m i.d.) was used as a mask for non-irradiated areas. Unless otherwise stated, 8.5-cm monolithic columns were produced in capillary of 15 cm length. After polymerization, the 8.5-cm monolithic column segment at the inlet of a 15-cm capillary was rinsed with methanol for 1 hour to remove any remaining reagents. Finally, the monolithic column was cut (both side) to a total length of 11 cm (8 cm of monolith at the inlet).

2.2.3. 3-aminophenyl boronic acid surface functionalization (APBA-functionalized monolith)

20 mg of 3-aminophenylboronic acid (APBA) were solubilized in 75 μL of 10 mM phosphate buffered solution at pH 9.2 and 160 μL of MeOH. Poly(GMA-co-EDMA) monolithic capillary columns were filled with this APBA solution and the reaction was conducted at 60 $^{\circ}\text{C}$ for 62 h. The columns were then thoroughly rinsed with a methanol/water (50/50, v/v) solution.

2.3. CIEF experiments

CIEF experiments were performed on the P/ACE-MDQ equipment (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) that was equipped with a photodiode array detector. The cartridge aperture was 100 x 200 μm ; and the capillary dimensions 50 μm i.d., $L_d=20$ cm, $L_t=30.2$ cm, unless otherwise stated. The data collection rate was 4 Hz. System control and data acquisition were carried out using the 32 Karat software (Beckman Coulter). Sample solutions were prepared by mixing the 10 μL of sample (unless otherwise stated) with the standard carrier ampholyte solution. Standard ampholyte solution was prepared by mixing the following reagents into 0.5 mL microcentrifuge vials: 200 μL CIEF gel (Beckman Coulter), 12 μL of carrier ampholyte solution (pH 3-10, Sigma-Aldrich), 20 μL of 500 mM arginine solution (cathodic stabilizer) and 2 μL of IDA (200 mM) solution (anodic stabilizer) and, if specified, 1 μL of each pI markers. Focusing was done for 10 min at 25 KV with 200 mM phosphoric acid as anolyte and 300 mM sodium hydroxide as catholyte. For chemical mobilization, the outlet vial was exchanged for 350 mM acetic acid and 30 kV was applied for 20 minutes. After each run, a 50 psi pressure flush with water was done for 1 minute. Samples were injected by applying 25 psi pressure for 100 seconds, followed by a water dip of both inlet and outlet.

2.4. In-line SPE-CIEF Coupling

A detailed description of the method in-line coupling is illustrated in Figure 1. Unless otherwise stated, 11-cm length capillary columns having an 8-cm length μBAMC unit at the inlet were coupled to a 24.5 cm length HPC-coated column using a New Objective picoclearTM union purchased from MS WILL GMBH (Switzerland). This coupling strategy using a union is useful to study the influence of capillary size (inner diameter and capillary length) on the overall performances. SPE-CIEF experiments were carried out on Agilent 7100 CE instrument (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with a diode array detector and a 12 bars external pressure device. The capillary was equilibrated by flushing a 15 mM phosphate buffer (pH 8.5). A sample solution containing catecholamines (in phosphate

buffered solution at pH 8.5) was loaded through the system at 12 bars. The linear velocity and flow rate of the mobile phase were estimated using thiourea as void volume marker. The time of loading determines the volume of sample solution loaded on the μ BAMC unit (preconcentration step, Figure 1). For example, a 15 minutes loading time at 12 bars in a 100- μ m inner diameter monolith ($0.5 \mu\text{L min}^{-1}$) corresponds to 7.5 μL of sample volume introduced. The overall capillary was then filled with the carrier ampholyte solution containing the sacrificial arginine and IDA electrolytes at 12 bars (step 2, Figure 1). Under optimized conditions, 5 μL of 200 mM IDA solution, 30 μL of 500 mM arginine solution and 10 μL of pharmalyte[®] carrier ampholyte (3-10) were mixed with 500 μL of water. Elution of retained catecholamines from the μ BAMC unit was done by injecting a 12-cm length plug of 200 mM IDA solution (about 1.5 min at 12 bars under optimized conditions) (step 3, Figure 1). Isoelectric focusing was started at +20 kV up to +25 kV in 5 minutes for a total time of 6 minutes using 200 mM phosphoric acid and 300 mM sodium hydroxide as anolyte and catholyte respectively (step 4, figure 1). Finally, hydrodynamic mobilization was done at 30 kV with a pressure of 8 bars at the inlet (step 5, figure 1). Determination of the number of active sites and K_d by frontal affinity chromatography [33]. A 8.5-cm length poly(GMA-co-EDMA) monolithic segment at the inlet of a 10-cm length fused silica capillary was used to determine the total number of active sites (m_{tot}) on boronate affinity monolithic column by frontal affinity chromatography. Nano-LC experiments were carried out with an Agilent HP^{3D} CE system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with a diode array detector and an external pressure device allowing to work up to 12 bars. System control and data acquisition were carried out using the Chemstation software (Agilent). These experiments were conducted in the short-end injection mode (i.e injection-to-detection length was 8.5 cm).

Breakthrough curves with catechol as model solute at 5, 10 and 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in phosphate buffer (15 mM Na_2HPO_4 , pH 8.5) were used to determine the apparent number of active binding sites (m_{app}) at different catechol concentrations $[L]$. The total number of active sites on the column and the dissociation equilibrium constant (K_d) of the boronate / catechol complex were determined according to equation (1) after plotting $1/m_{app}$ versus $1/[L]$:

$$\frac{1}{m_{app}} = \frac{K_d}{m_{tot}[L]} + \frac{1}{m_{tot}} \quad \text{Equation (1)}$$

The same experiments were conducted with catecholamines in order to compare the K_d values with catechol and estimate the volume of loading for each solute.

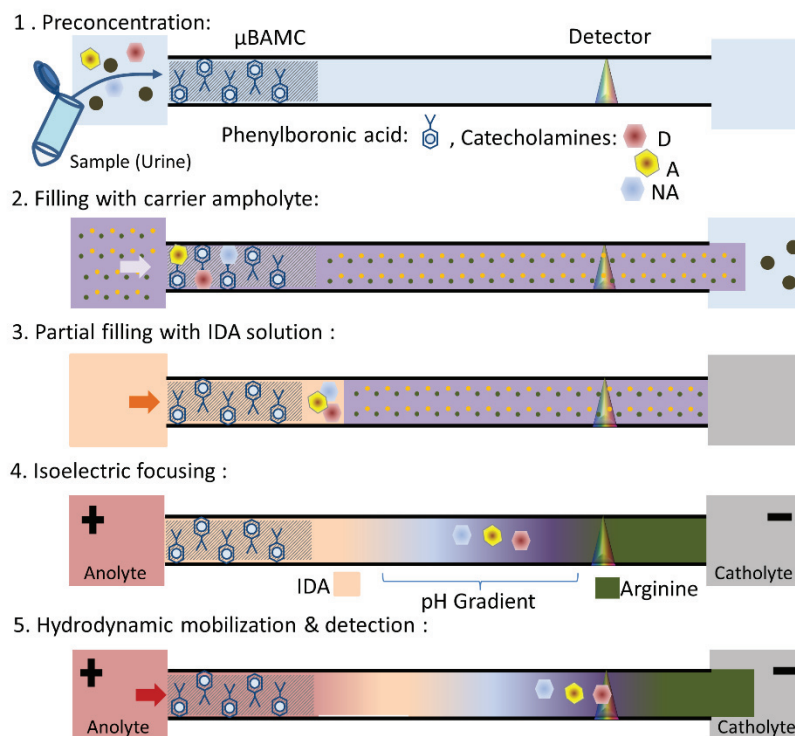


Figure 1. Step-by-step process of the in-line coupling of miniaturized boronate affinity chromatography and capillary isoelectric focusing.

2.5. Method validation

Linearity of the method was estimated by plotting the peak areas versus the analyte concentration of standard solutions of catecholamines of increasing concentration ranging from 50 to 500 ng mL⁻¹. The limits of detection (LOD) were estimated using the signal-to-noise ratio method (S/N = 3). Recovery yields were estimated by comparing the peak areas obtained after introduction of a given volume of a solution of known catecholamine concentrations, elution and CIEF separation with a standard CIEF experiment using carrier ampholyte solution doped with an equivalent quantity of catecholamines.

Repeatability was estimated by calculating the relative standard deviation of the peak areas measured for 6 different replicates at a 200 ng mL⁻¹ catecholamine concentration. Stability of the μ BAMC-CIEF composite capillary was assessed by regularly analyzing a catecholamine solution at 200 ng mL⁻¹. One experiment (from conditioning to elution) lasts about one hour. The set of experiments was carried out over a period of two weeks.

2.6. Preparation of real samples

45 mL urine sample (non-first morning urine sample) was collected from one healthy volunteer. In order to avoid catecholamine oxidation, 0.5 mL of 1 M HCl was added to 10 mL of urine sample and stored at -20°C . 2 Hours before the analysis was performed, urine samples were thawed, then filtered through 0.22 μm membrane filter. In order to avoid substantial changes of the sample matrix and to reach a 15 mM concentration of Na_2HPO_4 , urine samples were diluted with a solution of 100 mM Na_2HPO_4 (pH 8.5) in a buffer/urine ratio of 3/17. Then, pH was adjusted to 8.5 using 0.1 M NaOH. When the urine sample was spiked with catecholamines, sodium metabisulfite was added at an equivalent concentration.

3. Results and discussion

3.1. Catecholamines (adrenaline, noradrenaline and dopamine) CIEF separation.

In a first attempt, the three amphoteric catecholamines *viz.* adrenaline (A), noradrenaline (NA) and dopamine (DA) were analyzed using standard CIEF protocol [34]. Samples were prepared by adding catecholamines (final concentration of $5\ \mu\text{g mL}^{-1}$) and/or pI markers (pI 7, 9.5 and 10) to the standard carrier ampholyte solution. Interestingly, the three catecholamines were well-separated under these standard CIEF analysis conditions. This separation is based on slight differences in pI values for the three analytes. A linear relationship between pI values and the migration time of each pI markers was obtained, as shown in Figure S1 and S2. The experimentally determined pI values for dopamine, adrenaline and noradrenaline are 9.83, 9.52 and 9.29, respectively, which are in good agreement regarding the pKa values of the involved acid-base moieties. For example, a pI value of 9.8 is calculated [2] from the pKa values given in PubChem database for dopamine (8.71 and 13.68 (cis-phenols) and 10.90 (amine)).

In order to improve the UV signal of catecholamines at 295 nm, the standard carrier ampholyte solution was modified by lowering the concentration of the carrier ampholyte (from 5.1% to 1.7 %, v/v). The background signal due to carrier ampholyte at 295 nm was thus reduced without affecting significantly the separation of the three catecholamines.

Reduction of the carrier ampholyte mixture viscosity was also addressed. Limitations related to the injection of a viscous solution through monolithic columns were anticipated considering the further in-line coupling of CIEF with a miniaturized solid phase extraction step. The CIEF gel was replaced by water because it did not affect the separation. CIEF gel (glycerol, ethylene glycol,

hydroxyethylcellulose) is usually used to reduce molecular diffusion and to prevent precipitation of proteins [2]. Finally, the arginine content was also reduced by half to shorten the section of capillary occupied by arginine, i.e. to spread the pH gradient and increase the resolution. Moreover, it allows focusing the solutes closer to the detection window reducing the time of mobilization. The final CIEF separation of the three catecholamines is presented Figure 2A.

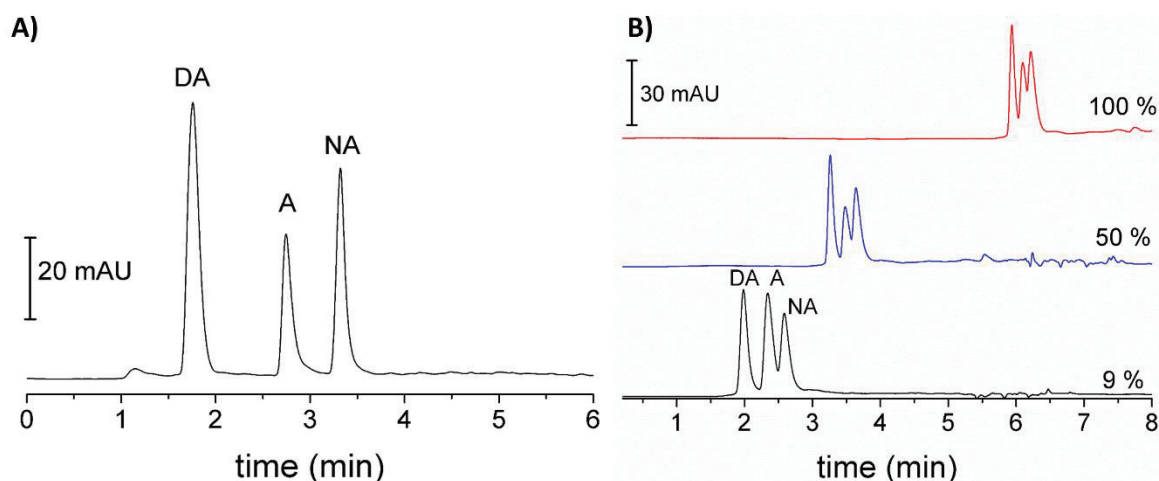


Figure 2. CIEF separation of the three catecholamines using the optimized carrier ampholyte mixture on HPC coated capillary (total/effective length 30/20 cm x 50 μm i.d.). (A) Standard solution at 12 $\mu\text{g mL}^{-1}$, (B) spiked urine samples (final concentration 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$) prepared by replacing a fraction (from 9 to 100%) of the solvent volume (water) of the carrier ampholyte mixture by urine.

The optimized CIEF method was applied to analyze urine samples spiked with catecholamines. These samples were prepared by replacing a fraction (from 9 to 100%) of the solvent volume (water) by an equivalent volume of spiked urine. The corresponding CIEF electropherograms (at a final constant concentration of 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of each catecholamines) are presented Figure 2B. However, an increased urine content led to a loss of resolution (see also Table S1) and to an increase of mobilization duration consecutive to a pH gradient contraction. This pH gradient contraction may be attributed to an increase of the ionic strength (i.e. salt content in urine) [35]. However and as illustrated Figure 3 CIEF seems more advantageous than CE when urine is analyzed without any pre-concentration/purification step. Indeed, CE analysis of urine without purification [13] (Figure 3B) does not allow the separation of the analytes from the urine matrix.

The comparison of the signal intensities is also in favor of CIEF. Indeed, despite the lower capillary inner diameter i.e. the lower optical path-length (50 μm in CIEF versus 75 μm in CE) and the lower concentration of catecholamines (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in CIEF versus 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in CE) the signal intensities are higher in CIEF (Figure 3C) than in CE (Figure 3A). In CIEF the injected volume corresponds to the whole capillary volume (1.3 μL), meanwhile only 0.2 μL can be injected in CE. to limit external

dispersion. In CIEF, catecholamines are efficiently focused in narrow bands and can therefore be detected in urine at the lowest concentration of 830 ng mL^{-1} without any upstream purification process. Interestingly, interfering compounds were dragged outside the pH-gradient (“self-purification” process), thus leading to only three peaks corresponding to the three catecholamines.

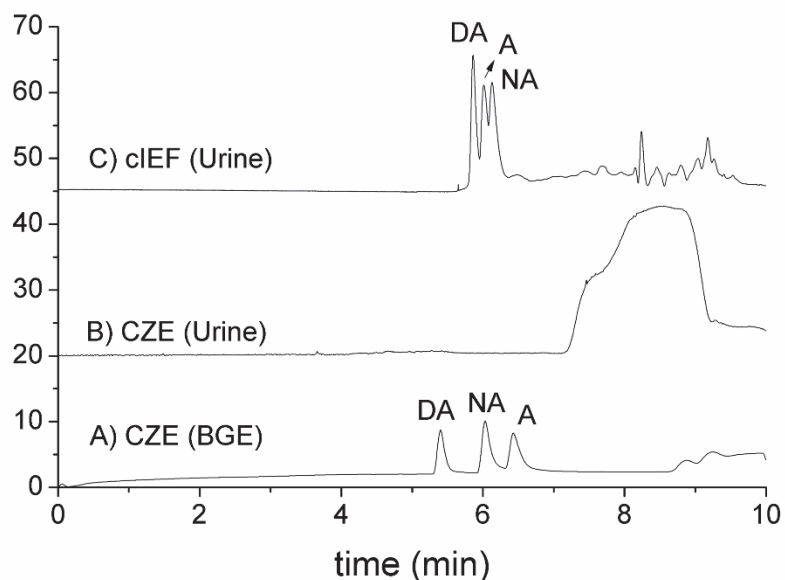


Figure 3. Comparison of CIEF and CE analyses of the three catecholamines without purification. CE separation in a fused silica capillary ($L = 35 \text{ cm}$, $i.d.: 75 \mu\text{m}$), $V = 15 \text{ kV}$, BGE 15 mM phosphate , 35.7 mM TEA ($\text{pH } 8.75$)/ MeOH ($60/40$, v/v): (A) $0.2 \mu\text{L}$ of standard catecholamines sample at $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ in 50 mM AcOH/MeOH ($60/40$, v/v), (B) $0.2 \mu\text{L}$ of DA-spiked urine at $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ adapted from [13]. (C) CIEF analysis in a 30-cm length HPC coated fused capillary ($i.d.: 50 \mu\text{m}$); injection was realized by filling the whole capillary ($1.3 \mu\text{L}$) with a urine sample spiked to a final catecholamines concentration of $5 \mu\text{g mL}^{-1}$.

In order to improve the limit of detection and to limit the impact of the matrix (e.g. salt concentration), a preconcentration unit based on boronate affinity chromatography (APBA-monolith) was in-line coupled to CIEF.

3.2. Feasibility study of the in-line coupling

3.2.1. Characterization of the APBA functionalized poly(GMA-co-EDMA) monolith

Our group has previously developed an efficient silica-based monolith for boronate affinity chromatography exhibiting a relatively high binding capacity [13]. Major concern in CIEF is the harsh conditions (e.g. use of anolyte and catholyte of extreme pH) that are very stringent for the chemical stability of CIEF columns. We started our in-line coupling development with these silica monoliths but

we failed to obtain reliable results due to chemical stability issues. Use of organic porous monolith was thus implemented to improve the chemical stability of the μ BAMC column. A poly(GMA-co-EDMA) monolith was chosen due to its high chemical stability in acidic conditions [31]. These epoxy-functionalized porous materials were then derivatized with 3-aminophenylboronic acid.

Poly(GMA-co-EDMA) monoliths were in-situ synthesized at the inlet of 75- μ m UV-transparent silica capillary according to the procedure established by Chamieh et al. [8], which yields monolithic columns with an average minimum plate height of $10 \pm 1 \mu\text{m}$ for an optimum velocity of 0.5 mm s^{-1} [31]. The specific surface area estimated by nitrogen adsorption-desorption isotherm measurement on poly(GMA-co-EDMA) monolith synthesized in batch-mode was of $4 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$. The average permeability ($K_{p,F}$) of the monolith in water is about $1 \times 10^{-13} \text{ m}^2$. Such a high permeability value is a tremendous advantage for in-line coupling to electrokinetic-based techniques.

Three APBA functionalized poly(GMA-co-EDMA) monoliths ($n=3$) were analyzed by frontal analysis (Figure S3) as described in Section 2.4.1 using catechol as model solute. Affinity tests with catechol are commonly used to estimate the binding capacity (number of active sites) and affinity (K_d value) of boronate affinity materials [13,17,21,26,36–41]. Indeed, the K_d values with phenyl boronic acid in solution are known for pH ranging from 5.8 to 8.5 [42] which allows direct comparison with K_d values determined for catechol with phenyl boronic acid grafted onto solid supports. For example, the K_d value of catechol with phenyl boronic acid in solution at pH 8.5 is about $300 \mu\text{M}$. The total number of active-sites estimated using catechol as ligand with this functionalization procedure is $0.16 \pm 0.03 \text{ nmol.cm}^{-1}$ (i.d. $75\mu\text{m}$). Similar results were obtained using other cis-diol ligands (i.e. catecholamines) presenting different dissociation constants. The K_d values obtained for catechol, dopamine, adrenaline and noradrenaline are 224 (RSD = 18 %), 106, 125 and $196 \mu\text{M}$, respectively. Although hydroquinone ($\log P_{o/w} = 0.59$), a positional isomer (non cis-diol) of catechol used to characterize the non-specific interaction, was not significantly retained on APBA-monoliths, we also investigated the influence of addition of organic modifier (MeOH) on affinity properties (Figure S4). Similar K_d values were estimated with 20 % (v/v) of MeOH in the mobile phase, thus indicating that MeOH does not impair affinity. Contrarily to what observed with some biomolecules like proteins, the addition of methanol to the electrolyte did not affect small molecules and their study. In perspective to the in-line coupling with CIEF, It was verified that the carrier ampholyte solution did not elute the catecholamines captured on the μ BAMC preloaded with catecholamines.

The stability of the APBA-monolithic columns was evaluated by following the loss of activity (number of active-sites) after 5 successive frontal analyses (loading, washing and acidic elution). The

variation of the number of active-sites after 5 analyses is within the standard deviation of the measurement (7 % RSD).

3.2.2. In-line coupling development

Preliminary study was implemented to determine the CIEF conditions allowing to separate and detect catecholamines when a monolithic column was added at the inlet of a CIEF capillary. In a first set of experiments, a carrier ampholyte solution doped with catecholamines at $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ was introduced by the outlet extremity of the capillary (no preconcentration on the μBAMC). Some modifications of the CIEF conditions were required to obtain a separation quality comparable to the previous one. The chemical mobilization step implemented in open tube capillary was replaced by a hydrodynamic mobilization. Indeed, no signal from catecholamines nor from ampholytes was obtained using chemical mobilization. It can be supposed that the presence of monolith in the acidic part of the CIEF gradient modifies the electric field distribution overall the capillary and affects greatly the chemical mobilization. A comparative study in an open tube showed that under appropriate conditions of mobile phase velocity comparable separation efficiencies (i.e. peak intensity and resolution) were obtained (Figure S5). Obviously, an increase of the mobilization pressure (and thus the linear velocity of the mobile phase) deteriorated the separation. Indeed, it is well-known that dispersion in open tube increases with the flow velocity. In a second set of experiments small plugs of concentrated catecholamine solutions were injected at the inlet of the composite capillary pre-filled with the carrier ampholyte solution (preconcentrated on the μBAMC) and under these conditions catecholamines failed to be detected. It was supposed that the pH value in the monolithic zone during the focusing step was not low enough to elute the catecholamines from the APBA-monolith unit. Knowing that elution of catecholamines from boronate affinity column is done in acidic media (i.e. 50 mM acetic acid), we verified the effectiveness of the anodic stabilizer solution (200 mM IDA) to elute cis-diol containing compounds by frontal affinity chromatography. This IDA solution was then used to promote elution and to ensure focusing of catecholamines out of the μBAMC . It was determined that the injection of a plug of IDA covering the entire monolithic column was a prerequisite to appropriate separation. A schematic illustration of the final step-by-step process of direct coupling of BAC to CIEF is presented in Figure 1. This process was then successfully applied to analysis of catecholamines from dilute sample solutions.

3.2.3. Optimization of the μ BAMC - CIEF coupling

Key objective of the in-line coupling was to improve the sensitivity of the method. Preconcentration factor depends on the volume of sample solution that can be loaded. With respect to the CIEF properties discussed previously, the use of a large volume of μ BAMC unit is possible since the elution volume from this unit is not a problem. In addition, the relatively low current inherent to the CIEF process authorizes the use of wider μ BAMC unit compared to CE for example.

It was thus interesting to increase the diameter of the preconcentration unit i.e. its volume in order to increase the sample loading volume. A 100 μ m inner diameter μ BAMC preconcentration unit was thus connected to a 75 μ m inner diameter HPC coated capillary. When the loading volume of the sample was adapted according to the new void volume of the monolith, the increase in the diameter of the monolith leads to an increase in the loaded quantity. This leads to an increase of the peak areas of the eluted catecholamines proportional to the variation of the monolith surface area (i.e. $(i.d(100\mu m) / i.d(75\mu m))^2$) assuming the same recoveries. The variation in peak areas, due to increase of the monolith diameter from 75 μ m to 100 μ m should increase the sensitivity by 1.8 provided that no extra-dispersion is added.

Such composite capillary, composed of a 8-cm length monolithic column at the inlet of a 11-cm length capillary (100 μ m i.d) coupled to a 25-cm length (75 μ m id) CIEF capillary, after optimization of the volume of IDA solution injected before focusing, successfully preconcentrated and separated catecholamine solutions with concentration down to 100 ng mL⁻¹ (Figure 4, trace B). Nevertheless, the detection was impaired by the high background signal. The Sigma-Aldrich ampholyte at 295 nm shows a broad band corresponding to the pH 10 gradient zone (Figure 4, trace A). Reduction of the background signal was achieved by replacing this carrier ampholyte brand by the lower background pharmalyte ampholyte (pH 3-10) [43] (Figure 4, trace C).

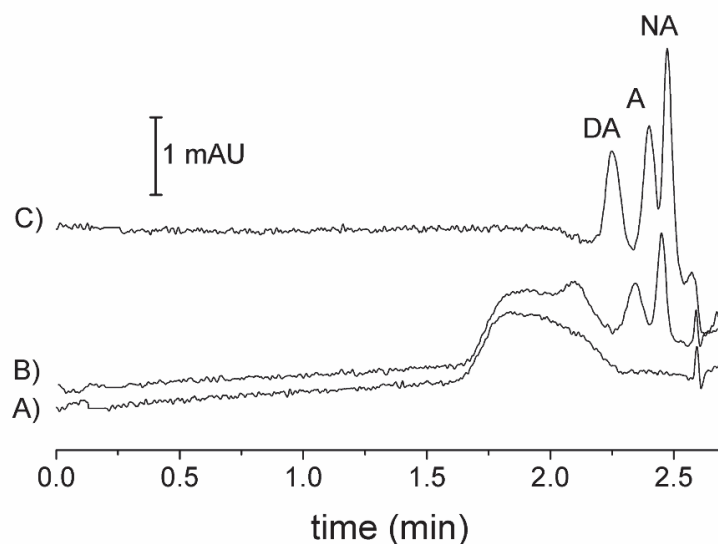


Figure 4. Preconcentration and CIEF separation of catecholamine solutions in a 100 μm i.d. μBAMC unit coupled to a 75- μm i.d HPC coated CIEF capillary; (A) Blank with Sigma Aldrich carrier ampholyte; (B) 100 ng mL^{-1} with Sigma Aldrich carrier ampholyte; (C) 100 ng mL^{-1} Pharmalyte carrier ampholyte.

The reduction of the inner diameter of the CIEF capillary was also investigated. In standard CIEF (in open tube), the capillary inner diameter only modifies the detection path-length (the concentration of focused bands are not modified). The situation in a composite column is quite different: a decrease of the inner diameter of the CIEF capillary (with a constant diameter for the μBAMC unit) should increase the signal intensity using in-line coupling. Indeed, other things being equal, eluted catecholamines will focus in a lowered volume (i.e. at higher concentration) using smaller inner CIEF capillary. The increase in concentration of solutes in the focused bands is proportional to the variation of the capillary inner section. For instance, a 1.5-fold reduction of the capillary inner diameter (i.e. 75 μm versus 50 μm) should lead to an increase in catecholamines concentration by a factor of 2.25 (i.e. $(\text{i.d. } 75\mu\text{m}) / \text{i.d. } (50\mu\text{m}))^2$). Concomitantly, the reduction of the capillary inner diameter from 75 μm to 50 μm reduces the optical path length (i.e. the absorbance) by a 1.5-fold factor. As a result, the benefit of the reduction of the capillary inner diameter should be an increase of the sensitivity by a factor of 1.5 (i.e. $2.25/1.5$).

The gain in sensitivity due to the optimization of the inner diameter of each part of the composite capillary *viz* a 100- μm inner diameter μBAMC and a 50- μm CIEF capillary is illustrated Figure 5. Under this latter optimized coupling configuration, a gain in S/N ratio of approximately 2.4 is obtained. This is in accordance with the expected overall increase factor of 2.7 estimated through the mathematical product of the increase in sensitivity factor of 1.8-fold coming from the increase of the inner diameter of the μBAMC and 1.5-fold due to reduction of CIEF capillary.

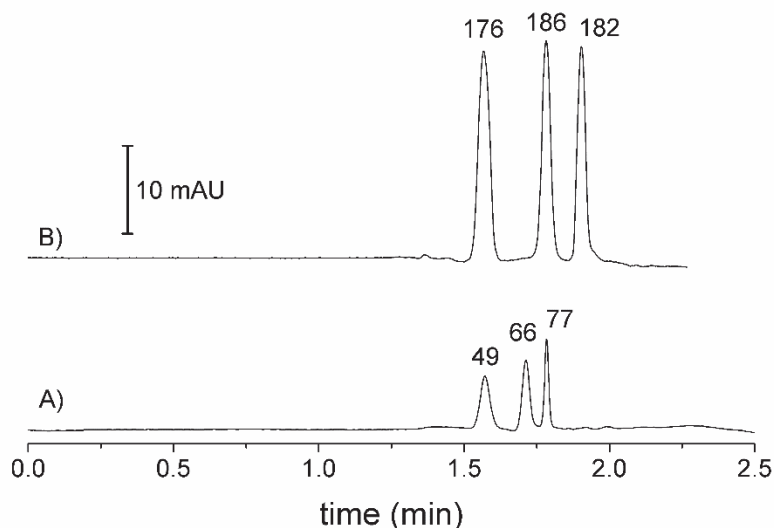


Figure 5. Preconcentration and CIEF separation of the three catecholamines at 500 ng mL^{-1} by coupling A) a $75\text{-}\mu\text{m}$ i.d μBAMC column to a $75\text{-}\mu\text{m}$ inner diameter HPC-coated capillary, and B) a $100\text{-}\mu\text{m}$ i.d μBAMC column to a $50\text{-}\mu\text{m}$ inner diameter HPC-coated capillary. Volume of loading equivalent to 15-fold the void volume of the μBAMC column. Signal to noise ratio was given for each peak.

3.3. Determination of the maximum loading volume

An interesting qualification parameter of the preconcentration unit is the maximum volume of sample solution that can be loaded before breakthrough from the unit. In order to evaluate such parameter, increasing volumes of a 500 ng mL^{-1} catecholamines solution in phosphate buffer (pH 8.5) were loaded on μBAMC (8-cm length monolithic column prepared in a $100 \mu\text{m}$ i.d. capillary). The loading volume was estimated using a void time marker (thiourea) allowing to estimate the linear velocity and thus the flow rate through the μBAMC . After loading, focusing and mobilization, the peak area was plotted against the loading volume (Figure 6). The peak area increases linearly with the loading volume up to $7.5 \mu\text{L}$ and reaches a plateau corresponding to the breakthrough volume. This volume corresponds to the optimal after which the time spent to load the sample solution is detrimental to the total time analysis.

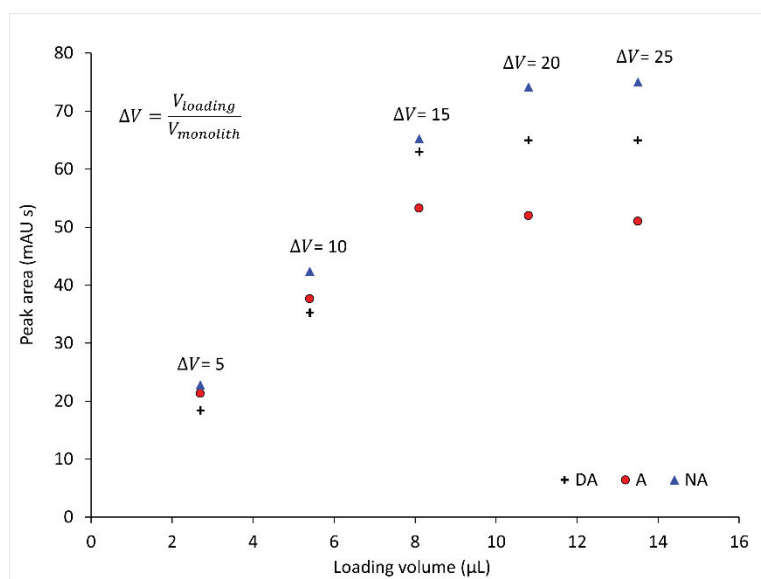


Figure 6. Plot of the peak area versus loading volume of catecholamine solution at 500 ng mL^{-1} loaded on a $100\text{-}\mu\text{m}$ i.d μBAMC coupled to a $50\text{-}\mu\text{m}$ inner diameter HPC-coated capillary. $\Delta V/V$ represents the ratio of the loaded versus the void volume of the μBAMC column.

Regarding the void volume of monolith (approximately $0.5 \mu\text{L}$ for a 8-cm length, $100\text{-}\mu\text{m}$ inner diameter μBAMC and assuming a 0.86 total porosity [31]), a volume exceeding about 15-fold the void volume of monolithic preconcentration unit can be loaded.

3.4. Recovery study

The recovery yields for DA, A and NA were studied by comparing the signals (peak areas) obtained by loading a sample volume of $7.5 \mu\text{L}$ (at a catecholamine concentration of 200 ng mL^{-1} each) with those obtained after a CIEF simulation realized by filling the whole capillary ($1.3 \mu\text{L}$) with carrier ampholyte solution spiked with an equivalent quantity of catecholamines (i.e. 1.5 ng each). The recovery yields of these 3 catecholamines were $106 \pm 9 \%$ for dopamine, $104 \pm 9 \%$ for adrenaline and $112 \pm 9 \%$ for noradrenaline demonstrating the suitability of the in-line coupling.

3.5. Linearity, repeatability and limit of detection

The linearity and limits of detection (LOD) were determined using the optimized configuration described previously. Considering the maximum loading volume previously determined, i.e. 15 void volumes of μBAMC (equivalent to $7.5 \mu\text{L}$), standard solutions of DA, A and NA at concentrations between 50 and 500 ng mL^{-1} were analyzed. Repeatability was determined by injecting sample solutions containing each catecholamine at 200 ng mL^{-1} , six injections on one day. Relative standard

deviation values of the peak areas ranging from 9 % for DA and 11 % for A and NA were calculated. Linearity assessment was performed by linear regression (least square method). Satisfactory results were obtained for all the catecholamines, with correlation coefficients (R^2) above 0.99 (0.9908, 0.9923 and 0.9982 for DA ($y=0.1411x - 3.56$), A ($y=0.0856x - 1.99$) and NA ($y=0.0682x - 0.89$) respectively).

In addition, LODs ($S/N = 3$) were estimated at 10, 21 and 15 ng mL^{-1} for DA, A and NA respectively. These LODs are comparable to those obtained with in-capillary μ -SPE-CE coupling [13]. Furthermore, this in-capillary μ -SPE-CIEF coupling allows to reach LODs close to the concentrations found in urine sample without the need of complex detection (electrochemical detection, mass spectrometry or fluorescence system) or derivatization step of analytes. Indeed, the concentration of catecholamines in urine samples usually ranges between 10 and 400 ng mL^{-1} [44–47] depending on the health condition of the patient.

Compared to other CE methods used in the literatures, this in-line coupling largely improves reported LODs [46,48–50]. Indeed, it is well-known that capillary electrophoresis is a powerful separation technique but that its sensitivity (i.e. UV detection) can be seen as its Achilles heel. Such detection issue is even more pronounced in CIEF due to the carrier ampholyte. This new in-line coupling with a boronate affinity-based sample preparation step allows reaching LODs comparable to those of standard off-line and on-line HPLC-UV methods [14,37,51].

3.6. Stability of the composite capillary

The stability and lifetime of the APBA functionalized monolith coupled to HPC coated CIEF capillary was excellent allowing to perform more than 100 analyses with the same 8-cm μ BAMC composite monolith, over two weeks. The only observed drawback, which is inherent to the loading of solutions into porous materials, was the drift in permeability. This was attributed to partial clogging of the inlet monolith after long periods of use of urine samples, even when all the solutions were filtered on 0.22 μm filter before loading. However, this issue was easily circumvented by cutting 1 mm at the inlet end of the inlet monolith to eliminate the clogged section and restore its initial permeability.

3.7. Analysis of catecholamines in urine

The analysis of a urine sample from a volunteer was performed thanks to the new in-line μ SPE-CIEF coupling method (Figure 7). The analysis of urine (after buffering at pH 8.5 (see section 2.6)) showed the presence of dopamine and noradrenaline. This peak attribution was confirmed by spiking the urine sample with the three catecholamines at 200 ng mL^{-1} each. Noradrenaline can be detected

with a signal-to-noise ratio higher than 3. Concentration in urine for dopamine was estimated to 93 ng mL⁻¹. Moreover, despite the synergistic effect of the “self-purification” property of CIEF and the preconcentration of the μ BAMC, the presence of unknown peak in the far basic pH area of the pH gradient was noticed whereas such peak was not detected without preconcentration. This is not surprising for real samples to contain complex matrix that covers a wide range of interfering molecules. This unknown peak may belong to a class of molecules that is adsorbed onto the μ BAMC support and focused at basic pH. Indeed, it is known that boronate affinity material exhibits additional interfering interactions mechanisms (hydrophobic, ionic and hydrogen bonding complementary interactions). It is supposed that introduction of the IDA solution before the focusing step also disrupt ionic interactions with the phenylboronic acids allowing to release molecules in solution. This may account for preconcentration of potential non cis-diol molecules such as proteins or urinary metabolites which are then be separated by CIEF.

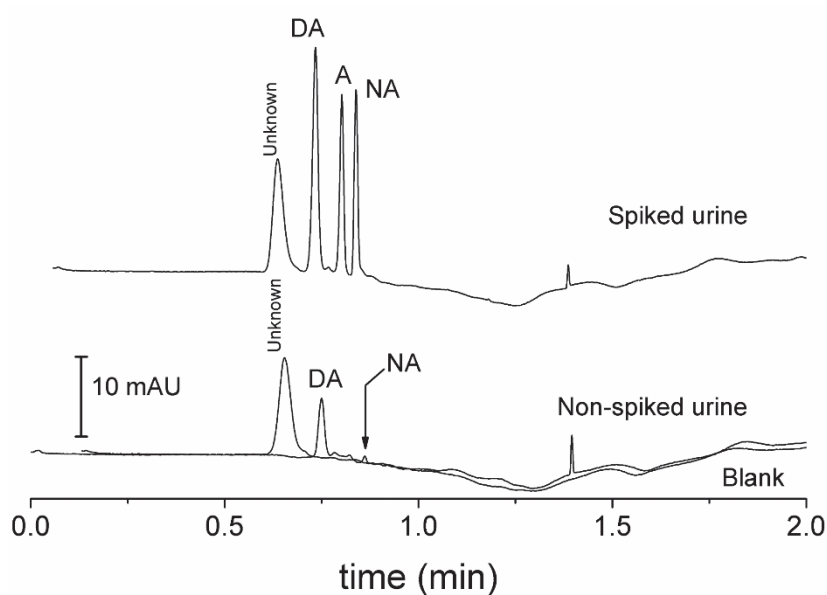


Figure 7. Analysis of urine sample and catecholamines spiked urine sample by in-line coupling (preconcentration/purification, separation and detection) on a composite capillary. A 100- μ m i.d μ BAMC column was coupled to a 50- μ m i.d HPC-coated capillary. Volume of loading equivalent to 15-fold the void volume of the μ BAMC column.

4. Conclusion

An in-line boronate affinity SPE-CIEF method was developed and optimized for analysis of catecholamine neurotransmitters in urine. A polymeric boronate affinity monolith was developed to selectively preconcentrate cis-diol compounds and resist to extreme pH-conditions imposed by CIEF. The coupling conditions were optimized in order to improve the method sensitivity. Taking advantage of the focusing feature of CIEF to overcome dispersion issues the coupling of capillaries with different inner diameters was possible: a 100- μm μBAMC was coupled to a 50- μm inner diameter CIEF capillary. Such configuration allows to increase the loading volume without affecting resolution and to decrease detection limits. Although, this work reports the boronate affinity SPE-CIEF analysis of small amphoteric molecules, this in-line coupling should find application for analysis of larger molecules like glycans, glycopeptides and glycoproteins. Analysis and characterization of biomolecules in the pharmaceutical industry is challenging and such in-line coupling could be interesting.

5. Supplementary material

Table S1. Comparison of catecholamines separation by cIEF without monolith at different urine contents.

Urine content in sample	R _{DA-A}	R _{A-NA}	Focusing voltage (kV)	Focusing time (min)	Mobilization time (min)
100	1.0	0.6	8	15	7
50	1.2	0.8	12.5	13	4
9	1.6	1.0	25	10	3

Focusing voltage was adapted to limit excess current during this step and preserve the HPC coating.

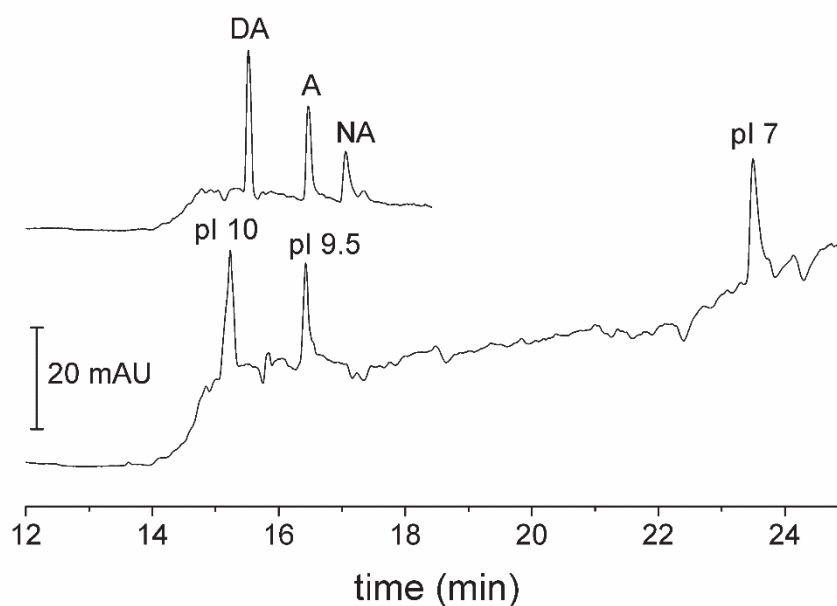


Figure S1. cIEF separation of catecholamines at $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ and pI markers in a silica fused capillary with HPC coating, total capillary length:30 cm, i.d.: $50 \mu\text{m}$. Carrier ampholyte composition: IDA at 1.7 mM, Arginine at 42.7 mM and 1.7 % (v/v) of Sigma Aldrich ampholyte (pH range from 3 to 10) in Beckman cIEF gel.

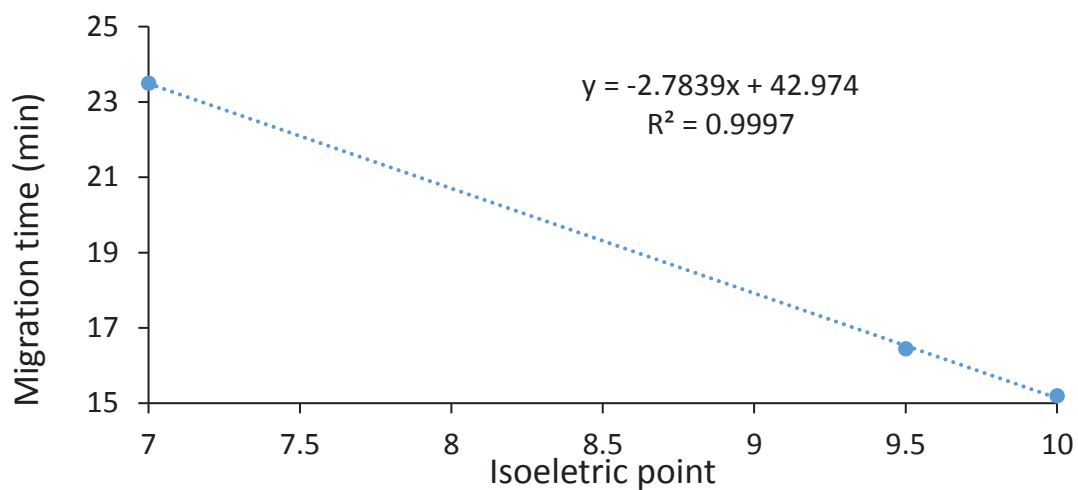


Figure S2. Plot of migration time versus isoelectric point of pI markers between 10 and 7.

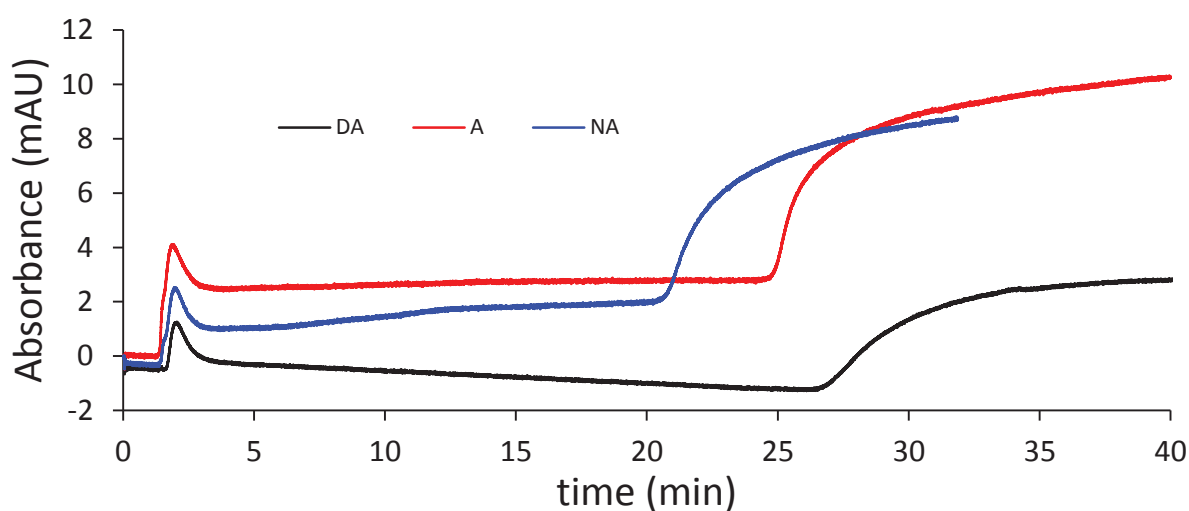


Figure S3. Example of frontal analysis of catecholamines at $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ using $15 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$ buffer solution.

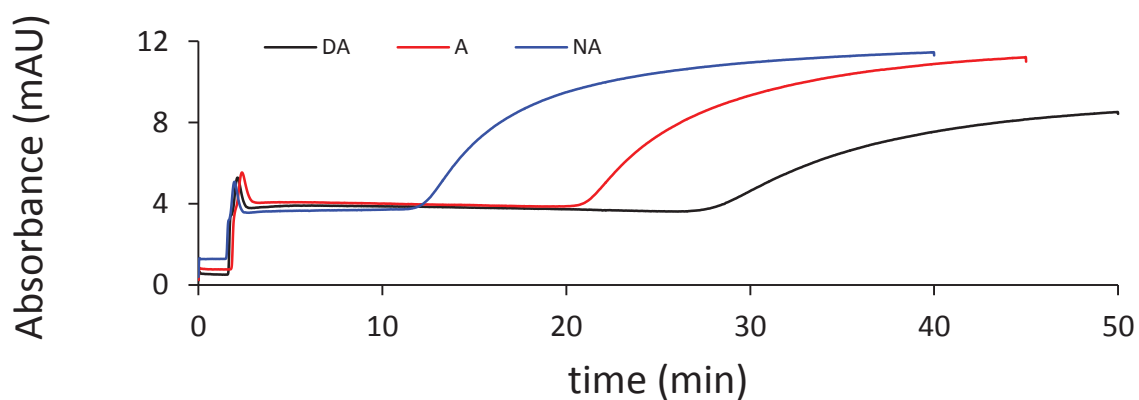


Figure S4. Example of frontal analysis of catecholamines at $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ using $15 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$ buffer solution with 20% (v/v) MeOH.

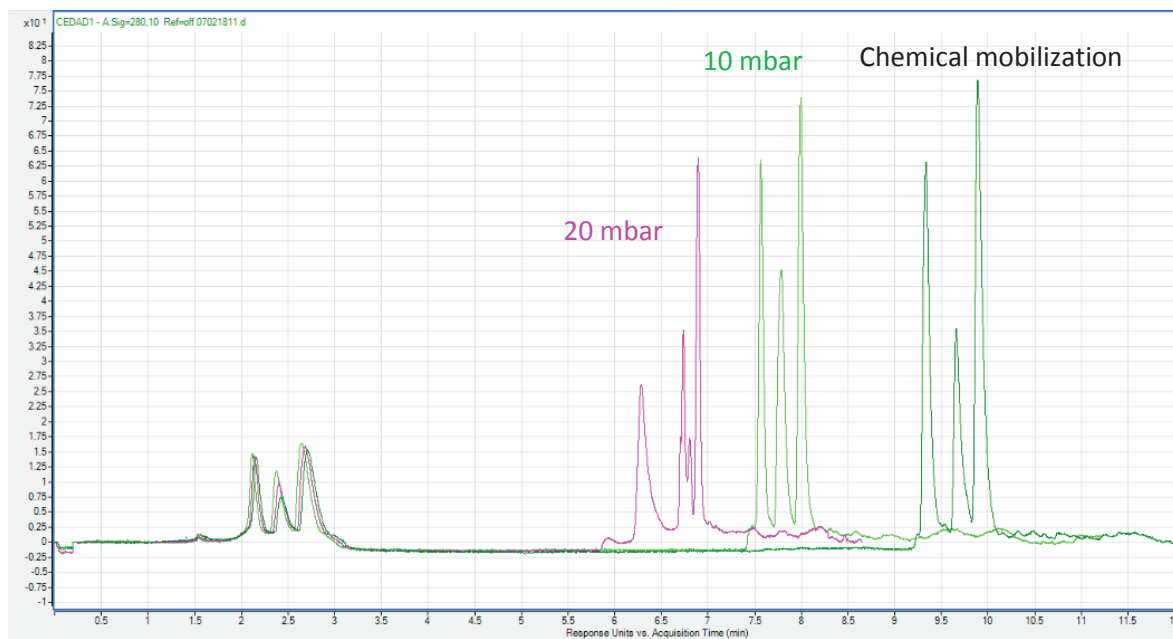


Figure S5. Comparison between hydrodynamic (10 and 20 mbar pressurized mobilization) and chemical mobilization in open tubular capillary.

6. References

- [1] P.G. Righetti, R. Sebastiano, A. Citterio, Capillary electrophoresis and isoelectric focusing in peptide and protein analysis, *PROTEOMICS*. 13 (2013) 325–340.
- [2] X. Liu, Z. Susic, I.S. Krull, Capillary isoelectric focusing as a tool in the examination of antibodies, peptides and proteins of pharmaceutical interest, *J. Chromatogr. A*. 735 (1996) 165–190.
- [3] G. Zhu, L. Sun, P. Yang, N.J. Dovichi, On-line amino acid-based capillary isoelectric focusing-ESI-MS/MS for protein digests analysis, Vol. 750 (2012) 207–211.
- [4] L. Li, Z. Xia, J. Pawliszyn, Selective extraction and enrichment of glycoproteins based on boronate affinity SPME and determination by CIEF-WCID, *Anal. Chim. Acta*. 886 (2015) 83–90.
- [5] K. Shimura, T. Nagai, Capillary isoelectric focusing after sample enrichment with immunoaffinity chromatography in a single capillary, *Sci. Rep.* 6 (2016) 39221.
- [6] K. Shimura, T. Nagai, Direct coupling of immobilized metal ion affinity chromatography and capillary isoelectric focusing in a single capillary, *J. Electrophor.* 59 (2015) 7–17.
- [7] Z. Liu, J. Pawliszyn, Coupling of Solid-Phase Microextraction and Capillary Isoelectric Focusing with Laser-Induced Fluorescence Whole Column Imaging Detection for Protein Analysis, *Anal. Chem.* 77 (2005) 165–171.
- [8] 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.
- [9] A. Marechal, F. Jarrosson, J. Randon, V. Dugas, C. Demesmay, In-line coupling of an aptamer based miniaturized monolithic affinity preconcentration unit with capillary electrophoresis and Laser Induced Fluorescence detection, *J. Chromatogr. A*. 1406 (2015) 109–117.
- [10] X.-C. Liu, Boronic Acids as Ligands for Affinity Chromatography, *Chin. J. Chromatogr.* 24 (2006) 73–80.
- [11] D. Li, Y. Chen, Z. Liu, Boronate affinity materials for separation and molecular recognition: structure, properties and applications, *Chem. Soc. Rev.* 44 (2015) 8097–8123.
- [12] M.B. Espina-Benitez, J. Randon, C. Demesmay, V. Dugas, Back to BAC: Insights into Boronate Affinity Chromatography Interaction Mechanisms, *Sep. Purif. Rev.* 47 (2017) 214–228.
- [13] M.B. Espina-Benitez, J. Randon, C. Demesmay, V. Dugas, Development and application of a new in-line coupling of a miniaturized boronate affinity monolithic column with capillary zone electrophoresis for the selective enrichment and analysis of cis-diol-containing compounds, *J. Chromatogr. A*. 1494 (2017) 65-76.
- [14] S. Janků, M. Komendová, J. Urban, Development of an online solid-phase extraction with liquid chromatography method based on polymer monoliths for the determination of dopamine, *J. Sep. Sci.* 39 (2016) 4107–4115.
- [15] H.-P. Jiang, C.-B. Qi, J.-M. Chu, B.-F. Yuan, Y.-Q. Feng, Profiling of cis-Diol-containing Nucleosides and Ribosylated Metabolites by Boronate-affinity Organic-silica Hybrid Monolithic Capillary Liquid Chromatography/Mass Spectrometry, *Sci. Rep.* 5 (2015) 7785.
- [16] D. Li, Q. Li, S. Wang, J. Ye, H. Nie, Z. Liu, Pyridinylboronic acid-functionalized organic-silica hybrid monolithic capillary for the selective enrichment and separation of cis-diol-containing biomolecules at acidic pH, *J. Chromatogr. A*. 1339 (2014) 103–109.

- [17] L. Gao, J. Du, C. Wang, Y. Wei, Fabrication of a dendrimer-modified boronate affinity material for online selective enrichment of cis-diol-containing compounds and its application in determination of nucleosides in urine, *RSC Adv.* 5 (2015) 106161–106170.
- [18] P. Dou, L. Liang, J. He, Z. Liu, H.-Y. Chen, Boronate functionalized magnetic nanoparticles and off-line hyphenation with capillary electrophoresis for specific extraction and analysis of biomolecules containing cis-diols, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 7558–7563.
- [19] Q. Li, C. Lü, Z. Liu, Preparation and characterization of fluorophenylboronic acid-functionalized monolithic columns for high affinity capture of cis-diol containing compounds, *J. Chromatogr. A.* 1305 (2013) 123–130.
- [20] H. Li, H. Wang, Y. Liu, Z. Liu, A benzoboroxole-functionalized monolithic column for the selective enrichment and separation of cis-diol containing biomolecules, *Chem. Commun.* 48 (2012) 4115–4117.
- [21] Y. Liu, L. Ren, Z. Liu, A unique boronic acid functionalized monolithic capillary for specific capture, separation and immobilization of cis-diol biomolecules, *Chem. Commun.* 47 (2011) 5067–5069.
- [22] D. Li, Y. Li, X. Li, Z. Bie, X. Pan, Q. Zhang, Z. Liu, A high boronate avidity monolithic capillary for the selective enrichment of trace glycoproteins, *J. Chromatogr. A.* 1384 (2015) 88–96.
- [23] Y. Xu, Z. Wu, L. Zhang, H. Lu, P. Yang, P.A. Webley, D. Zhao, Highly Specific Enrichment of Glycopeptides Using Boronic Acid-Functionalized Mesoporous Silica, *Anal. Chem.* 81 (2009) 503–508.
- [24] Y. Lu, Z. Bie, Y. Liu, Z. Liu, Fine-tuning the specificity of boronate affinity monoliths toward glycoproteins through pH manipulation, *Analyst.* 138 (2013) 290–298.
- [25] B. Preinerstorfer, M. Lämmerhofer, W. Lindner, Synthesis and application of novel phenylboronate affinity materials based on organic polymer particles for selective trapping of glycoproteins, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 1673–1685.
- [26] L. Ren, Z. Liu, M. Dong, M. Ye, H. Zou, Synthesis and characterization of a new boronate affinity monolithic capillary for specific capture of cis-diol-containing compounds, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 4768–4774.
- [27] R. Tuytten, F. Lemièrre, E.L. Esmans, W.A. Herrebout, B.J. van der Veken, B.U.W. Maes, E. Witters, R.P. Newton, E. Dudley, Role of Nitrogen Lewis Basicity in Boronate Affinity Chromatography of Nucleosides, *Anal. Chem.* 79 (2007) 6662–6669.
- [28] R.J. Carvalho, J. Woo, M.R. Aires-Barros, S.M. Cramer, A.M. Azevedo, Phenylboronate chromatography selectively separates glycoproteins through the manipulation of electrostatic, charge transfer, and cis-diol interactions, *Biotechnol. J.* 9 (2014) 1250–1258.
- [29] P. Dou, Z. Liu, At-line coupling of magnetic-nanoparticle-based extraction with gel isoelectric focusing for protein analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 3423–3429.
- [30] D. Koval, V. Kašička, H. Cottet, Analysis of glycated hemoglobin A1c by capillary electrophoresis and capillary isoelectric focusing, *Anal. Biochem.* 413 (2011) 8–15.
- [31] 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.
- [32] A. Bruchet, V. Dugas, I. Laszak, C. Mariet, F. Goutelard, J. Randon, Synthesis and Characterization of Ammonium Functionalized Porous Poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) Monoliths for Microscale Analysis and Its Application to DNA Purification, *J. Biomed. Nanotechnol.* 7 (2011) 415–425.

- [33] H.S. Kim, I.W. Wainer, Rapid analysis of the interactions between drugs and human serum albumin (HSA) using high-performance affinity chromatography (HPAC), *J. Chromatogr. B.* 870 (2008) 22–26.
- [34] S. Mack, I. Cruzado-Park, J. Chapman, C. Ratnayake, G. Vigh, A systematic study in CIEF: Defining and optimizing experimental parameters critical to method reproducibility and robustness, *Electrophoresis.* 30 (2009) 4049–4058.
- [35] Q. Mao, J. Pawliszyn, Effect of salt concentration on separation patterns in static capillary isoelectric focusing with imaging detection, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* 729 (1999) 355–359. doi:10.1016/S0378-4347(99)00129-2.
- [36] P. Dou, L. Liang, J. He, Z. Liu, H.-Y. Chen, Boronate functionalized magnetic nanoparticles and off-line hyphenation with capillary electrophoresis for specific extraction and analysis of biomolecules containing cis-diols, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 7558–7563.
- [37] W. Wang, M. He, C. Wang, Y. Wei, Enhanced binding capacity of boronate affinity adsorbent via surface modification of silica by combination of atom transfer radical polymerization and chain-end functionalization for high-efficiency enrichment of cis-diol molecules, *Anal. Chim. Acta.* 886 (2015) 66–74.
- [38] H. Li, Z. Liu, Recent advances in monolithic column-based boronate-affinity chromatography, *TrAC Trends Anal. Chem.* 37 (2012) 148–161.
- [39] L. Ren, Y. Liu, M. Dong, Z. Liu, Synthesis of hydrophilic boronate affinity monolithic capillary for specific capture of glycoproteins by capillary liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 8421–8425.
- [40] Q. Li, C. Lü, H. Li, Y. Liu, H. Wang, X. Wang, Z. Liu, Preparation of organic-silica hybrid boronate affinity monolithic column for the specific capture and separation of cis-diol containing compounds, *J. Chromatogr. A.* 1256 (2012) 114–120.
- [41] L. Ren, Z. Liu, Y. Liu, P. Dou, H.-Y. Chen, Ring-Opening Polymerization with Synergistic Comonomers: Access to a Boronate-Functionalized Polymeric Monolith for the Specific Capture of cis-Diol-Containing Biomolecules under Neutral Conditions, *Angew. Chem. Int. Ed.* 48 (2009) 6704–6707.
- [42] G. Springsteen, B. Wang, A detailed examination of boronic acid–diol complexation, *Tetrahedron.* 58 (2002) 5291–5300.
- [43] C. Wenz, Capillary Isoelectric Focusing – A Comparison of Different Carrier Ampholytes for Monoclonal Antibody Charge Heterogeneity Analysis, *Labmate*, April 2017 [on-line] available: <https://www.labmate-online.com/news/chromatography/1/>.
- [44] L. Liu, Q. Li, N. Li, J. Ling, R. Liu, Y. Wang, L. Sun, X.H. Chen, K. Bi, Simultaneous determination of catecholamines and their metabolites related to Alzheimer’s disease in human urine, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 1198–1204. doi:10.1002/jssc.201000799.
- [45] J. He, Z. Liu, L. Ren, Y. Liu, P. Dou, K. Qian, H.-Y. Chen, On-line coupling of in-tube boronate affinity solid phase microextraction with high performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry for the determination of cis-diol biomolecules, *Talanta.* 82 (2010) 270–276.
- [46] Z.D. Peterson, D.C. Collins, C.R. Bowerbank, M.L. Lee, S.W. Graves, Determination of catecholamines and metanephrines in urine by capillary electrophoresis–electrospray ionization–time-of-flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. B.* 776 (2002) 221–229.
- [47] A.H.B. Wu, *Tietz clinical guide to laboratory tests*, 4th ed., Alan H.B. Wu, United States, 2006.

- [48] K. Vuorensola, H. Sirén, Determination of urinary catecholamines with capillary electrophoresis after solid-phase extraction, *J Chromatogr. A* 895 (2000) 317–327.
- [49] K. Vuorensola, H. Sirén, R. Kostainen, T. Kotiaho, Analysis of catecholamines by capillary electrophoresis and capillary electrophoresis–nanospray mass spectrometry: Use of aqueous and non-aqueous solutions compared with physical parameters, *15th Int. Symp. Microscale Sep. Anal.* 979 (2002) 179–189.
- [50] S. Wei, G. Song, J.-M. Lin, Separation and determination of norepinephrine, epinephrine and isoprenaline enantiomers by capillary electrophoresis in pharmaceutical formulation and human serum, *J. Chromatogr. A.* 1098 (2005) 166–171.
- [51] M. Perry, Q. Li, R.T. Kennedy, Review of recent advances in analytical techniques for the determination of neurotransmitters, *Anal. Chim. Acta.* 653 (2009) 1–22.

Conclusion générale et perspectives

Au regard des évolutions des méthodes séparatives, la miniaturisation associée à l'intégration d'étapes analytiques est une tendance qui ne cesse de prendre de l'importance. Dans ce cadre, le développement et la mise en œuvre d'outils intégrant les étapes de traitement d'échantillon, séparation et détection dans un format capillaire représente une des voies d'élaboration de systèmes miniaturisés à l'instar des systèmes microfluidiques « sur puce ». Le format capillaire, comparé aux systèmes sur puce, offre les avantages d'être intégrable directement sur des appareils commerciaux et de limiter les coûts liés au développement (prototypage). Une fois les verrous de la miniaturisation et de l'intégration levés (en termes de fabrication, de compatibilité des étapes, de performances analytiques), l'utilisation de ces outils ouvre des perspectives en termes d'automatisation (limitant la manipulation des échantillons et les sources d'erreurs), de réduction des volumes et de consommation de solvant (pour des échantillons en petite quantité ou pour limiter l'exposition des opérateurs à des échantillons dangereux).

Dans ce travail de thèse, le couplage en ligne (« in-line » ou intégré) d'une unité μ SPE avec des techniques séparatives miniaturisées a été envisagé. L'utilisation d'une étape de préconcentration en ligne en système miniaturisé (et donc de détection de très faible quantité de matière) est souvent nécessaire afin d'amplifier le signal. Il est également souvent préféré d'associer à cette préconcentration une purification ou extraction sélective de l'échantillon afin de limiter les effets d'interférences. A côté des mécanismes classiques, utilisés pour réaliser ces étapes de préparation d'échantillon comme le partage ou l'échange d'ions, des mécanismes un peu plus spécifiques permettent de cibler une classe de molécules voire une cible précise. Certains de ces mécanismes comme l'immunoaffinité sont très prisés en miniaturisation en raison de leur spécificité et affinité remarquable, permettant de travailler sur des échantillons très dilués tout en s'affranchissant d'un grand nombre d'interférents. L'utilisation de mécanismes d'affinité permettant d'interagir de façon un peu plus large en ciblant une spécificité moléculaire comme des fonctions cis-diols présente également un grand intérêt de par l'importance de ces molécules dans le monde biologique. Ces molécules comportant un groupement cis-diol sont depuis plusieurs décennies extraites, de façon sélective de matrices biologiques comme l'urine ou le plasma et regroupent des molécules de petites tailles comme certains neurotransmetteurs (adrénaline, noradrénaline et dopamine), des métabolites (nucléosides, sucres) voire des biomolécules beaucoup plus grosses comme les ARNs ou les glycoprotéines. Ces molécules possédant des fonctions cis-diols sont extraites à l'aide de supports fonctionnalisés avec des acides phénylboroniques par chromatographie d'affinité boronate (BAC).

Bien que ces supports aient fait l'objet d'intenses recherches ces dernières années et notamment en miniaturisation, leur utilisation en couplage en ligne avec des outils de séparation électrophorétique n'a pas été étudiée. Sous ces prémisses, ce travail de thèse s'est focalisé sur (1) une compréhension des mécanismes présents sur les supports d'affinité boronate, (2) le développement de différentes voies d'élaboration de phases stationnaires monolithiques fonctionnalisées avec des acides phénylboroniques et (3) le couplage « in-line » de ces supports de μ SPE à des séparations électrocinétiques et à une détection conventionnelle (UV-Vis) dans un format capillaire.

En prélude à ces développements, une étude bibliographique approfondie sur les interactions associées aux supports d'affinité boronate a été réalisée, permettant de faire émerger les spécificités nécessaires pour maîtriser l'utilisation de ces supports. Bien que l'interaction soit souvent nommée d'« d'interaction covalente réversible », la constante d'affinité associée à la formation du complexe boronate/composé cis-diol est relativement faible ($10^{-1} < K_d < 10^{-4}$ M). La chromatographie d'affinité boronate est donc, contrairement à l'immunoaffinité ($K_d \leq 10^{-7}$ M), une chromatographie dite de faible affinité. D'autre part, les fonctions acides phénylboroniques supportant l'interaction spécifique avec les composés cis-diols, sont également le lieu d'interactions non-spécifiques multiples telles que des interactions apolaires, électrostatiques et acide/base de Lewis. Ainsi, l'optimisation des conditions expérimentales de reconnaissance spécifique telles que le pH, l'ajout de modificateurs organiques et le contrôle de la force ionique est nécessaire pour maximiser les performances du support (affinité et sélectivité). La présence de ces différents modes d'interaction peut, par ailleurs, être mise à profit pour générer de la sélectivité lors de la séparation de composés autres que les composés porteurs de groupements cis-diols.

Le premier objectif expérimental de ce travail a porté sur l'élaboration de supports d'affinité boronate miniaturisés au format capillaire (μ BAMC). Différentes voies de synthèses ont été étudiées et comparées. Deux types de supports monolithiques ont été choisis. Un support à base de silice caractérisé par une grande surface spécifique mais une stabilité chimique restreinte et un support organique (poly(GMA-co-EDMA)) stable chimiquement, de plus faible surface spécifique que son homologue inorganique et présentant en surface des groupements réactifs (cycles époxydes) nécessaires à leur post-modification avec des dérivés d'acides phénylboroniques. La comparaison des performances, entre les différents supports et les différentes voies de fonctionnalisation, a été faite en déterminant la constante d'affinité (K_d), la quantité de sites actifs (m_b) et la spécificité par chromatographie d'affinité frontale. Une série de modes de fonctionnalisation de colonnes capillaires monolithiques a été développée en utilisant

des dérivés d'acide phénylboronique simples et d'affinité supérieure, selon des stratégies de fonctionnalisation directes (greffage chimique) et par polymérisation afin de trouver des alternatives de fonctionnalisation efficaces, rapides et si possible, localisables.

Les résultats de cette partie ont montré l'influence de la surface spécifique du support monolithique de base sur les performances en terme notamment de quantité de sites actifs. En effet, la plus grande capacité a été obtenue sur monolithes de silice ($500 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$). Les voies de fonctionnalisation développées sur monolithes de silice (photopolymérisation et photo-click « thiol-ène ») conduisent à des supports présentant un plus grand nombre de sites actifs que les monolithes poly(GMA-co-EDMA). La plus grande valeur de capacité ($1,93 \text{ } \mu\text{mol}$ de dérivé d'acide phénylboronique par cm de monolithe) a été obtenue par l'approche « thiol-ène » avec au moins 3 étapes de greffage successives. Par ailleurs, sur monolithe organique, une amélioration du nombre de sites actifs a été obtenue par greffage d'un dérivé di-fluoré d'acide phénylboronique (DFFPBA) par l'intermédiaire du greffage d'un polymère branché (polyéthylèneimine ou PEI). Malgré cela, la densité de greffage sur PEI reste inférieure à celle obtenue par l'approche « thiol-ène » sur monolithe de silice. De plus, le greffage par photo-click « thiol-ène » est une technique de fonctionnalisation rapide et localisable. Cette approche minimise également la contribution d'interactions secondaires.

Cette étude du greffage photo-click, a montré l'influence des substituants présents sur les dérivés d'acide phénylboronique sur leur réactivité lors de la fonctionnalisation. Effectivement, la proximité de groupement thiol sur le noyau aromatique de l'acide 3-Mercaptophénylboronique (MPBA) diminue la réactivité du dérivé et donc la capacité (nombre de sites actifs) du matériau. Aussi, contrairement aux résultats obtenus dans des travaux précédents au laboratoire, la voie « thiol-ène » (avec l'acide 3-acrylamidophénylboronique ou AAPBA) s'est révélée largement plus efficace que la voie « ène-thiol » (avec les dérivés thiolés).

En parallèle à la préparation de supports d'affinités performants, l'optimisation des conditions d'utilisation de ces supports d'affinité boronate a été nécessaire afin de déterminer les meilleures conditions expérimentales. Il a été confirmé que l'affinité est plus grande pour des pHs supérieurs au pKa de l'acide phénylboronique utilisé. Cependant une limite est atteinte pour des pHs où l'ionisation des groupements hydroxyles (des groupements cis-diols) apparaît. Aussi, il est possible de limiter la présence des interactions secondaires en travaillant en présence de sel (au moins 100 mM de Na_2HPO_4 en tant que tampon) et de modificateur organique (avec un maximum de 40% de MeOH sans affecter significativement la valeur du K_d). Il est par ailleurs intéressant de noter que les ions phosphates agissent

en tant que bases de Lewis sur les groupements boronates favorisant ainsi l'affinité. Egalement, Il a été démontré que dans les mêmes conditions expérimentales de pH, composition de solvant, force ionique et analyte modèle utilisé, l'affinité boronate/cis-diol, mesurée par le K_d , est identique pour les dérivés simples de l'acide phénylboronique (AAPBA et APBA).

Finalement, afin d'automatiser l'analyse des composés cis-diols, le couplage « in-line » de colonnes monolithiques d'affinité boronate miniaturisées (μ BAMC) avec une séparation électrocinétique a été envisagé. Deux couplages ont été étudiés comme preuve de concept. Le premier couplage étudié a porté sur le couplage d'un support μ BAMC à l'entrée d'un capillaire de séparation par électrophorèse capillaire de zone. Le support choisi est un support monolithique de silice fonctionnalisé par photopolymérisation de l'AAPBA. Un deuxième couplage a été étudié de façon à diversifier le mécanisme de séparation. Ce deuxième couplage intègre une unité μ BAMC, synthétisée par couplage époxy-amine de l'APBA sur un support organique, en amont d'une séparation CIEF. Des différences entre chaque outil ont émergé lors de l'optimisation des étapes de couplage. L'ajustement des dimensions relatives de l'unité μ BAMC et du capillaire de séparation (diamètre interne, longueur) est plus flexible en couplage avec la CIEF qu'en couplage avec la CZE en raison de l'absence d'écoulement électroosmotique et du faible courant en fin de mobilisation. Dans le cas du couplage μ BAMC-CZE la longueur de l'unité μ SPE est limitée à 3 cm pour des raisons de robustesse de la méthode liées à l'instabilité du courant. D'un point de vue compatibilité chimique, l'utilisation de pHs extrêmes lors de l'analyse par CIEF a limité son couplage aux unités μ BAMC développées sur monolithes organiques. En outre, l'optimisation des étapes de lavage et d'élution avant l'étape de séparation représente sûrement l'élément le plus critique de ces couplages. En effet, afin d'assurer la compatibilité entre ces deux étapes, il est nécessaire de trouver un compromis entre (i) les conditions optimales de capture et d'élution des catécholamines et (ii) les conditions optimales de séparation électrocinétique.

Chaque couplage après optimisation a permis l'analyse de catécholamines dans moins de 10 μ L d'urine. L'échantillon ne subit, avant cette analyse, qu'une simple étape de filtration et d'ajustement du pH. Les méthodes ont été caractérisées en terme de taux de récupération, linéarité, limites de détection et stabilité. Ces deux couplages permettent d'atteindre des limites de détection de l'ordre de la dizaine de ppb avec des taux de récupération autour de 100 %. En terme de stabilité, les deux méthodes analytiques ont été utilisées avec succès sur au moins 50 analyses. Enfin, cette approche de couplage en ligne répond parfaitement aux objectifs d'analyse de composés cis-diols de façon automatisée, performante en termes de purification et séparation, et dans un format miniaturisé.

Outre l'amélioration des couplages actuels par couplage à la spectrométrie de masse par exemple, ces travaux ouvrent des perspectives en terme (i) de couplage, tel que le développement de colonnes multimodales intégrant une phase d'affinité boronate couplée à une séparation chromatographique miniaturisée par nano-LC et (ii) d'applications. En effet, l'application des outils de préconcentration et purification de biomolécules (glycoprotéines et/ou glycopeptides) reste un challenge à l'échelle miniaturisée.