



HAL
open science

Électrochromatographie capillaire. Evaluation d'une nouvelle phase stationnaire mixte et application à l'analyse de peptides et à l'établissement de cartes peptidiques

Frédéric Progent

► **To cite this version:**

Frédéric Progent. Électrochromatographie capillaire. Evaluation d'une nouvelle phase stationnaire mixte et application à l'analyse de peptides et à l'établissement de cartes peptidiques. Autre. Université Paris Sud - Paris XI, 2005. Français. NNT : . tel-00010881

HAL Id: tel-00010881

<https://theses.hal.science/tel-00010881>

Submitted on 6 Nov 2005

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.

**UNIVERSITÉ PARIS XI
FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHÂTENAY-MALABRY
ÉCOLE DOCTORALE: PHYSICO-CIMIE DE PARIS SUD**

ANNÉE 2004 - 2005

SÉRIE DOCTORAT N° 857

THÈSE

présentée

À L'UNITÉ DE FORMATION ET DE RECHERCHE
FACULTE DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY
UNIVERSITÉ PARIS XI

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS XI

par

M Frédéric PROGENT

Électrochromatographie capillaire

**Évaluation d'une nouvelle phase stationnaire mixte et application
à l'analyse de peptides et à l'établissement de cartes peptidiques**

soutenue le : 8 juillet 2005

JURY : Madame Claire DEMESMAY (rapporteur)
Monsieur Jean Luc VEUTHEY (rapporteur)
Monsieur Pierre GAREIL
Monsieur Alain TCHAPLA
Madame Myriam TAVERNA (directeur de thèse)

Toutes les découvertes que les physiciens & les chimistes ont faites depuis quelques années à l'aide de l'électromoteur de VOLTA, semblent prouver, que c'est de l'emploi ingénieux & fréquent de ce précieux instrument, que la Chimie & la Physique doivent attendre la découverte des faits les plus importants pour leur perfection.

F. F. Reuss, Sur un nouvel effet de l'électricité galvanique, 1809, Mémoires de la Société Impériale des Naturalistes de Moscou, 2, 327-337

Merci à la REPUBLIQUE FRANÇAISE pour m'avoir financé pendant ces longues années de thèse.

Je souhaite exprimer toute ma gratitude à M^{me} Danielle FERRIER, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour sa profonde humanité.

J'exprime ma reconnaissance aux professeurs de Chimie Analytique de Châtenay-Malabry, M^{me} Arlette BAILLET, M. Patrice PROGNON et M. Pierre CHAMINADE, pour leur confiance à mon égard et pour avoir soutenu ma candidature à un demi-poste d'A.T.E.R..

Je remercie M^{me} Myriam TAVERNA, pour le temps qu'elle a passé sur ma thèse, pour la grande liberté qu'elle m'a laissée et la confiance dont elle m'a témoignée tout au long de ces années et enfin pour les efforts qu'elle a déployés pour faire connaître mes travaux de thèse.

Les "Dames de Châtenay" : M^{lle} Claire SMADJA, M^{lle} Isabelle LE POTIER et M^{me} Thuy N. TRAN-MAIGNAN, ont droit à ma plus profonde gratitude pour leur soutien et leur gentillesse attentionnée.

Je remercie toutes les personnes qui ont soutenu ce travail de thèse : BECKMANN COULTER FRANCE en la personne de M. Michel ANSELME, M. CLUZEAU et M^{me} Sophie BOSONNET du CEA Saclay.

Ma reconnaissance va aussi à M^{me} Claire DEMESMAY pour m'avoir initié au remplissage de colonne capillaire et pour avoir accepté de rapporter cette thèse.

Un grand merci à M. Jean-Luc VEUTHEY pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie M. GAREIL, pour la qualité de son enseignement dispensé en DEA, et pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse, ainsi que M. TCHAPLA, pour ses conseils avisés.

Merci à tous ces gens qu'il a été si agréable de croiser au laboratoire, Stéphanie et son cœur d'or, Julien, Céline, Cyrine, Najiba.... J'ai apprécié la présence des "petits nouveaux" : Danielle, Aurélie Azote, Ricardo, Erwan et je leur souhaite bonne route.

Enfin je dédie cet ouvrage à tout ceux qui m'ont soutenus durant cette thèse. Ce n'est que justice.

Grâce soit rendue à M^{lle} Sandrine ROY, qui fut mon meilleur soutien moral tout au long de ces années de labeur : elle fut ir-rem-pla-çable. Merci pour ta présence, ton humour, ta franchise et ton oreille compatissante. A nos rêves de colonisations, aux bennes à papier, à la *pasta al dente*... c'est-à-dire quand la Vie entre au labo.

Merci à M. Pierre AULAS, historien dans l'âme, pour sa patiente étude nommée « évolution du thésard de chimie analytique, vie et mort » et pour sa capacité inépuisable d'écoute.

A M. Thomas LE SAUX, un homme en noir, pour sa capacité d'innovation linguistique tout à fait rafraîchissante et pour son soutien.

A M^{lle} Violaine AUGUSTIN, pour la Science, mais surtout pour les diatribes sur des sujets divers et variés : la pâtisserie, Munich, les ballets, les voyages...

A M^{lle} Sandra FIRMIN, deux mots : finis vite !

Aux amis estampillés DEA, Gwen et Christophe, Céline.

Aux "Strasbourgeois" de cœur, d'adoption, de passage : Armelle, Anne-Claire, Céline, les Christophe's' en pagaille, Cyrille, Elisabeth, Gaëlle et Jocelyn, Maëlle, Marpessa, Mireille et Michel, Nelly, Stéphane, Valérie, Yann et associés pour leur écoute et leur mansuétude à l'égard d'un doctorant.

Et enfin un grand merci aux amis, collègues, étudiants qui par un mot gentil ont donné de la lumière à chaque jour.

A maman... pour tout

Et à papa.

Notations et abréviations

Lettres latines

A : coefficient lié à l'anisotropie d'écoulement

B : coefficient lié à la diffusion longitudinale

C_m : coefficient lié à la résistance au transfert de masse dans la phase mobile.

C_s : coefficient lié à la résistance au transfert de masse dans la phase stationnaire.

C_i : la concentration de l'espèce i

D : coefficient de diffusion du soluté dans la phase mobile

d_p : diamètre des particules de phase stationnaire

E : champ électrique

e : charge élémentaire

F : constante de Faraday

k : constante Boltzman

k_{app} : facteur de rétention apparent

k_{chrom} : facteur de rétention chromatographique (en CLHP)

$k_{chrom ECC}$: facteur de rétention chromatographique en ECC

k_{ECC} : facteur de rétention en ECC

H : hauteur équivalente en plateau théorique

I : force ionique

i_{creux} : courant mesuré dans un capillaire creux

i_{rempli} : courant mesuré dans une colonne capillaire d'ECC

L_{totale} : longueur totale du capillaire

$L_{remplie}$: longueur de la portion remplie de phase stationnaire de la colonne

L_{creux} : longueur de la portion creuse du capillaire

L_e : longueur « moyenne » effectivement parcourue par un soluté dans la colonne remplie

N_a : nombre d'Avogadro

q_i : charge du soluté i

R : constante des gaz parfaits

r_i : rayon d'hydratation du soluté i

T : température absolue

t_{eo} : temps caractéristique du flux électroosmotique

t_m : temps de migration

t_i : temps d'élution du composé i

t_0 : temps mort

u : vitesse linéaire d'écoulement de la phase mobile dans la colonne

V_{totale} : tension appliquée aux bornes du capillaire

V_{remplie} : tension estimée entre les deux extrémités de la portion remplie du capillaire

V_{creux} : tension estimée entre les deux extrémités de la portion creuse du capillaire.

v_{obs} : vitesse observée pour le composé i

v_{sol} : vitesse du composé i en solution, qui est la somme de v_{eo} et de v_{ep}

v_{eo} : vitesse électroosmotique

v_{ep} : vitesse électrophorétique, propre au composé étudié (vitesse algébrique), dans la colonne.

Z_i : la charge de l'espèce i en solution

Lettres grecques

δ : épaisseur de la double couche

ζ : potentiel zéta

ε : porosité

ε_0 : permittivité du vide

ε_r : permittivité relative du milieu ou constante diélectrique

λ : fraction remplie du capillaire

η : viscosité

μ_{eo} : mobilité électro-osmotique

$\mu_{\text{eo rempli}}$: mobilité électroosmotique dans la portion remplie

$\mu_{\text{ep } i}$: mobilité électrophorétique du composé i

$\mu_{\text{ep } i}^{\infty}$: mobilité électrophorétique du composé i extrapolée à dilution infinie en tampon

κ_e : facteur de vitesse

γ_c : facteur d'obstruction de la colonne

ρ_{remplie} : résistivité de la portion remplie du capillaire

σ : densité de charges totale en excès dans le plan de Stern

σ_{obs} : écart-type observé

σ_{colonne} : écart-type lié à la colonne

σ_{externe} : écart-type lié à des phénomènes externes à la colonne

$\sigma_{\text{injection}}$: écart-type lié à l'injection

$\sigma_{\text{détection}}$: écart-type lié à la détection

$\sigma_{\text{électrodispersion}}$: écart-type lié à l'électrodispersion

$\sigma_{\text{effet joule}}$: écart-type lié à l'effet Joule

$\sigma_{\text{discontinuité}}$: écart-type lié à une discontinuité du système

σ_{creuse} : conductivité de la portion creuse de la colonne capillaire

$\sigma_{\text{particule}}$: conductivité de la phase stationnaire

σ_{remplie} : conductivité de la portion remplie de la colonne capillaire

τ : facteur traduisant la porosité de la colonne

ω : coefficient numérique

Abréviations

ACN : acétonitrile

AcOH : acide acétique

CLHP : chromatographie en phase liquide haute performance

EC : électrophorèse capillaire

ECZ : électrophorèse capillaire de zone

ECC : électrochromatographie capillaire

pECC : électrochromatographie capillaire assistée par pression

PEG : poly éthylène glycol

FEO : flux électroosmotique

MEB : microscopie électronique à balayage

MeOH : méthanol

TFA : acide trifluoro acétique (nous conservons l'acronyme anglais)

UV : ultra-violet

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ARTICLES ISSUS DE CE TRAVAIL	13
INTRODUCTION GENERALE	15
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	21
Chapitre I PRINCIPE ET THEORIE DE L'ELECTROCHROMATOGRAPHIE CAPILLAIRE	23
Introduction	25
I Définitions et système d'analyse	26
II Flux électroosmotique (FEO)	27
II.1 Notion générale sur le flux électroosmotique	27
II.2 Le flux électroosmotique en ECC	30
II.2.A Flux électroosmotique de premier type	32
II.2.B Flux électroosmotique de second type	33
III Efficacité et phénomènes de dispersion	38
IV Electromigration	42
IV.1 Notion de mobilité électrophorétique	42
IV.2 Phénomène d'électromigration en ECC	43
V Rétention chromatographique en ECC	43
V.1 Facteur de rétention en chromatographie en phase liquide	44
V.2 Estimation de la rétention chromatographique en ECC	44
VI Influence des paramètres opératoires sur les séparations en ECC	47
VI.1 Tension	47
VI.2 Concentration du tampon de la phase mobile	49
VI.3 Pourcentage de solvant organique dans la phase mobile	51
VI.3.A Effet sur le FEO	52
VI.3.B Effet sur l'éluion des analytes	53

Chapitre II COLONNES D'ELECTROCHROMATOGRAPHIE CAPILLAIRE	55
I Colonnes capillaires creuses	57
II Colonnes capillaires remplies	60
II.1 Colonnes remplies de particules de phase stationnaire	61
II.1.A Méthodes de remplissage des capillaires	61
II.1.B Méthodes d'immobilisation des particules de phase stationnaire	62
II.1.B.a Frittés	62
II.1.B.b Restriction du diamètre interne du capillaire	63
II.1.B.c Nano-glue	64
II.1.B.d Immobilisation thermique sur la totalité de la colonne [114]	65
II.2 Colonnes monolithiques	66
II.2.A Monolithes inorganiques, méthode sol-gel	67
II.2.B Monolithes organiques	69
II.2.B.a Monolithes à base de polyacrylamide	69
II.2.B.b Monolithes à base de polystyrène-divinylbenzène	71
II.2.B.c Monolithes à base de polyacrylate et de poly-méthacrylate	72
Conclusions	73
Chapitre III PHASES STATIONNAIRES MIXTES EN ELECTROCHROMATOGRAPHIE CAPILLAIRE	75
Introduction	77
I Les différents types de phases stationnaires mixtes	78
II Phases mixtes comportant des groupements anioniques	80
III Phases mixtes comportant des groupements cationiques	82
Chapitre IV CARTES PEPTIDIQUES PAR ELECTROCHROMATOGRAPHIE CAPILLAIRE	91
Introduction	93
I Electrochromatographie capillaire pressurisée (pECC)	94
II ECC sur colonnes capillaires creuses et assimilés	97
II.1 ECC sur colonnes capillaires creuses	97
II.2 ECC sur support gravés ou COMOSS	98
III ECC sur colonnes remplies	100

Introduction	109
Chapitre V FABRICATION DE COLONNES CAPILLAIRES D'ELECTROCHROMATOGRAPHIE	111
Introduction	113
I Phases stationnaires	113
I.1 Phases de séparation	113
I.2 Phases utilisées pour la formation de frittés	114
II Matériels et méthodes	115
II.1 Appareillages	115
II.1.A Remplissage des colonnes	115
II.1.B Microscopie électronique à Balayage (MEB)	116
II.1.C Analyses par ECC	116
II.1.D Introduction de sol-gel dans un capillaire	116
II.2 Méthodes	116
II.2.A Remplissage de la colonne	116
II.2.B Protocoles d'immobilisation par formation d'un sol-gel	116
II.2.B.a Protocole dérivé des travaux de Tang <i>et al.</i>	116
II.2.B.b Protocoles dérivés des travaux de Chirica et Remcho	117
II.2.C Mode d'introduction du mélange sol-gel dans un capillaire rempli	118
II.2.C.a Introduction par capillarité	118
II.2.C.b Introduction sous pression de gaz	118
II.2.C.c Introduction à l'aide d'un pousse seringue.....	119
II.2.D Fabrication des frittés par chauffage	119
II.2.E Observation par Microscopie Electronique à Balayage	120
II.2.F Test de résistance mécanique des frittés	120
II.2.G Test de stabilité de colonnes capillaires Stability BS-C23 à pH acide et basique	120
III Mise au point du protocole de remplissage	121

IV Optimisation du protocole d'immobilisation de la phase stationnaire	124
IV.1 Immobilisation de la phase stationnaire par un procédé sol-gel	124
IV.1.A Méthode proposée par Tang <i>et al.</i>	125
IV.1.B Élaboration du mélange sol-gel	126
IV.1.B.a Temps de gélification et aspect.....	126
IV.1.B.b Ancrage au niveau des parois du capillaire et rétractation du gel.....	127
IV.1.C Modes d'introduction du sol-gel dans un capillaire rempli de phase stationnaire .	128
IV.1.D Résultats	129
IV.2 Frittés réalisés par chauffage	131
V Etude de la stabilité à moyen terme des colonnes	135
Discussion	138
Chapitre VI FLUX ELECTROSMOTIQUE REEL ET POROSITE ELECTROKINETIQUE REELLE : DEUX OUTILS DE CARACTERISATION D'UNE COLONNE D'ECC	143
Introduction	145
Article 1	147
Chapitre VII ECC DE PEPTIDES SUR LA PHASE STABILITY BS-C23 ET ETUDE DES MECANISMES DE RETENTION	173
Article 2	175
Article 3	187
Chapitre VIII DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION	207
ANNEXES	217
Annexe I : Montages de Remplissage	219
Annexe II : dessalage des digestions de protéine	221
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	223

Liste des articles issus de ce travail

Article 1

Soumis Electrophoresis

Reliable parameters to evaluate impact of mobile phase composition on capillary electrochromatography performance with monolithic and particulate packed capillary columns.

F. PROGENT, V. AUGUSTIN, N. T. TRAN, S. DESCROIX, M. TAVERNA

Article 2

J. Chromatogr. A 1052, (2004), 181-189

Retention behaviour of peptides in capillary electrochromatography using an embedded ammonium in dodecacyl stationary phase

F. PROGENT, M. TAVERNA

Article 3

A soumettre

Chromatographic behaviour of peptides on a mixed mode stationary phase with an embedded polar and charged group by capillary electrochromatography and HPLC.

F. PROGENT, C. SMADJA, A. BANCO, A. TCHAPLA, M. TAVERNA

INTRODUCTION GENERALE

Parmi les différentes familles de molécules biologiques, celle des peptides représente une classe de plus en plus étudiée. Les peptides peuvent revêtir des fonctions biologiques très variées. Ils se retrouvent dans l'organisme, en tant qu'hormone, neurotransmetteur, immuno-modulateur, coenzyme, substrat ou inhibiteur d'enzymes. Ils peuvent posséder en outre des propriétés de toxines ou d'antibiotiques [1]. Ils jouent un rôle important dans le contrôle et la régulation de processus vitaux, et un nombre croissant de peptides de synthèse est actuellement employé dans l'industrie pharmaceutique comme principe actif. La peptidomique, c'est-à-dire la cartographie des différents peptides présents dans un organisme, tissu ou cellule à un temps donné, nécessite de pouvoir séparer un mélange complexe de peptides structurellement très proches. Mais l'analyse de peptides est également une étape essentielle à l'identification d'une protéine, en protéomique, ou encore au contrôle qualité de protéines à visée thérapeutique. En effet la digestion d'une protéine par une protéase suivie de l'analyse des fragments peptidiques obtenus constitue une méthode largement reconnue et utilisée dans ces deux domaines.

Les mélanges peptidiques issus de prélèvements biologiques ou de digestions de protéines, sont particulièrement complexes à analyser : les peptides peuvent présenter des masses molaires, des hydrophobies et des points isoélectriques très variés. Protéines et peptides portent de nombreuses fonctions ionisées et ont une charge nette non nulle aux pH différents de leur propre point isoélectrique, ils sont donc très rarement neutres. Un grand nombre de peptides et à fortiori de protéines présentent des régions hydrophobes et de plus les peptides peuvent adopter des conformations particulières qui caractérisent leur structure secondaire.

Actuellement les cartographies peptidiques sont principalement réalisées par chromatographie en phase liquide haute performance (CLHP) sur phases stationnaires octadécyle et en employant des phases mobiles acides. Ces cartographies nécessitent la mise en œuvre de gradients d'élution et conduisent à des analyses de longues durées (100 à 200 min classiquement). C'est pourquoi le développement de méthodes d'analyse plus rapides et permettant de diminuer les quantités d'échantillon nécessaires constitue l'un des enjeux majeurs dans ce domaine.

La combinaison de techniques miniaturisées et faisant intervenir des mécanismes de séparation plus sélectifs représente l'un des défis analytiques actuels. Dans ce contexte, l'avènement de la nano-CLHP ou encore de l'électrophorèse capillaire (EC) a constitué une avancée non négligeable dans le domaine de l'analyse de peptides. L'électrochromatographie capillaire (ECC), introduite récemment, est une technique séparative innovante qui peut associer les phénomènes séparatifs électrocinétiques et chromatographiques. Elle possède donc le potentiel pour amener la sélectivité nécessaire à la séparation de mélanges complexes de peptides. Cependant, les phases stationnaires à polarité de

phases inversée traditionnelles se sont avérées souvent décevantes pour ces analyses. Ceci est principalement dû à la faiblesse du flux électroosmotique généré (FEO) pour ces phases neutres en conditions acides. Pour exploiter les atouts de l'ECC, il est apparu primordial de développer des phases stationnaires mixtes à la fois chargées pour générer un FEO et porteuses de greffons organiques hydrophobes pour assurer la rétention des peptides. Actuellement ces phases ont vu le jour aussi bien sous la forme de phases stationnaires particulières que monolithiques.

Le but de mon travail de thèse a été d'explorer le potentiel d'une nouvelle phase stationnaire particulière mixte et chargée en ECC pour analyser des mélanges complexes de peptides en conditions acides.

Dans un premier temps, nous nous sommes attachés à rappeler les fondements théoriques de l'ECC, tels qu'ils ont pu être établis à ce jour. Les phénomènes qui commandent la séparation électrochromatographique : le FEO, la mobilité électrophorétique des composés, leurs interactions avec la phase stationnaire et leur rétention sont présentés en détail dans le cas de l'ECC au chapitre I. Nous avons également présenté et discuté les différents modèles mathématiques permettant de dissocier et d'estimer les composantes chromatographiques et électrophorétiques en ECC.

Dans un second temps, nous présentons les différents types de colonnes capillaires employées en ECC ainsi que leurs caractéristiques (chapitre II), en insistant plus particulièrement sur les phases stationnaires mixtes chargées récemment employées en ECC (chapitre III).

Enfin nous décrivons les différentes analyses réalisées par ECC ou des techniques dérivées reportées dans la littérature pour l'établissement de cartes peptidiques (chapitre IV).

Le travail expérimental a concerné plusieurs aspects de l'ECC. Le premier a été la mise au point d'un protocole de remplissage de capillaire par une phase mixte Stability BS-C23 récemment introduite. Il s'agit d'une étape délicate et nous avons recherché des solutions pour limiter la fragilité des capillaires liée en grande partie à la présence de frittes nécessaires pour immobiliser la phase stationnaire au sein de la colonne (Chapitre V).

Nous nous sommes ensuite attachés à définir des paramètres pertinents permettant d'évaluer, dans des conditions réelles d'analyse d'ECC, l'effet de la composition et de la nature de la phase mobile sur les performances de la colonne. Leur détermination permet de vérifier la bonne mouillabilité de la phase qui peut constituer un paramètre critique en ECC, mais aussi de définir les conditions d'analyses permettant d'éviter les efficacités médiocres et les sélectivités trop faibles parfois rencontrées (Chapitre VI).

Nous avons ensuite mené une étude approfondie des caractéristiques de la phase stationnaire mixte Stability BS-C23 en ECC en terme de FEO, de stabilité, de propriétés de rétention et des facteurs expérimentaux jouant sur la séparation de peptides. Nous avons étudié l'influence de la composition de la phase mobile sur l'élution de peptides et tenté d'estimer les parts respectives des phénomènes chromatographique et électrophorétique impliqués lors de leur analyse. Enfin, dans le but de valider certains modèles mathématiques proposés pour prédire la rétention chromatographique en ECC, mais aussi pour étudier l'hypothèse selon laquelle la rétention chromatographique serait différente en ECC et en chromatographie liquide haute performance (CLHP), nous avons entrepris une comparaison expérimentale des rétentions chromatographiques de peptides avec ces deux méthodes sur la phase Stability BS-C23 (Chapitre VII).

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I

PRINCIPE ET THEORIE DE L'ELECTROCHROMATOGRAPHIE CAPILLAIRE

INTRODUCTION

L'électrochromatographie capillaire (ECC) est une technique séparative électrocinétique qui fait l'objet d'une attention croissante depuis une dizaine d'années. Elle conjugue les phénomènes d'électrophorèse capillaire (EC), avec une séparation sous champ électrique, et les phénomènes de chromatographie en phase liquide haute performance (CLHP), qui impliquent des interactions entre les analytes et une phase stationnaire.

Jorgenson *et al.* [2], en 1981, furent les premiers à évoquer et à appliquer l'électrochromatographie à des colonnes capillaires. Mais l'ECC ne fut vraiment prospectée qu'à partir des années 90.

L'ECC était alors envisagée comme une simple superposition de l'EC et de la CLHP, pour lever les limites inhérentes à ces techniques.

La CLHP se heurtait à de fortes pertes de charge dès lors que des petites particules de faibles diamètres étaient employées comme phase stationnaire, ceci interdisait l'accès aux très grandes efficacités attendues avec l'utilisation de petites particules.

D'autre par l'électrophorèse capillaire (EC) se montrait encore peu apte à séparer des composés neutres et/ou peu hydrosolubles.

Les exceptionnelles efficacités obtenues par Smith [3] ont alors démontré le grand potentiel de l'ECC et ont "lancé la méthode". Après une période de recherche tout azimut, un travail énorme a été entrepris pour permettre la fabrication et le remplissage des colonnes capillaires par divers types de phases stationnaires, véritable cœur du système d'ECC. Parallèlement, des recherches ont été menées d'un point de vue plus théorique, en particulier sur les phénomènes électrocinétiques et sur les mécanismes séparatifs dans les systèmes d'ECC.

Comme l'a écrit Pesek, l'un des pères fondateurs de l'ECC, [4], la technique après une période d'euphorie où elle paraissait être "prometteuse", semble arriver à une certaine maturité. Beaucoup se sont heurtés aux difficultés techniques et les limites de cette technique se profilent, comme ce fut le cas pour la CLHP en son temps. Mais la technologie de fabrication et de remplissage des colonnes s'affine, la somme des recherches réalisées permet de mieux comprendre cette méthode, et d'envisager une utilisation raisonnée. Plusieurs compilations et ouvrages rassemblent les bases théoriques de l'ECC, telles qu'elles ont pu être dégagées à ce jour [5-16] et une synthèse est donnée dans ce qui suit.

I DEFINITIONS ET SYSTEME D'ANALYSE

Si la chromatographie liquide haute performance (CLHP) et l'électrophorèse capillaire (EC) sont des techniques établies qui se passent de toute définition, il est en revanche utile de préciser les différentes variantes de l'électrochromatographie, proposées dans la littérature.

La CLHP assistée par électrophorèse, conserve toutes les caractéristiques de la CLHP, en particulier la mise en mouvement de la phase mobile par une différence de pression et la possibilité d'employer des gradients d'élution. Dans ce cas, la tension qui se surajoute permet un simple gain de sélectivité, qui reste de faible ampleur. L'analyse se fait, le plus souvent, sur une chaîne de CLHP.

L'ECC est réalisée dans des capillaires (de quelques dizaines à quelques centaines de μm de diamètre) ou dans des puces, qui contiennent une phase stationnaire. Le système est soumis à une différence de potentiel, et la phase mobile conductrice est mise en mouvement par le flux électroosmotique. Toute différence de pression appliquée entre les deux extrémités du système séparatif est exclue dans cette technique.

Un système d'ECC avec une différence de pression appliquée aux extrémités du système sera qualifié d'ECC pressurisée. La différence de pression appliquée participe alors à la mise en mouvement de la phase mobile. Cette technique est parfois confondue dans la littérature avec une variante de l'ECC où les deux extrémités du capillaire sont soumises à une même pression. Cette mise sous pression globale du système vise à éviter la formation de bulles dans la colonne, mais la pression ne joue aucun rôle dans la séparation. Nous parlerons toujours dans ce cas d'ECC.

La différence entre CLHP assistée par électrophorèse et ECC pressurisée est ténue. Le nom dérive du mode de séparation supposé majoritaire : rétention chromatographique ou migration électrophorétique. La différence principale, dans les faits, est la possibilité d'employer ou non un gradient d'élution (cas de la CLHP assistée par électrophorèse) et la valeur de la différence de pression appliquée.

Nous considérerons dans la suite du manuscrit uniquement le mode ECC, qui est le plus courant. L'appareillage employé dans ce cas, est généralement un appareil d'EC classique équipé d'un dispositif de mise sous pression des flacons d'analyse (Fig 1).

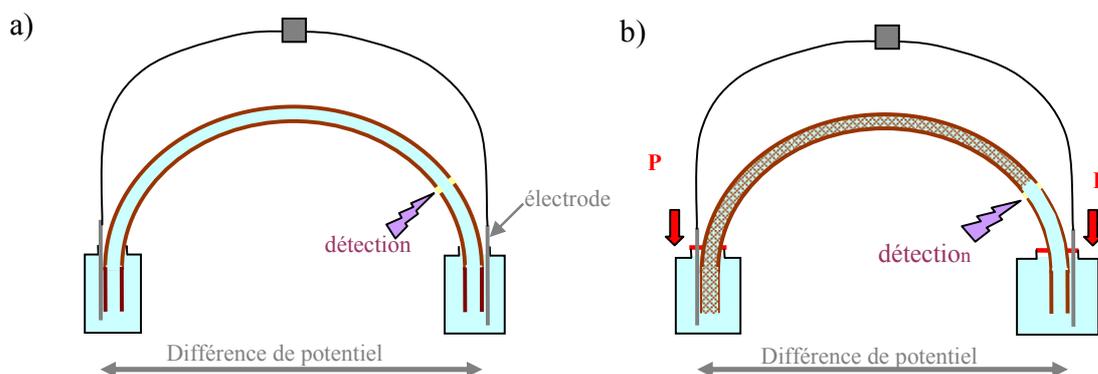


Figure 1 : Systèmes d'analyse électrocinétique a) EC classique, b) ECC, la colonne comportant une portion remplie. Mise sous pression des flacons d'électrolyte.

La différence fondamentale entre EC et ECC est la présence d'une phase stationnaire, qu'il s'agisse d'une pellicule recouvrant les parois internes du capillaire (tube ouvert), ou d'un remplissage du lumen par des particules ou un monolithe (*cf* chapitre II).

Des interactions variées gouvernent la migration et la séparation des analytes en ECC. Si la plupart des auteurs s'accordent pour voir dans l'ECC une méthode hybride entre la CLHP et l'EC, il semble qu'il ne s'agisse pas d'une simple additivité des phénomènes de rétention observés en chromatographie d'une part, avec le flux électroosmotique (FEO) et la migration électrophorétique d'autre part. La compréhension et la maîtrise de l'interactivité de ces phénomènes clés [15,17] constituent l'un des défis des recherches actuelles portant sur l'ECC.

Nous ferons donc un récapitulatif des connaissances concernant le FEO, la migration électrophorétique et la rétention en ECC ainsi que des paramètres pouvant influencer sur ces phénomènes.

II FLUX ELECTROOSMOTIQUE (FEO)

Le flux électroosmotique (FEO) est un élément important dans les techniques électrocinétiques puisqu'il assure la mise en mouvement de la phase mobile. A ce titre, son amplitude va déterminer la rapidité des analyses, alors que sa stabilité participe à la reproductibilité de la méthode d'analyse.

Il est, par ailleurs, caractéristique de l'état de surface de la colonne capillaire et peut servir d'outil de contrôle de la phase stationnaire.

II.1 Notion générale sur le flux électroosmotique

Le FEO trouve son origine dans l'existence de charges positives ou négatives immobilisées à l'interface solide-liquide du système de séparation (paroi du capillaire, phase stationnaire). Ce phénomène est d'ailleurs largement exploité en l'EC, où, la majorité des capillaires employés sont en

silice fondue et peuvent présenter, dans certaines conditions (pH neutres et basiques, etc...), des silanols chargés négativement sur les parois du capillaire.

La présence de ces charges induit une répartition particulière des ions en solution, qui a fait l'objet de plusieurs modélisations [18]. Nous ne considérerons ici que le modèle de la double couche de Gouy-Chapman-Stern qui est le plus communément employé pour décrire le FEO. Dans ce modèle, la surface présente une densité surfacique de charge σ et des contre ions de l'électrolyte s'accumulent et forment une double couche compacte (dite aussi couche statique ou couche de Stern) au voisinage direct de cette surface chargée (Fig.°2, A). La couche compacte est limitée par le plan externe de Helmholtz. Au delà, les contre ions excédentaires s'accumulent en une couche diffuse, appelée aussi couche de Gouy. Cette répartition des charges induit des variations de potentiel, ϕ , dans la solution, en fonction de l'éloignement de l'interface (Fig.°2, B). Dans ce modèle, la couche compacte se comporte comme un condensateur électrique (variation linéaire du potentiel entre la paroi du capillaire et le plan externe de Helmholtz).

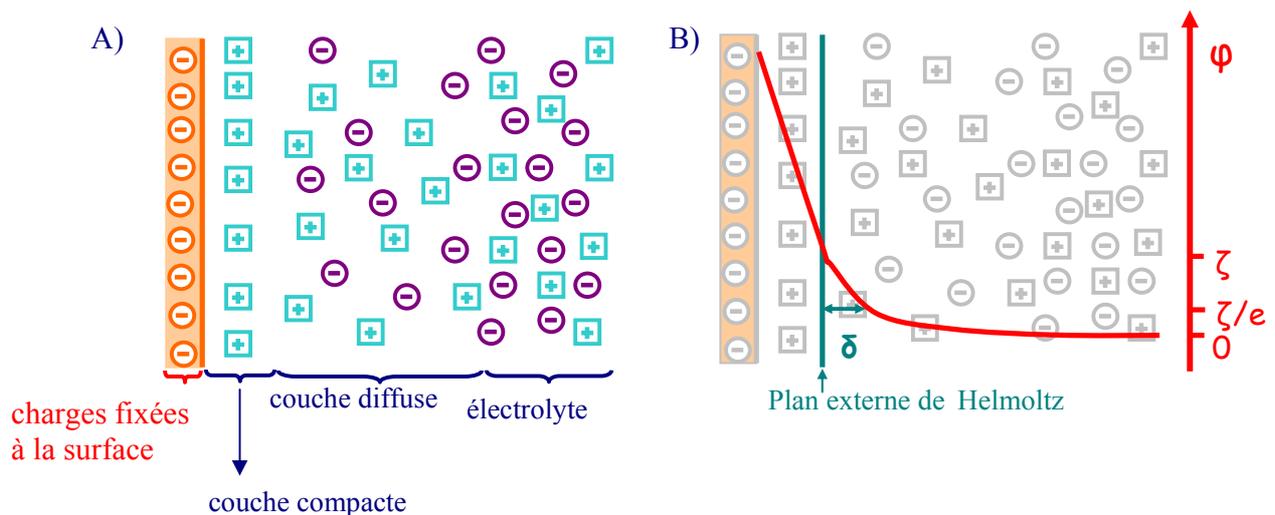


Figure 2 : Répartition des espèces chargées dans le modèle de la double couche électrique à la surface d'un capillaire ou d'une particule de silice A) Représentation schématique des différentes couches B) Evolution du potentiel ϕ en fonction de la distance de la paroi du capillaire et présentation des différentes grandeurs associées à la double couche : δ : longueur de Debye ; ζ : potentiel zêta

Pour quantifier l'épaisseur de la double couche et l'importance de la variation de potentiel entre la paroi et l'électrolyte, deux paramètres sont employés : le potentiel zêta (ζ) et la longueur de Debye (δ).

Par définition, le potentiel zêta (ζ) correspond au potentiel au niveau du plan de cisaillement, c'est à dire au niveau du plan qui sépare la phase mobile qui s'écoule de celle qui reste au niveau de la paroi. Nous considérons ici que le plan de cisaillement et le plan externe de Helmholtz sont identiques (Fig.°2, B).

La longueur de Debye (δ) est donnée par l'équation n°1. δ correspond à la distance pour laquelle le potentiel zêta décroît d'un facteur e ($e= 2,718$). Elle est caractéristique de la double couche et donc liée à l'épaisseur de celle-ci. C'est pourquoi, δ est souvent appelé épaisseur de la double couche, alors que la longueur de Debye n'est, en fait, qu'un indicateur de cette épaisseur.

$$\delta = \sqrt{\frac{\epsilon_0 \epsilon_r R T}{2 F^2 I}} \quad \text{Eq. 1}$$

où ϵ_0 est la permittivité du vide ($8,85 \cdot 10^{-12} \text{ C}^2 \text{ N}^{-1} \text{ m}^{-2}$), ϵ_r la permittivité relative (78 pour l'eau à 25°C), R la constante des gaz parfaits ($8,31 \text{ J.mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$), T la température absolue (K) et F la constante de Faraday ($96.500 \text{ C.mol}^{-1}$) et I la force ionique de la solution (mol.m^{-3}).

De plus potentiel zêta et δ sont reliés par l'équation suivante :

$$\zeta = \frac{\delta \sigma}{\epsilon_0 \epsilon_r} \quad \text{Eq. 2}$$

Notons qu'il s'agit d'approximations, ces équations peuvent devenir non valides, par exemple aux faibles concentrations de contre-ions ou aux pH élevés, qui sont des cas où le modèle de la double couche et les approximations de Debye-Hückel deviennent non valides.

L'existence d'une double couche en présence d'un champ électrique (E), induit une mise en mouvement globale de la phase mobile : par le flux électroosmotique (FEO). Ce flux peut être caractérisé par la vitesse électroosmotique v_{eo} ou par une grandeur indépendante de la tension appliquée : la mobilité électroosmotique μ_{eo} (Eq 3).

$$v_{eo} = \mu_{eo} E \quad \text{Eq. 3}$$

Von Smoluchowski a proposé une équation (Eq. 3) pour définir la vitesse électroosmotique v_{eo} dans le cas d'un plan, uniformément chargé sous l'influence d'un champ électrique E parallèle à l'interface. Cette équation a été ensuite étendue aux capillaires d'EC [19]:

$$v_{eo} = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r \zeta E}{\eta} \quad \text{Eq. 4}$$

Dans cette équation on retrouve les principaux paramètres influençant le FEO : la charge de surface par l'intermédiaire du potentiel zêta, les caractéristiques physiques du milieu au travers de la viscosité η , et de la conductivité.

Ce FEO a l'avantage de présenter, dans la plupart des conditions, un profil des vitesses plat qui contraste avec le profil parabolique rencontré en CLHP (Fig.°3).



Figure 3 : Profil des écoulements A) Poiseuille B) électroosmotique

Le profile plat est bien connu pour être responsable des efficacités élevées obtenues en EC. En effet, il limite l'anisotropie d'écoulement et donc la dispersion des composés. Le maintien du profil plat des vitesses est donc important pour toutes les techniques électrocinétiques.

Knox *et al.* [20] ont montré que pour avoir un FEO avec un front plat dans un capillaire creux, le diamètre interne du capillaire doit être dix fois supérieur à l'épaisseur de la double couche électrique (δ). Pour des diamètres plus faibles, les doubles couches peuvent se superposer et le FEO perd alors ce profil plat. Dans les conditions usuelles de phase mobile, avec des capillaires de diamètre interne conventionnel (20 μm à 100 μm) le profil des vitesses en EC est bien plat.

II.2 Le flux électroosmotique en ECC

Sauf indication contraire, nous ne considérerons dans cette partie que le cas de colonnes remplies par des particules à base de silice dans des capillaires de silice fondue (Fig.°4).

Une double couche se crée au niveau de toutes les parois disposant de charges : en ECC, la double couche se formera donc aussi bien au niveau des parois du capillaire qu'à la surface des particules de phase stationnaire. La phase mobile va circuler entre les particules de phase stationnaire qui donnent naissance au flux, comme cela est schématisé à la figure 4. La phase stationnaire va donc jouer un rôle non seulement sur la perte de charge dans la colonne, mais aussi sur la génération du flux et sur le profil des vitesses.

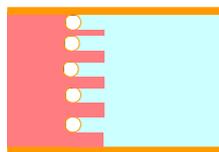


Figure 4 : Représentation simplifiée du profil plat des vitesses en ECC, dans le cas d'une colonne remplie de particules de phase stationnaire

La capacité de la phase stationnaire à générer un FEO, dépend des charges présentes à sa surface. Les phases de silice greffées par des groupements alkyle, disponibles actuellement,

contiennent généralement peu de silanols résiduels et le flux est alors principalement généré par les parois internes du capillaire.

Pour les phases de silice greffées non "endcappées" ou portant des charges, c'est la phase stationnaire, qui présente une surface très supérieure à celle des parois du capillaire, qui impose le flux. Les parois internes du capillaire et la surface de la phase stationnaire peuvent présenter des charges opposées, et générer des FEO opposés, ce qui peut nuire à l'homogénéité du flux [21].

D'autre part, avec des colonnes remplies de particules de phase stationnaire, la phase mobile peut circuler aussi bien dans des "canaux inter-particules", c'est à dire dans les interstices entre les particules, que dans les "canaux intra-particule", c'est à dire au travers des particules et de leurs pores (Fig. 5) [22-27].

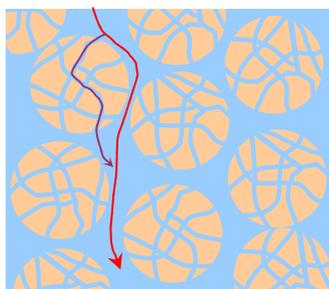


Figure 5 : schéma présentant les flux intra et inter-particules. (d'après [15])

Le diamètre moyen des canaux inter-particules a été estimé par Knox *et al.* [20]. Dans le cas de particules remplies par voie humide, les canaux inter-particules ont un diamètre environ égal au quart du diamètre des particules de phase stationnaire (d_p). Les canaux inter-particules ont donc des dimensions de l'ordre du micromètre. Les canaux intra-particule ont des dimensions liées à la taille des pores et de l'ordre quelques dizaines de nanomètres.

Ainsi, en ECC, du fait de la petite taille des canaux de circulation de la phase mobile, le recouvrement des doubles couches et la perte du profil plat des vitesses résultantes redeviennent donc envisageables (*cf* Partie I 6 B).

Le profil plat des vitesses et l'existence d'un flux intra-particule sont deux atouts majeurs de l'ECC par comparaison avec la chromatographie en phase liquide, ces deux phénomènes permettant dans des conditions idéales, de réduire de manière importante l'anisotropie d'écoulement et la résistance au transfert de masse.

Les équations et les modèles développés pour prédire l'intensité et le profil du FEO en EC se sont rapidement révélés insuffisants pour l'ECC où la phase stationnaire joue un rôle dans l'existence du flux et dans son écoulement. Des théories plus particulièrement dédiées à l'ECC ont été développées, comme les modèles du flux de premier et de second type.

II.2.A Flux électroosmotique de premier type [7]

Von Smoluchowski suggérait qu'une équation équivalente à l'équation n°4, pouvait être employée pour décrire le cas d'un système poreux ou d'une membrane, et cette équation a servi de fondement à plusieurs auteurs [2,19,20].

En particulier, le modèle développé par Overbeek [19], applicable pour tous les types de particules, poreuses ou non, de géométrie quelconque, permet d'estimer la vitesse électroosmotique moyenne $v_{eo\ moy}$ générée par la phase stationnaire (Eq. 5) et d'en déduire la mobilité électroosmotique moyenne (Eq. 6). Il comporte un facteur correctif qui tient compte des conductivités, respectivement, de la colonne remplie de phase stationnaire ($\sigma_{remplie}$) et d'un capillaire creux (σ_{creuse}).

$$v_{eo\ moy} = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r \zeta E}{\eta} \left(\frac{\sigma_{remplie}}{\sigma_{creuse}} \right)$$

Eq. 5

$$\mu_{eo\ moy} = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r \zeta}{\eta} \left(\frac{\sigma_{remplie}}{\sigma_{creuse}} \right)$$

Eq. 6

Il sous-entend, cependant, un certain nombre d'hypothèses : (i) les particules de phase stationnaire sont non conductrices, (ii) le champ électrique E reste assez faible pour éviter de polariser la phase stationnaire (relation linéaire entre la vitesse électroosmotique et le champ électrique), (iii) le diamètre des canaux, où circule la phase mobile, est plus de dix fois supérieur à la longueur de Debye pour éviter le recouvrement des doubles couches [15].

A ce flux généré par la phase stationnaire peut s'ajouter, dans certaines conditions, le flux généré par la paroi interne du capillaire. En effet, si une différence de potentiel zêta existe entre les parois internes du capillaire et la phase stationnaire, une accélération du FEO au niveau des parois du capillaire se produira, dans le cas où le potentiel de cette paroi est supérieur à celui de la phase. Dans le cas contraire il y aura un ralentissement du FEO au niveau de la paroi interne du capillaire (Fig. 6).

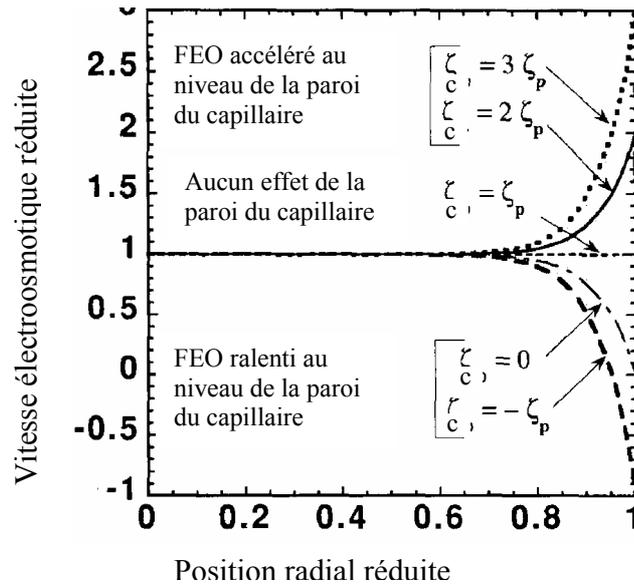


Figure 6 : Distribution théorique du FEO en fonction de la position radiale, cas d'une colonne capillaire remplie de particules de phase stationnaire, ζ_c potentiel zêta des parois du capillaire, ζ_p potentiel zêta des particules de phase stationnaire, Vitesse réduite par référence à la vitesse électroosmotique due uniquement à la phase stationnaire. capillaire 50 μm d. i., $\epsilon_r=0,4$, diamètre des particules : 5 μm . (d'après [7])

A peu près en même temps, mais avec des paramètres géométriques et non plus "électriques", Dearie *et al.* [28] reportent le même type d'équation avec un facteur correctif τ (Eq. 7).

$$\mu_{eo} = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r \zeta \tau}{\eta} \quad \text{Eq. 7}$$

Les auteurs nomment τ , la porosité. En réalité ce facteur tient compte à la fois de la porosité et de la tortuosité de la colonne, il est adimensionnel et compris entre 0,4-0,7. Une relation directe entre τ et le rapport des conductivités peut se déduire des équations 6 et 7 proposées par les deux groupes (Eq. 8).

$$\tau = \left(\frac{\sigma_{remplie}}{\sigma_{creuse}} \right) \quad \text{Eq. 8}$$

II.2.B Flux électroosmotique de second type

Cependant pour expliquer les flux anormalement élevés qui avaient pu être observés dans certaines conditions, un autre modèle de FEO, dit flux de second type a été développé en ECC par Dukhin [29-32]. Le FEO de second type se caractérise par une vitesse électroosmotique qui augmente de façon non linéaire, lors d'une augmentation de l'intensité du champ électrique E . Ce modèle s'applique dans le cas d'un champ électrique E intense et lorsque la conductivité de la phase

stationnaire est supérieure à celle de la phase mobile. Cette seconde condition est rencontrée, par exemple, avec des phases stationnaires échangeuses d'ions en présence de phases mobiles de faible molarité. Pour décrire ce modèle nous considérerons le cas d'une phase stationnaire chargée négativement en surface.

Si le champ électrique est assez intense pour polariser la double couche : les composantes "normale" E_n et "tangentielle" E_t du champ électrique à la surface des particules chargées (Fig. 7 a) engendrent une accumulation de charges sur une partie de la surface de la particule comme cela est indiqué sur la figure 7 b.

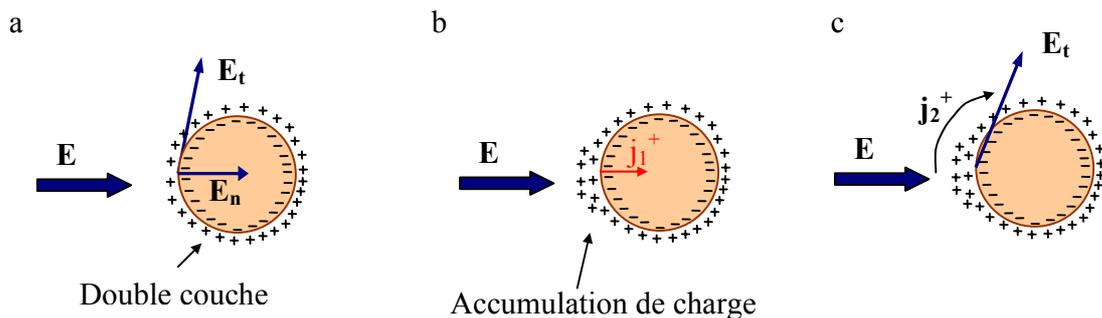


Figure 7 : Schémas visualisant les phénomènes d'accumulation de charges et flux des espèces chargées intervenant dans le flux de second type a) Composantes tangentielle et normale du champ électrique b) accumulation de charge et flux j_1^+ c) flux tangentiel j_2^+ de contre-ions sous l'action de la composante tangentielle E_t du champ électrique E (adaptée de [7]).

Le schéma habituel de double couche est modifié par le champ normal E_n : les cations, entraînés par leur mobilité, se rapprochent de la particule, tandis que les anions s'en éloignent (Fig. 7 b, et 12). Selon Dukhin [29] Baran *et al.* [30], trois zones se distinguent alors, entre la surface de la particule de phase stationnaire et l'électrolyte (zone IV) (Fig. 8) : une double couche (I) similaire à celle déjà présentée et directement au contact de la phase stationnaire. Au delà se trouve une zone d'accumulation de cations sous l'effet du champ électrique (II), puis une zone de diffusion des cations (III) qui assure la transition entre la solution (IV) et la couche d'accumulation des cations (II). Sur la figure 8 sont également représentés les évolutions des concentrations des cations (C^+) et des anions (C^-) en fonction de la distance de la surface de la phase stationnaire.

Il semble probable que la double couche (I) soit modifiée par ce phénomène, ne serait-ce que du fait des modifications de concentration des différentes espèces.

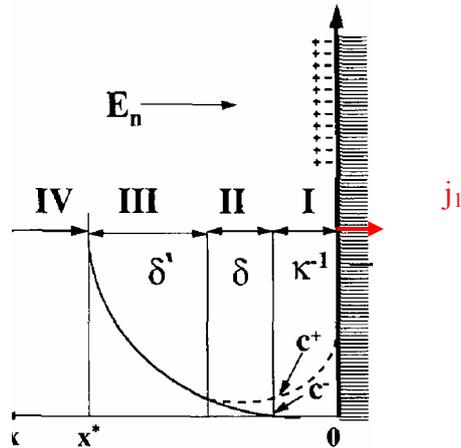


Figure 8 : Schéma de répartition des espèces chargées à proximité de la paroi de la phase stationnaire sous l'influence de E_n . Cas d'une perméation sélective des cations, selon un flux j_1 , au travers la surface échangeuse d'ion de la phase stationnaire. D'après [29]

Selon Mishchuk *et al.* [32], deux sortes de flux d'espèces chargées sont envisagés dans ce type répartition :

Dans le premier cas le flux j_1 , visualisé en rouge sur les figures 7 b et 8, est créé par le transport des cations, par diffusion ou sous l'action du champ électrique dans les particules de phase stationnaire. Dans le second cas, un flux tangentiel j_2^+ de cations excédentaires se crée (Fig. 7 c) sous l'influence du champ électrique tangentiel.

Ces équipes prouvent mathématiquement l'existence de l'accumulation de charges, symbolisée par la différence de concentrations en cations et en anions au niveau des zones I et II (Fig. n°8). Le premier flux j_1 entraîne l'accumulation de charges, tandis que le second flux j_2 engendre des "tourbillons" électroosmotiques [31,32] dans la phase mobile (Fig. 9). Ces tourbillons ont pour conséquence d'augmenter le FEO inter-particule et de générer un FEO global plus intense.

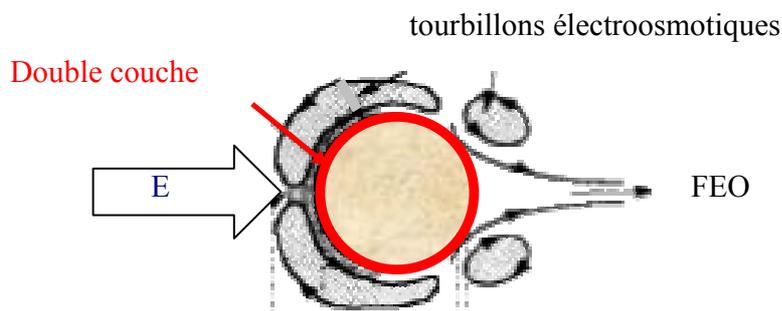


Figure 9 : Schéma illustrant les tourbillons électroosmotiques engendrés autour d'une particule chargée, dans le cas d'un FEO de type 2. Dans ce schéma, la zone d'accumulation est très agrandie ; dans la réalité elle reste très inférieure au diamètre de la particule. D'après [7]

Dans le cas d'un FEO de type 2, si l'effet des parois du capillaire est négligeable, la vitesse électro-osmotique moyenne [Eq. 9] est liée au diamètre des particules de phase stationnaire (d_p) et s'écrit :

$$V_{eo \text{ moy}} = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r E}{\eta} d_p E \left(\frac{\sigma_{remplie}}{\sigma_{creux}} \right) \quad \text{Eq. 9}$$

Le diamètre des particules de phase stationnaire et le rapport des conductivités ont une influence directe sur le FEO de type 2. Comme l'indique la modélisation visualisée figure 10, le FEO de second type ne se développe que pour des particules de diamètre supérieur à 2 μm . La vitesse du FEO augmente alors de façon non linéaire, lors d'une augmentation de l'intensité du champ électrique E.

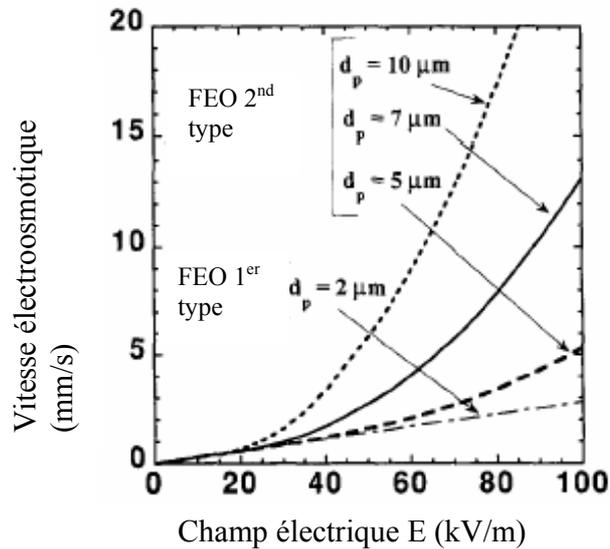


Figure 10 : Evolution de la vitesse moyenne du FEO en fonction du champ électrique et du diamètre des particules. Conditions : $\sigma_{remplie}/\sigma_{creux}=5 \cdot 10^2$; $\delta = 500 \text{ \AA}$; $\zeta_{paroi \text{ capillaire}} = \zeta_{particules} = 100 \text{ mV}$; $\epsilon=80$, $\epsilon_0=8,85 \cdot 10^{-12} \text{ C}^2 \text{ V}^{-1} \text{ m}^{-1}$; $\eta=10^{-3} \text{ kg s}^{-1} \text{ m}^{-1}$, tirée de [7]

D'autre part le FEO de type 2 est d'autant plus intense que la conductivité de la phase stationnaire ($\sigma_{particule}$) est élevée par rapport à celle de la phase mobile (Fig.°11). La densité de greffage, la nature des greffons, l'accessibilité aux silanols résiduels déterminent la densité de charge de surface et donc le FEO [33].

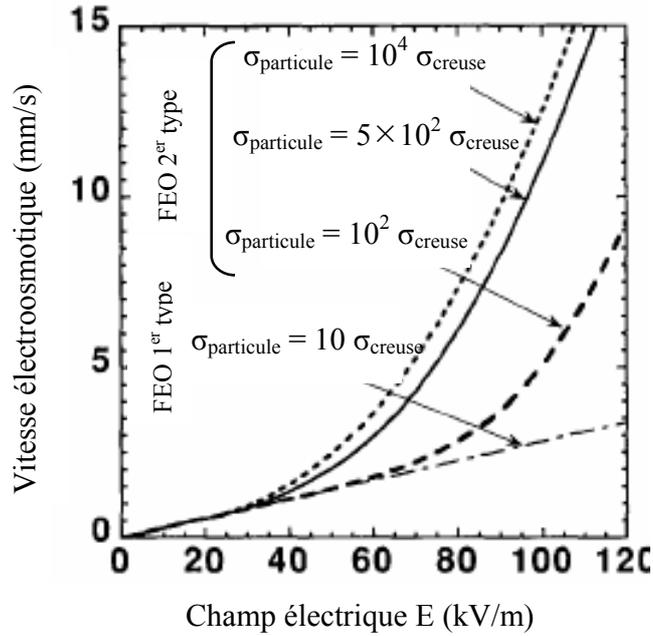


Figure 11 : Evolution de la vitesse moyenne du FEO en fonction du champ électrique, avec comme paramètre le rapport des conductivités $\sigma_{particule}/\sigma_{creux}$. Conditions : $d_p = 5 \mu m$; $\delta = 500 \text{ \AA}$; $\zeta_{paroi\ capillaire} = \zeta_{particules} = 100 \text{ mV}$; $\epsilon = 80$, $\epsilon_0 = 8,85 \cdot 10^{-12} \text{ C}^2 \text{ V}^{-1} \text{ m}^{-1}$; $\eta = 10^{-3} \text{ kg s}^{-1} \text{ m}^{-1}$, d'après [7]

En conclusion, de faibles molarités de l'électrolyte, des particules de diamètre élevé favorisent ce FEO de second type.

Une autre possibilité, concernant la répartition des espèces chargées, a été envisagée par Tallarek *et al.* [34] : le mouvement électrophorétique des espèces chargées dans la phase stationnaire est plus rapide que la diffusion de ces espèces de la solution vers la surface de la particule : dans ce cas, il ne s'agirait plus d'une accumulation mais d'une déplétion en ions (Fig.°12). Il s'agit d'un phénomène hors équilibre qui accentuerait le mélange des analytes.

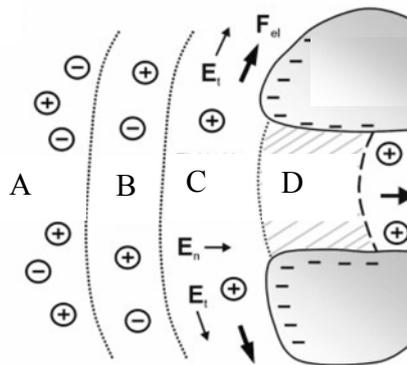


Figure 12 : Déplétion d'ions au voisinage et dans une particule de phase stationnaire chargée, macro-poreuse et permselective A :électrolyte, B :couche de diffusion-convection, C :région chargée par les contre-ions mobiles, D : région chargée par les co-ions fixes, (d'après [34]).

Les avis sont partagés quant à l'intensité du FEO de type 2 et à sa part dans le FEO global. Pour Rathore [15], ce flux de second type reste tout à fait marginal même dans le cas de phases stationnaires fortement chargées comme les phase stationnaires échangeuses d'ions.

Pour Nischang et Tallarek [35], les flux du premier et du second type coexisteraient, mais le flux de premier type resterait toutefois majoritaire dans la plupart des cas [35]. Les expériences de Tallarek ont démontré le bien-fondé du FEO de second type et des hypothèses qui s'y raccordent. Son équipe a en particulier visualisé la répartition assez complexe de composés neutres [36, 21] et chargés [34] dans des particules de phase stationnaire en présence de champ électrique. Mais ces analyses réalisées sur des particules « isolées » surestiment sans doute le phénomène [34], de plus pour visualiser le phénomène il est nécessaire de se placer dans des conditions extrêmes (molarité, taille des particules et des pores, etc...).

Le FEO de type 2 est un mécanisme dynamique complexe, qui associe attraction, répulsion et diffusion des espèces chargées au niveau de la phase stationnaire et qui se développe en présence d'un passage sélectif des ions au travers des particules de phase stationnaire. Le FEO de second type accélère la phase mobile, ce qui peut être très avantageux pour effectuer des analyses rapides et pour limiter la diffusion longitudinale et/ou travailler sur de plus longues colonnes.

Ainsi le FEO a un effet important sur l'efficacité des analyses. D'autre part, le flux intraparticules améliore le transfert de masse en éliminant la contribution à la résistance au transfert de masse en phase stagnante [37]. Par ailleurs, le FEO de second type génère un écoulement turbulent (vortex électroosmotique) qui diminue notablement l'anisotropie d'écoulement. Ces deux processus liés au FEO de second type devraient donc améliorer les efficacités rencontrées. Les modèles de Van Deemter restent probablement pertinents, mais nécessitent peut-être quelques corrections pour prendre en compte des phénomènes purement électrochromatographiques.

III EFFICACITE ET PHENOMENES DE DISPERSION [38]

L'efficacité des analyses est liée à la finesse des zones contenant les analytes, cette efficacité peut être quantifiée par la hauteur de plateau théorique H. L'élargissement de ces zones, au cours de l'analyse, est liée à des phénomènes de dispersion, qui nuisent à la fois à l'efficacité et à la résolution des analyses. Pour les pics d'élution, assimilés à des courbes de Gauss, les phénomènes de dispersion sont caractérisés par un écart-type (σ_{obs}). Celui-ci prend en compte les phénomènes dispersifs liés à la colonne $\sigma_{colonne}$ et à des phénomènes dispersifs externes à celle-ci ($\sigma_{externe}$).

$$\sigma_{obs}^2 = \sigma_{externe}^2 + \sigma_{colonne}^2 \quad \text{Eq. 10}$$

En ECC, les phénomènes dispersifs "externes" à la colonne, peuvent être liés à l'injection, la détection, l'adsorption d'espèces, de l'électrodispersion, l'échauffement par effet Joule, ou des discontinuités segment rempli/segment creux, qui sont caractérisés respectivement par les écarts-type suivants : $\sigma_{\text{injection}}$, $\sigma_{\text{détection}}$, $\sigma_{\text{electrodispersion}}$, $\sigma_{\text{adsorption}}$, $\sigma_{\text{effet Joule}}$, $\sigma_{\text{discontinuité}}$.

$$\sigma_{\text{externe}}^2 = \sigma_{\text{injection}}^2 + \sigma_{\text{détection}}^2 + \sigma_{\text{electrodispersion}}^2 + \sigma_{\text{adsorption}}^2 + \sigma_{\text{effet Joule}}^2 + \sigma_{\text{discontinuité}}^2 \quad \text{Eq. 11}$$

Dispersion liée à l'injection

Une coupure nette du capillaire et le volume injecté faible par rapport au volume mort de la colonne permettent de réduire la dispersion liée à l'injection. D'autre part le temps d'injection et donc le volume injecté doit être optimisé pour chaque type de colonne [39],

Dispersion liée à la détection

Pour une détection réalisée au travers du capillaire, dans une portion creuse de la colonne, la dispersion par détection n'est liée qu'à l'acquisition du signal (temps de réponse et fréquence d'acquisition). Pour un détecteur UV-visible correctement réglé cette dispersion est négligeable.

Dispersion liée à l'électrodispersion

Elle est provoquée par des différences de composition entre l'échantillon et la phase mobile, différences qui peuvent entraîner une grande variation de la vitesse des composés.

Dispersion par adsorption

Un choix de phase mobile adéquat permet de limiter l'adsorption des constituants, par exemple par répulsion électrostatique des composés basiques, à pH acide avec une phase cationique, ou encore par réduction du nombre de silanols résiduels chargés à pH acide.

Dispersion liée à l'effet Joule

Si la puissance dégagée par effet Joule et l'échauffement occasionné, ne sont pas convenablement dissipés, un gradient radial de température est engendré et modifie le profil des vitesses. Travailler avec un capillaire bien thermostaté, à l'aide d'un liquide caloporteur, par exemple, et/ou réaliser des analyses à une tension pas trop intense permettent d'éviter de trop fortes puissances et donc ces échauffements et la dispersion qu'ils engendrent.

Dispersion par discontinuité

Elle concerne particulièrement les colonnes d'ECC comportant des frittés, une portion remplie et une portion creuse. Elle est engendrée par des différences de conductivités, de potentiel zêta ou de FEO entre ces différentes zones. Utiliser pour fabriquer les frittés la même phase stationnaire que celle présente dans la colonne, permet de limiter au maximum les discontinuité fritté/phase stationnaire.

Des coupures du capillaires nettes, des volumes injectés faibles, une tension suffisamment faible pour limiter l'effet Joule ou une bonne dissipation de la chaleur par un système de refroidissement, des frittés fabriqués avec la même phase stationnaire que celle employée pour la séparation et une phase mobile adaptée permettent généralement de rendre les phénomènes dispersifs extra colonne négligeables. Dans les conditions optimales d'utilisation, la dispersion se limite donc à la dispersion intra-colonne.

Il est possible d'estimer la dispersion au sein de la colonne, en se basant sur l'équation de Van Deemter (Eq. 12) qui relie la hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT, notée H) à la vitesse linéaire d'écoulement de la phase mobile dans la colonne, u [25].

$$H = \frac{B}{u} + A + C_m u + C_s u \quad \text{Eq. 12}$$

Avec les coefficients associés, respectivement, à :

- A l'anisotropie d'écoulement
- B la diffusion longitudinale
- C_m la résistance au transfert de masse dans la phase mobile.
- C_s la résistance au transfert de masse dans la phase stationnaire.

Une réduction des termes A et C est généralement observée en ECC par rapport à la CLHP. Du fait du profil plat des vitesses lié au FEO, l'anisotropie d'écoulement est souvent faible et entraîne une réduction importante du terme A . Si nous comparons la part de l'anisotropie d'écoulement dans les courbes théoriques en CLHP et en ECC, nous observons bien une réduction de la hauteur de plateau théorique, du fait de l'homogénéité du flux (Fig. 13).

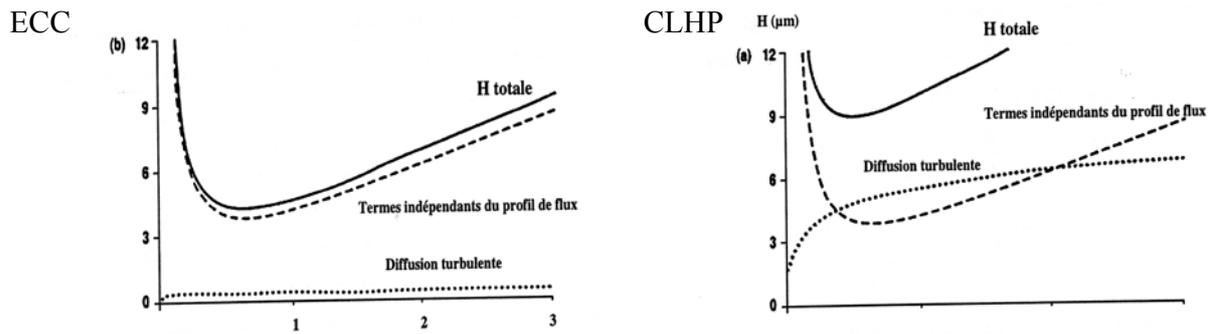


Figure 13 : Effet du profil plat des vitesses sur l'anisotropie d'écoulement et sur le profil théorique des courbes de Van Deemter en CLHP et en ECC D'après [40]

D'autre part le terme C, particulièrement faible en ECC [41] peut être relié à une résistance au transfert de masse extrêmement faible. En effet, l'existence d'un flux intra particule assure un très bon "brassage" des analytes au sein des particules de phase stationnaire, tandis qu'en CLHP la convection des analytes dans les pores se fait quasiment exclusivement par diffusion. Ne subsisterait plus alors que le phénomène de diffusion dans la phase stationnaire. Si nous considérons les courbes expérimentales présentées par Szucs *et al.* [42], la réduction de la hauteur équivalente à un plateau théorique obtenue en ECC, comparativement à la CLHP, est effectivement due majoritairement à une diminution du terme C (Fig.°14).

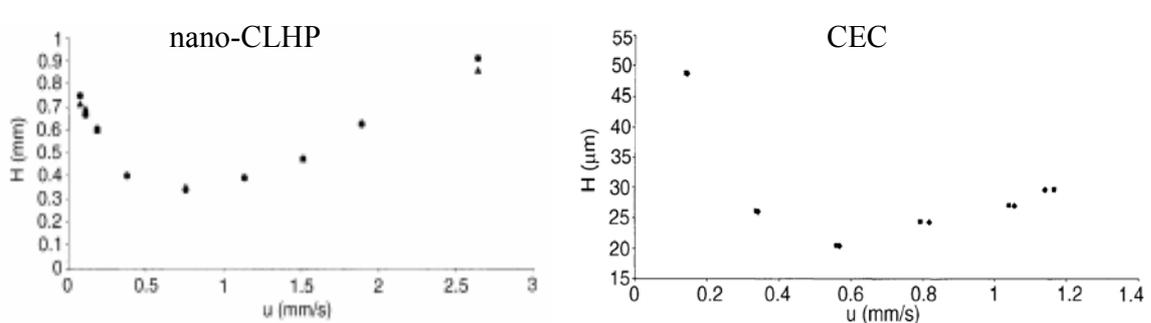


Figure 14 : Hauteur équivalente à un plateau théorique en fonction de la vitesse de la phase mobile Colonne : monolithique de méthyl méthacrylate, nano-CLHP : 15 cm, eau, ECC : 28x37 cm, phosphate 40 mM/ACN 70/30 (v/v), DMSO, d'après [42]

Ainsi, en ECC, la dispersion est principalement liée au terme B de la diffusion longitudinale (eq. 13).

$$B = 2 \gamma_c D \tag{Eq. 13}$$

ou γ_c est un facteur d'obstruction de la colonne et D le coefficient de diffusion du soluté dans la phase mobile [43].

Toutefois nous attirons l'attention sur le fait que l'équation de Van Deemter, couramment utilisée en CLHP, est employée par défaut en ECC. Ainsi comme le soulignent Poppe *et al.* [41] dans le cas d'un FEO identique inter et intra particules, il n'existerait plus de diffusion et donc de résistance au transfert de masse, à proprement parler. De plus, il est délicat d'appréhender l'influence du FEO de second type et des phénomènes de déplétion d'ions proposés par les équipes de Mishchuk [32] et Tallarek [34] sur l'efficacité. On peut cependant considérer que les "tourbillons électrocinétiques" peuvent améliorer le brassage de la phase mobile et donc diminuer la dispersion des espèces. Mais à l'inverse la répulsion des espèces chargées de même signe que la phase stationnaire et la déplétion en ions dans les pores pourraient empêcher une répartition homogène des analytes en solution. Ces pertes d'efficacité ne s'observeraient que pour des espèces chargées, de charges opposées à celles de la phase stationnaire.

IV ELECTROMIGRATION

IV.1 Notion de mobilité électrophorétique

L' électromigration est la mise en mouvement des solutés chargés sous l'action directe d'un champ électrique (E), ce qui est traduit par une relation entre E et la vitesse électrophorétique du composé étudié $v_{ep\ i}$:

$$v_{ep\ i} = \mu_{ep\ i} E \quad \text{Eq. 14}$$

Dans l'équation n°14, la mobilité électrophorétique $\mu_{ep\ i}$ est propre au composé i, dans un milieu donné, elle tient compte en particulier de la charge, du rayon hydrodynamique du composé i, mais aussi de la force ionique et des propriétés physico-chimiques de la phase mobile. Par exemple le pourcentage de solvant organique jouera, entre autres, sur la viscosité de la phase mobile, sur la solvation des espèces en solution, leur caractère acido-basique et la dissociation des paires d'ions. Cette mobilité est souvent estimée, à dilution infinie en tampon par la relation :

$$\mu_{ep\ i}^{\infty} = \frac{q_i}{6\pi\eta r_i} \quad \text{Eq. 15}$$

où : q_i est la charge de l'analyte, r_i son rayon hydrodynamique et η la viscosité de la solution. Le rayon hydrodynamique est lié aux propriétés de solvation de la phase mobile.

La mobilité électrophorétique, dans une phase mobile de force ionique I, peut être estimée par :

$$\mu_{ep\ i} = \mu_{ep\ i}^{\infty} \left(-\omega \sqrt{|z_i| I} \right) \quad \text{Eq. 16}$$

avec z_i charge de l'électrolyte et ω le coefficient numérique ($\omega=0,5$ pour $z_i=1$ et $\omega=0,77$ pour $z_i \geq 2$).

IV.2 Phénomène d'électromigration en ECC

En principe, l'introduction d'une phase stationnaire ne devrait pas influencer la mobilité électrophorétique ($\mu_{ep,i}$) des composés analysés. La majorité des auteurs considèrent d'ailleurs $\mu_{ep,i}$ comme identique dans un capillaire creux ou rempli, toutes autres conditions étant égales par ailleurs [12, 13, 44, 45]. L'estimation de la mobilité électrophorétique d'un composé chargé est généralement réalisée en ECZ avec le même électrolyte et dans les mêmes conditions que celles retenues en ECC. Il faut cependant noter que les lignes de champ se trouvent modifiées par la présence d'une phase stationnaire, quelle que soit sa charge et sa structure et qu'il est donc nécessaire d'estimer le champ électrique réellement présent dans la colonne remplie.

V RETENTION CHROMATOGRAPHIQUE EN ECC

On entend par rétention chromatographique en ECC, la rétention des composés due à une interaction réversible entre l'analyte et la phase stationnaire [46]. Ce phénomène est à la base de l'ECC, mais sa prédiction est souvent rendue difficile car elle présuppose de dissocier les phénomènes d'électromigration et les phénomènes chromatographiques. Différents groupes de recherche (Horváth [9, 15, 47], Liu [48], Myer [13]) ont essayé de définir des paramètres pertinents pour estimer la rétention des composés liée uniquement à (aux) phénomène(s) chromatographique(s).

Plusieurs auteurs ont émis l'hypothèse que le FEO ou le champ électrique pourrait modifier la rétention chromatographique des espèces, notamment pour les espèces chargées [17, 46, 49, 50]. Ainsi, en ce qui concerne les phases porteuses de charges, la répartition de ces charges à la surface des particules et les caractéristiques de la double couche peuvent influencer la rétention des molécules chargées [33]. Xiang et Horváth [17] supposent même que les analytes chargés pourraient migrer dans la phase stationnaire. Ainsi l'ECC peut présenter une rétention chromatographique originale et différente de celle observée avec la même phase stationnaire en chromatographie en phase liquide. Une estimation des facteurs de rétention réalisée expérimentalement en CLHP sur la même phase stationnaire et dans des conditions expérimentales identiques ne donnera pas forcément une idée juste des processus de rétention chromatographique en ECC. L'obtention d'un facteur, qui quantifie la rétention en ECC, est donc primordiale.

Dans le cas des composés neutres, il a été observé que la rétention obtenue en ECC était identique à celle observée en CLHP ou en nano-CLHP, sur des phases stationnaires de type silice greffée octadécyle [51]. En revanche estimer la rétention pour les composés chargés en ECC reste un

défi. Chaque espèce chargée possède sa propre mobilité électrophorétique, la connaissance du FEO ne suffit donc pas pour caractériser la vitesse de l'espèce chargée dans la phase mobile.

V.1 Facteur de rétention en chromatographie en phase liquide

Pour quantifier la rétention chromatographique en ECC, un facteur de rétention, ayant une signification similaire à celui employé en CLHP, est recherché. En CLHP la rétention chromatographique est caractérisée par le facteur de rétention que nous notons k_{chrom} . Ce facteur, qui est le ratio des quantités de soluté i dans les phases stationnaire et mobile, peut être relié (eq. 17) aux vitesses de la phase mobile (v_o) et d'élution de l'analyte i (v_i) et il peut être facilement calculé (eq. 18) à partir du temps mort t_0 et du temps d'élution du composé i t_i .

$$v_i = \frac{v_o}{1 + k_{chrom}} \quad \text{Eq. 17}$$

$$k_{chrom} = \frac{t_i - t_0}{t_0} \quad \text{Eq. 18}$$

Ce facteur de rétention, utile pour caractériser la position d'un pic et qui recouvre une réalité thermodynamique en CLHP ne peut être exploité en ECC pour la compréhension du mécanisme de rétention.

V.2 Estimation de la rétention chromatographique en ECC

Divers modèles mathématiques ont été proposés pour tenter de définir un paramètre en ECC, qui puisse être un bon indicateur de la rétention chromatographique.

Facteur de rétention apparent : k_{app}

La méthode la plus simple consiste à garder le facteur de rétention, appelé facteur de rétention apparent (k_{app}), tel qu'il est calculé en chromatographie en phase liquide (eq. 19), en remplaçant le temps mort par le temps du marqueur de FEO.

$$k_{app} = \frac{t_i - t_{eo}}{t_{eo}} \quad \text{Eq. 19}$$

Ce facteur qui permet de localiser un pic ou de suivre l'évolution de la position des pics d'analytes en fonction de certains paramètres expérimentaux, est parfaitement adapté pour les composés neutres [44]. En revanche, il apporte peu d'informations pour les composés chargés qui possèdent une vitesse électrophorétique propre. Pour des composés ayant une vitesse électrophorétique de même direction que le FEO, il peut même être négatif (cas de constituants sortant avant le marqueur de FEO) [52].

Modèle d'estimation d'un "vrai" facteur de rétention

En ECC les séparations relèvent de la conjugaison de trois phénomènes :

- ✚ la rétention chromatographique
- ✚ la migration électrophorétique
- ✚ le débit de la phase mobile (FEO au sein de la phase stationnaire)

La simple estimation de FEO, ne permet pas d'accéder à la vitesse du composé chargé dans la phase mobile, en ECC, aussi il est difficile de dissocier les phénomènes séparatifs relevant de la rétention chromatographique et de l'électromigration. La plupart des auteurs sont actuellement d'accord sur la définition d'un facteur de rétention $k_{chrom ECC}$, à partir de la vitesse v_i observée pour le composé i (Eq. 20) [44, 45, 52-54]. Cette équation est directement inspirée de celle utilisée en CLHP (Eq. 18), la vitesse de la phase mobile est simplement remplacée par la vitesse réelle de l'analyte en solution, c'est à dire la somme de la vitesse électroosmotique v_{eo} et de la vitesse électrophorétique $v_{ep i}$ de l'analyte i .

$$v_i = \frac{v_{eo} + v_{ep i}}{1 + k_{chrom ECC}} \quad \text{Eq. 20}$$

Notons que dans le cas d'analyte neutre nous retrouvons l'équation de CLHP avec $k_{chrom ECC} = k_{app}$.

Rathore et Horváth [47] introduisent le facteur de vitesse κ_e (Eq. 21) qui tient compte de la mobilité électrophorétique (μ_{ep}) et de la mobilité électro-osmotique dans la portion remplie du capillaire ($\mu_{eo rempli}$).

$$\kappa_e = \frac{\mu_{ep}}{\mu_{eo rempli}} \quad \text{Eq. 21}$$

Il est à noter que Rathore et Horváth utilisent la mobilité électroosmotique au sein du capillaire rempli, c'est-à-dire celle à laquelle sont réellement soumis les analytes. Cette mobilité est différente de celle qui est calculée pour un capillaire creux, où la trajectoire des analytes, ainsi que les lignes de champs sont connues. Dans le cas d'un capillaire rempli il est nécessaire d'estimer le trajet effectivement parcouru par les analytes ainsi que le champ électrique.

Après correction par le facteur de vitesse, Rathore et Horváth [45] obtiennent, par un formalisme pesant, un facteur de rétention électrochromatographique (k_c).

$$k_c = k_{chrom ECC} + k_{chrom ECC} \kappa_e + \kappa_e \quad \text{Eq. 22}$$

Le principal intérêt de cette équation peu utilisée, par ailleurs, est de traduire l'influence mutuelle des phénomènes électrophorétiques et chromatographiques à l'aide du produit $k_{\text{chrom ECC}} \times \kappa_e$.

A partir de la même base théorique (Eq 20), Dittmann *et al.* [55], ont proposé ensuite une estimation de la rétention apparente en ECC, à partir de la rétention mesurée en CLHP (k_{chrom}) et de la vitesse électrophorétique des composés mesurées en ECZ (Eq. 23).

$$k_{\text{ECC}} = \left(1 - \frac{v_{epi}}{v_{eo} + v_{epi}} \right) k_{\text{chrom}} - \frac{v_{epi}}{v_{eo} + v_{epi}} \quad \text{Eq. 23}$$

En partant de la rétention apparente en ECC et de la mobilité électrophorétique calculée en CZE, Rathore *et al.* se sont appuyés sur les résultats de Dittman *et al.* pour déduire la rétention chromatographique en ECC, notée $k_{\text{chrom ECC}}$ [46]. Ils introduisent alors le facteur de vitesse κ_e , défini précédemment, dans l'équation 20, pour obtenir :

$$v_{\text{obs}} = \frac{v_{eo} (1 + \kappa_e)}{1 + k_{\text{chrom ECC}}} \quad \text{Eq. 24}$$

Dans ce cas $k_{\text{chrom ECC}}$ peut être calculé, à l'aide de κ_e par l'équation 25

$$k_{\text{chrom ECC}} = \frac{t_i (1 + \kappa_e) - t_{eo}}{t_{eo}} \quad \text{Eq. 25}$$

Notons que $k_{\text{chrom ECC}}$ remplace ici k_{chrom} bien qu'il s'agisse mathématiquement du même paramètre. Mais k_{chrom} est le paramètre mesuré en CLHP, tandis que $k_{\text{chrom ECC}}$ est la rétention estimée en ECC. $k_{\text{chrom ECC}}$ est toujours positif, ce qui permet de le considérer effectivement comme caractéristique de la rétention chromatographique. Ce mode de calcul est actuellement le plus rigoureux d'un point de vue théorique, pour estimer la rétention purement chromatographique en ECC.

Cependant il nécessite l'estimation de κ_e et donc la mesure des mobilités électrophorétiques des composés en ECZ ainsi que l'estimation de la mobilité électroosmotique dans la portion remplie du capillaire ($\mu_{eo \text{ rempli}}$), qui est particulièrement délicate. Rathore *et al.* [9, 15, 56] utilisent les mesures de courants générés lors d'analyses effectuées dans un capillaire creux et dans la colonne d'ECC pour évaluer la distance effectivement parcourue par le marqueur de flux au travers de la phase stationnaire uniquement. Une fois cette distance estimée une mobilité électroosmotique dans la phase stationnaire $\mu_{eo \text{ rempli}}$ peut être estimée.

Pour estimer la fiabilité des équations proposées pour l'estimation des facteurs de rétention chromatographiques plusieurs auteurs ont comparé ces facteurs, à ceux déterminés expérimentalement en CLHP dans les mêmes conditions d'analyse [55, 46].

Dittmann *et al.* [55] ont validé leur modèle en vérifiant que les k_{ECC} mesurés et ceux calculés à partir de k_{chrom} étaient identiques, pour des mélanges de composés basiques pharmaceutiques, tels que la procaine ou le timolole, sur des phases stationnaires octyl et octadécyle, avec un tampon phosphate pH 2.5, 50mM en présence d'hexylamine 0,2% et à 80% d'ACN. Cependant, en poursuivant cette dernière étude, Rathore *et al.* [46] ont noté, pour certaines phases stationnaires, des différences significatives entre leur estimation de la rétention en ECC (Eq. 25) et celle obtenue par CLHP pour quelques composés basiques. Les auteurs expliquent cette différence, par la modification de l'organisation structurale de la phase stationnaire et du partage en présence d'un champ électrique (*cf* I.6).

Ainsi, le processus chromatographique peut effectivement être influencé par la mise sous tension. La rétention chromatographique en ECC ne peut donc être estimée que lors d'analyses effectuées en présence d'un champ électrique. Parmi les différents modèles étudiés, le $k_{chrom\ ECC}$ proposé par Rathore et Horváth prend en compte non seulement la vitesse électrophorétique des espèces, mais aussi le FEO réellement engendré dans la colonne capillaire. De nos jours, il semble être le modèle le plus à même de caractériser la rétention purement chromatographique en ECC, même si il reste toujours difficile d'appréhender l'aspect thermodynamique de la rétention en ECC [47].

VI INFLUENCE DES PARAMETRES OPERATOIRES SUR LES SEPARATIONS EN ECC

Les paramètres opératoires, tels que la tension d'analyse ou la composition de la phase mobile, la température ont une influence bien connue en EC. Cependant, en ECC la combinaison des phénomènes électrocinétique et chromatographique entraîne souvent une influence originale et surprenante de certains paramètres opératoires. Nous avons essayé, dans ce qui suit, de dégager les paramètres qui influencent de manière originale et spécifique les séparations en ECC.

VI.1 Tension

Il a longtemps été admis qu'une variation de la tension n'entraînait qu'une accélération ou un ralentissement des analyses, sans avoir aucun effet sur la sélectivité en ECC, [57]. Mais comme nous l'avons vu précédemment divers auteurs ont émis l'hypothèse que la tension pouvait entraîner une modification de la rétention des espèces.

Dans certains cas, une rétention en ECC supérieure à celle obtenue en CLHP a été reportée [46, 50], Rathore *et al.* [46] incriminent une modification de la configuration spatiale des greffons de la phase stationnaire et de l'organisation des solutés. Toutefois, ces observations semblent dépendre de la phase stationnaire employée. Deux silices greffées octadécyles ne donnent pas forcément les mêmes

tendances. Ainsi l'analyse d'un mélange de composés pharmaceutiques basiques réalisée avec une Spherisorb ODS 1 et une phase mobile constituée d'un tampon phosphate 25mM, pH=2,5 et d'ACN ; 20 /80, montre des rétentions très proches entre la CLHP et l'ECC tandis que sur une CEC Hypersil-C₁₈ la rétention est supérieure en ECC.

Le phénomène inverse a été observé sur une phase monolithique mixte, comportant un ammonium quaternaire à la base d'une chaîne C₁₈, avec laquelle des facteurs de rétention plus faibles en ECC qu'en CLHP sont obtenus lors de l'analyse d'acides aminés dansylés avec une phase mobile constituée ACN/ acétate d'ammonium, pH=4,5 (30 /70 ; v/v) [58]. Des phénomènes de répulsion électrostatiques plus importants dans le cas de l'ECC ont été proposés pour expliquer cette diminution.

Kitagawa *et al.* [50] confirme l'influence du champ électrique sur la rétention en ECC, par une étude en pECC : des variations significatives de rétention sont observées pour des composés neutres (caféine, benzoate de méthyl et diéthylphthalate), en conditions basiques, en faisant varier la tension appliquée sur une colonne capillaire remplie par une phase stationnaire mixte (comportant des ammoniums quaternaires et des chaînes alkyles C₁₈) (Fig. 15).

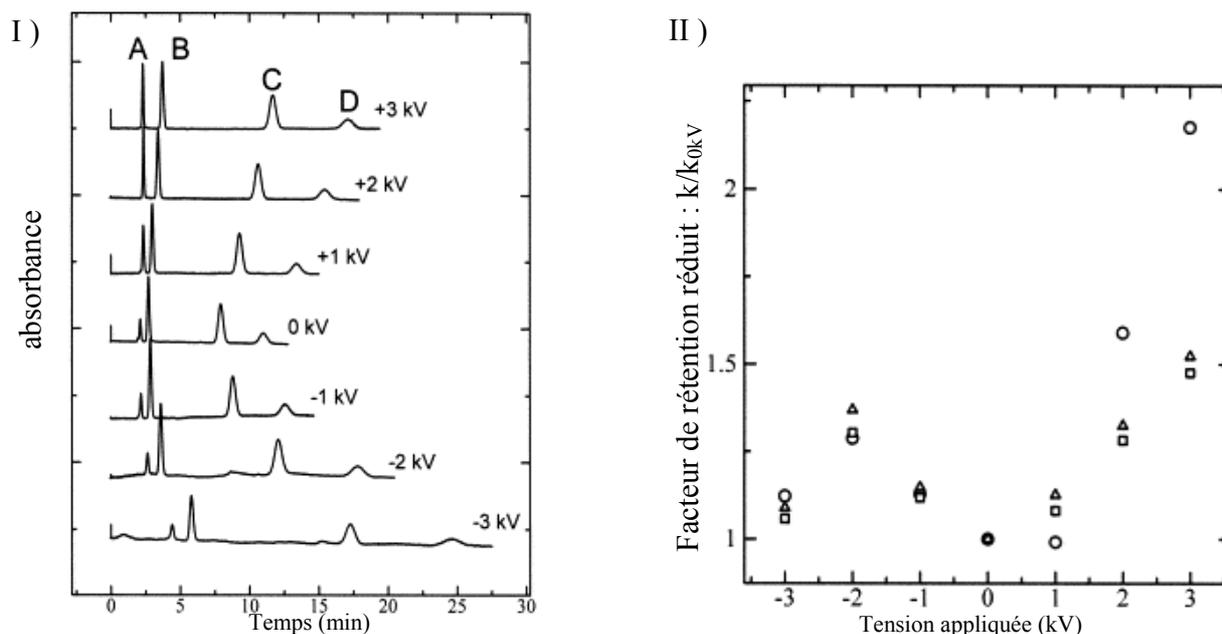


Figure 15 : Influence de la tension sur la rétention de composés neutres en pECC I) Electrochromatogrammes II) Facteurs de rétention réduits, en prenant comme référence les analyses effectuées sans tension. uracile (A), caféine (B, ○), benzoate de méthyl (C, □), diéthylphthalate (D, △), sur une phase mixte échangeuse d'anions et à polarité de phases inversée, capillaire : 100 μ m d.i., longueur utile 12cm, longueur totale 20,4 cm,, phase mobile : Na₂HPO₄ 20 mM/ méthanol, 40/60, pression 60kgf/cm², d'après [50].

Pour expliquer ce comportement, les auteurs suggèrent que la protonation des ammoniums quaternaires et la dissociation des silanols résiduels seraient influencées par la direction et l'intensité du champ électrique. Cette variation de la densité de charge électrique à la surface de la phase stationnaire modulerait ainsi la rétention des espèces.

Les hypothèses avancées par les auteurs ainsi que leur mode d'exploitation de leurs résultats me semble sujet à caution, mais leurs travaux présentent l'intérêt d'aborder l'influence de la tension d'analyse sur la rétention des composés en ECC. Ainsi en ECC, le champ électrique semble jouer un rôle bien plus important qu'en EC car la phase stationnaire, sa densité de charge, l'organisation de ses greffons peuvent être influencée par ce paramètre.

VI.2 Concentration du tampon de la phase mobile

La force ionique possède une grande influence sur le FEO, en corrélation notamment avec la taille des pores de la phase stationnaire. Comme nous l'avons déjà mentionné, pour avoir un profil plat des vitesses dans un capillaire, celui-ci doit avoir un diamètre dix fois supérieur à la longueur de Debye δ . Ce raisonnement peut être transposé au cas des deux types de canaux potentiellement présents en ECC.

Le tableau I résume les conditions permettant de maintenir un front plat selon la concentration en l'électrolyte de la phase mobile et le diamètre des particules de phase stationnaire. En ce qui concerne les canaux inter-particules, la condition pour maintenir un front plat des vitesses devient $d_p > 40 \delta$. Dès que les particules de phase stationnaire ont un diamètre supérieur à $1,5 \mu\text{m}$, il n'y a plus de recouvrement possible des doubles couches dans les conditions usuelles d'analyse (concentrations de l'électrolyte supérieures à 1 mM). Pour les canaux intra-particules, ayant un diamètre de pore de 300 \AA , le profil plat des vitesses sera obtenu pour un électrolyte d'au moins 10 mM, alors que pour des particules ayant un diamètre de pores de 100 \AA , il faudra utiliser des concentrations d'au moins 100 mM.

Tableau I : Influence de la concentration en électrolyte sur la longueur de Debye et diamètres minimaux des canaux où circule de la phase mobile et diamètre associé des particules de phase stationnaire pour obtenir un profil de vitesse plat [20]

concentration de l'électrolyte (mM)	Longueur de Debye (δ) (nm)	diamètre minimal des canaux où circule la phase mobile (μm)	diamètre minimum des particules (d_p) (μm)
		$d \geq 10 \delta$	$d_p \geq 40 \delta$
0,01	100	1	4,0
0,1	31	0,3	1,2
1	10	0,1	0,4
10	3	0,03	0,12
100	1	0,01	0,04

Le recouvrement des doubles couches va donc principalement concerner le flux intra-particules. Si la perte du profil plat des vitesses entraîne une perte d'efficacité, elle ne signifie pas la disparition totale du flux. La figure 16 présente les profils théoriques des vitesses obtenues dans un cylindre, pour différentes longueurs de Debye. La courbe n°5 représente un cas sans recouvrement et sert de référence. Pour une longueur de Debye voisine du diamètre des pores, un flux représentant environ 20% du flux sans recouvrement est attendu (Fig°16, courbe 1). Le flux intra-particules aura une influence dans toute la gamme des molarités employées habituellement (1 à 100 mM). Par exemple, pour des pores de 300 Å, avec des concentrations en électrolyte de 0,1 , 0,4 et 2,3 mM, le profil des vitesses intra-particules n'est pas plat (Fig°16, courbes 1, 2, 3), mais présente une intensité allant de 20 % à 95 % de celle obtenue en l'absence de recouvrement. Ce n'est qu'à partir de 10 mM que ce profil pourra être considéré comme plat.

Le FEO intra-particule n'est pas forcément négligeable par rapport au FEO inter-particule. Stol *et al.* [24, 59] ont étudié précisément le flux intra-pore en suivant le comportement de différents polystyrènes en solution sur une phase stationnaire Lichrosorb, de diamètre de particules et de pores 10 µm et 100 Å, respectivement. Ils observent bien un flux intra-particule important, d'une intensité équivalente à 78% du flux inter-particules pour une force ionique de 10 mM en chlorure de lithium.

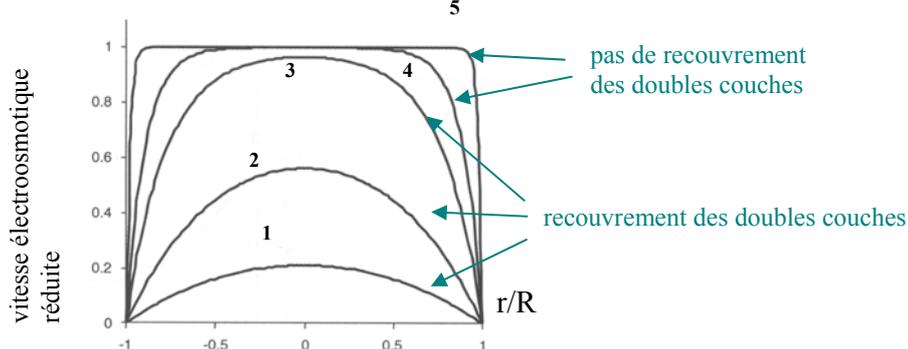


Figure 16 : Profils des vitesses électroosmotiques, modélisés pour différentes valeurs de longueur de Debye dans le cas d'un cylindre de rayon R. Courbes 1) : $\delta=d_{\text{pore}}$, 2) $d_{\text{pore}}=2 \delta$; 3) $d_{\text{pore}}=5 \delta$; 4) $d_{\text{pore}}=10 \delta$; 5) $d_{\text{pore}}=50 \delta$ [59]

Le flux intra-pore peut augmenter l'efficacité des pics en ECC par rapport à la CLHP, en augmentant le transfert de masse et en réduisant la diffusion dans les particules [21, 41]. Pour avoir la plus faible dispersion possible, les flux intra- et inter-particules doivent être d'amplitudes voisines pour assurer la plus grande homogénéité possible du flux global résultant (Fig. 17).

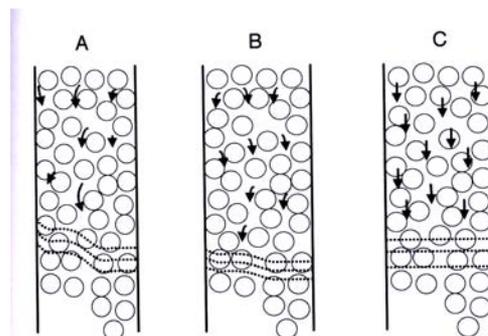


Figure 17 Effet des vitesses intra et inter particules sur le front de solvant, A) en CLHP B) en ECC sur particules non poreuses ou sans flux intra-particules, C) en CEC avec un flux intra-particules (d'après [27])

Le même type de raisonnement peut être appliqué aux colonnes monolithiques. Les monolithes sont généralement dotés de pores et de canaux de circulation de la phase mobile. Ces canaux se distribuent généralement selon leur taille en deux grands types : d'une part, les macropores (diamètre $d > 50\text{nm}$) qui assurent le passage de la phase mobile, d'autre part les mésopores et/ou les micropores ($50\text{ nm} > d > 2\text{nm}$ et $2\text{ nm} > d$ respectivement [60]). Les macro-pores ont une taille et un rôle similaire aux canaux inter-particules tandis que les méso et les micro-pores sont comparables aux canaux intra-particules (cf Partie II) : le même impact de la molarité sur les flux dans les macro et les méso, micro-pores est donc attendu pour les phases monolithiques.

La force ionique de la phase mobile a donc un effet primordial sur le FEO en ECC. C'est elle qui va moduler son intensité et le caractère perfusif du flux. C'est dans ce sens que la force ionique a un impact original sur l'efficacité des analyses.

VI.3 Pourcentage de solvant organique dans la phase mobile

Dans la littérature on relève souvent des pourcentages de modificateur organique de 30 à 90% pour l'analyse par ECC de composés aussi bien neutres que chargés [49, 52, 61, 62]. Ceci peut s'expliquer par un large emploi de phases stationnaires à polarité de phases inversée en absence de gradient. Le pourcentage de modificateur organique assure une force éluante suffisante ainsi qu'une bonne mouillabilité de la phase stationnaire. L'acétonitrile reste le solvant organique le plus employé [14].

La présence de solvant organique et son pourcentage dans la phase mobile jouent sur de multiples paramètres lors de l'analyse et influencent non seulement la rétention chromatographique, la mobilité électrophorétique mais aussi la mobilité électroosmotique, si l'on se réfère aux équations 6, 9 et 15.

VI.3.A Effet sur le FEO

Le rapport ϵ_r/η , permet très souvent d'appréhender, à partir de valeurs tabulées, l'influence du pourcentage de solvant organique de la phase mobile sur le FEO en EC. En revanche, en ECC, l'évolution du FEO avec le pourcentage de modificateur organique dans la phase mobile s'est très vite révélée différente selon le type de solvant organique utilisé. Pour le méthanol, la vitesse électroosmotique suit bien les variations de ϵ_r/η , alors que différents auteurs [28, 49, 55] rapportent pour l'acétonitrile, une augmentation monotone de la mobilité EO, en fonction du pourcentage d'acétonitrile dans la phase mobile. Dans ce cas, le potentiel zêta au niveau de la phase stationnaire, ne peut plus être considéré comme constant (Fig. 18, A). Or ϵ_r/η et le potentiel zêta peuvent varier en sens opposés (Fig. 18 A et B). Dearie *et al.* [28] se basent sur le rapport $\epsilon_r \zeta/\eta$ pour corrélérer de manière satisfaisante l'évolution du FEO avec le pourcentage de solvant (Fig 18 C).

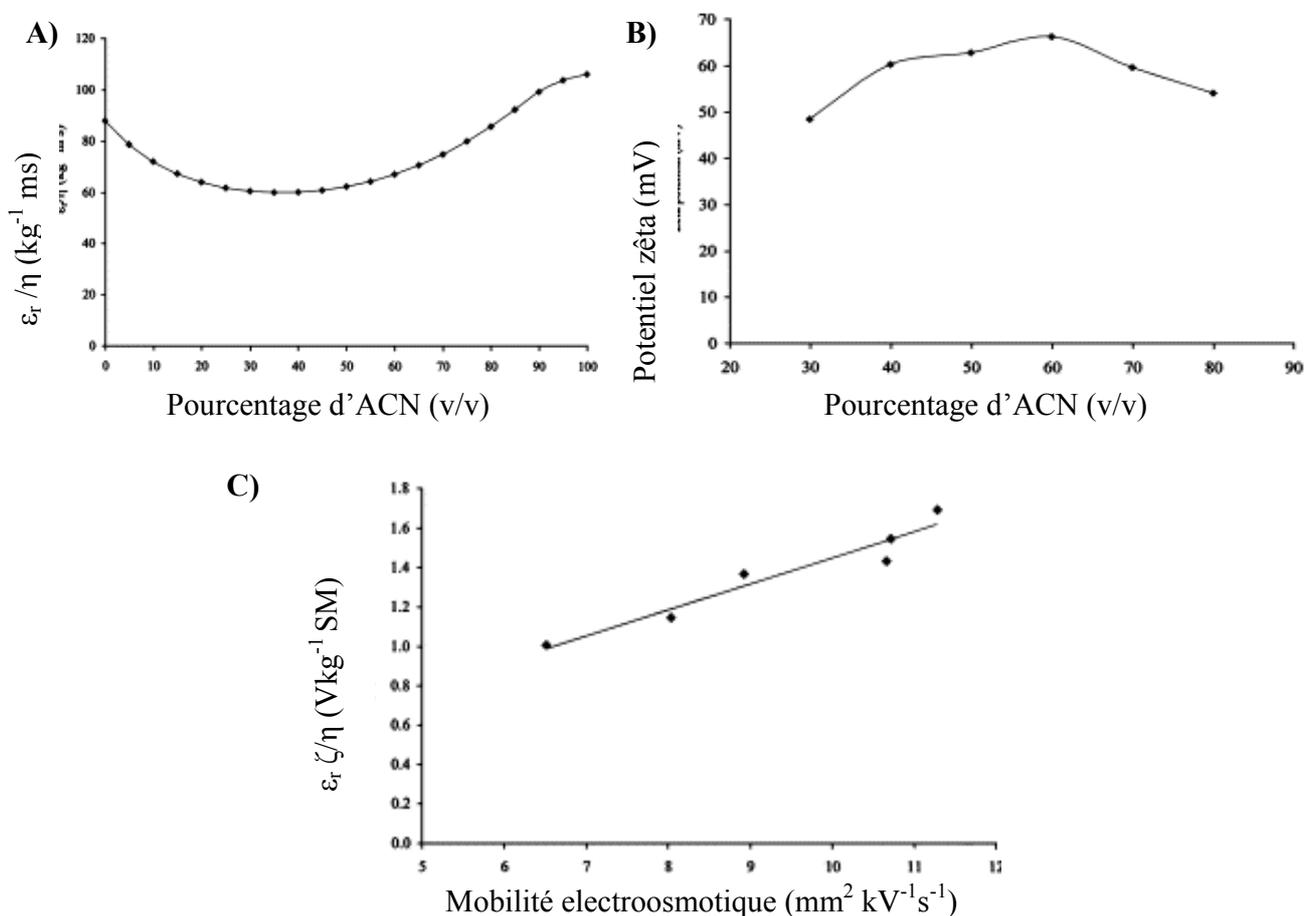


Figure 18 : Influence du pourcentage de solvant organique sur le FEO A) Variations du rapport ϵ_r/η dans un mélange eau/ acétonitrile à 20°C, en fonction du pourcentage en acétonitrile (v/v) B) Evolution du potentiel zêta en fonction du pourcentage d'acétonitrile, C) Corrélation entre le rapport $\epsilon_r \zeta/\eta$ et la mobilité EO ; colonne : 100 μm d.i., 30 cm, phase Spherisorb, ODS-1, 3 μm , phase mobile acétate d'ammonium 25 mM pH 7/ACN, (v/v), conditions d'analyse 25°C, 15,5 kV(d'après [28])

D'autres hypothèses ont été aussi avancées pour expliquer cette évolution de la mobilité EO avec le pourcentage d'acétonitrile. La possibilité qu'un solvant organique, comme l'acétonitrile, puisse

se charger par interaction avec les silanols a aussi été émise [56]. Enfin la présence de parties remplies (frittés, phase stationnaire) et non remplies dans une colonne d'ECC peuvent compliquer l'évolution peu prévisibles du FEO en fonction du pourcentage en solvant organique.

VI.3.B Effet sur l'éluion des analytes

En ECC, sur une phase stationnaire à polarité de phases inversée, différents types de mécanismes peuvent se superposer avec des amplitudes relatives variables selon le pourcentage de solvant organique. Cette influence a été schématisé par Walhagen et Unger [63], par la figure n°19, pour des peptides chargés analysés sur une phase stationnaire qui engendre un FEO cathodique. Pour les fortes proportions en solvant organique les peptides ne sont pas retenus et migrent avant le marqueur de FEO, ce qui se traduit par une valeur négative du facteur de rétention électrochromatographique tel que défini par Dittman *et al.* [55].

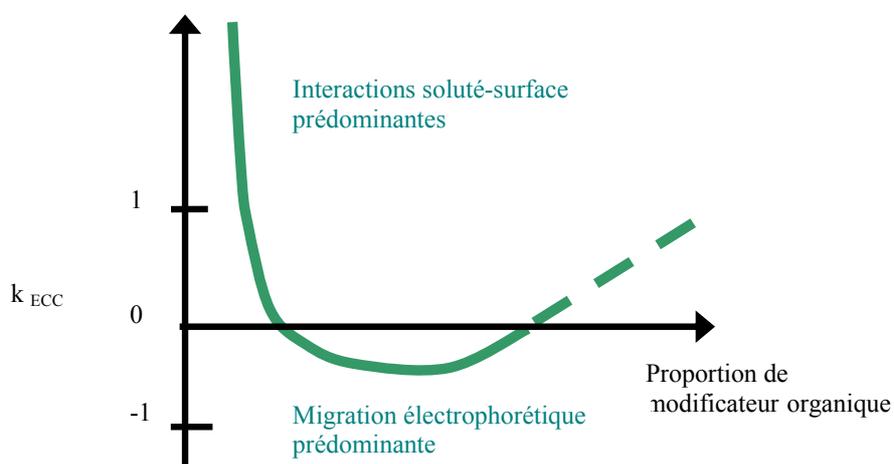


Figure 19 : Schéma représentant l'évolution en fonction du pourcentage de solvant organique dans la phase mobile de la rétention électrochromatographique pour des peptides chargés positivement, pour une colonne avec un FEO cathodique. D'après [63]

Ainsi deux cas de figure sont envisageables :

- à fort pourcentage de solvant organique, les phénomènes séparatifs sont majoritairement liés aux mécanismes électrophorétiques,
- à faibles pourcentages de solvant organique, les mécanismes chromatographiques et électrophorétiques sont simultanés. [63, 64]

Chaque analyte présentera une réponse particulière à un système en terme de rétention et de mobilité électrophorétique. Par exemple Zhang *et al.* [65] étudient des mélanges de peptides et de protéines en ECC avec un FEO anodique et pour des analytes migrant en sens inverse du FEO. Chaque famille de constituant présente une évolution différente en fonction de l'augmentation du pourcentage

de solvant organique dans la phase mobile. Les protéines voient leur vitesse d'éluion apparente croître légèrement avec le pourcentage d'ACN (Fig. 20 A), tandis que celle des peptides décroît (Fig. 20 B).

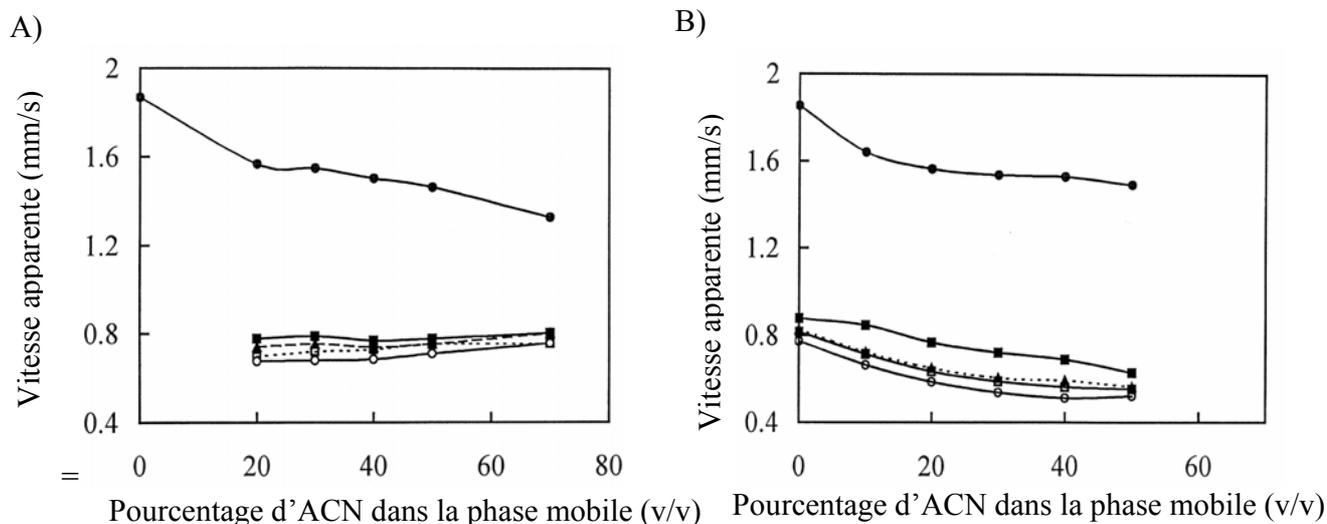


Figure 20 Influence de la concentration en ACN sur les vitesses apparentes A) : du marqueur (DMSO) (●), de la ribonucléase A (■), de l'insuline (▲), de l' α -lactalbumine (□), myoglobuline (○), Colonne : 50 μ m d. i., lg efficace : 29 cm, lg totale : 39 cm, phase stationnaire monolithique à base de méthacrylate, portant des amines tertiaires. Phase mobile tampon phosphate pH 2,5, 60 mM/ ACN, tension -25 kV, détection 214 nm B) : du marqueur (DMSO) (●), de l'angiotensine II (■), de la bradykinine (▲), de l'angiotensine I, (□), l' 1 [Sar¹,Ala⁸]angiotensine II (○), Phase mobile tampon phosphate pH 2,5, 50 mM/ ACN, d'après [65]

Les auteurs expliquent la différence de comportement par une rétention plus forte sur la phase stationnaire et une mobilité électrophorétique plus faible des protéines par rapport aux peptides, pour des analyses effectuées à "contre-courant".

Ainsi selon le "poids" de la rétention et la migration électrophorétique dans l'éluion des composés, des évolutions opposées des temps de rétention peuvent être rencontrées en faisant varier le pourcentage de solvant organique.

CHAPITRE II

COLONNES

D'ELECTROCHROMATOGRAPHIE CAPILLAIRE

Les analyses en ECC sont très largement conditionnées par la phase stationnaire contenue dans les colonnes capillaires. En ECC, elle joue, en effet, deux rôles principaux : elle permet d'engendrer le FEO et elle assure la rétention des composés.

Des paramètres intrinsèques de la colonne, tels que la nature des greffons, la porosité, la taille des pores de la phase stationnaire régissent l'intensité du flux, mais également son profil de vitesse. Lors de l'analyse, la dispersion des composés et la répartition des espèces, en particulier celles chargées, en solution dans la colonne, sont largement influencées par l'ensemble des paramètres intrinsèques de la colonne. Aussi, dans ce chapitre, nous nous emploierons à donner un aperçu des différents types de colonnes capillaires employées en ECC, des différents modes de fabrication de ces colonnes, de leur morphologie, de leurs limites et des nouveaux développements dans ce domaine.

Trois grandes familles de colonnes capillaires co-existent actuellement : les colonnes creuses (Fig. 21, A), les colonnes remplies de particules de phase stationnaire (Fig. 21, B) et les colonnes remplies par un seul et même bloc de phase stationnaire (Fig. 21, C), on parle dans ce dernier cas de phases stationnaires monolithiques. Les divers types de colonnes et leurs variantes ont fait l'objet de plusieurs revues [66-70, 14] dont une synthèse est présentée ici.

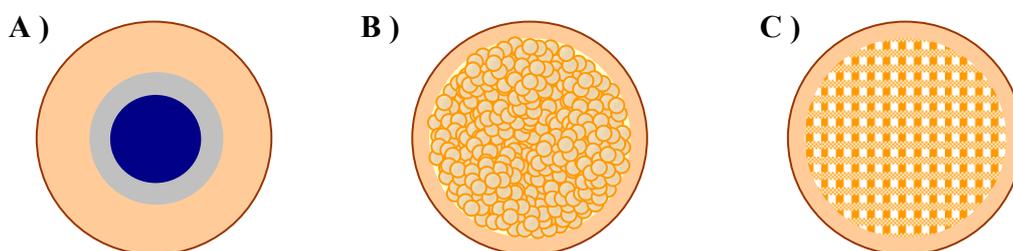


Figure 21 : Représentation schématique des sections des différents types de colonne en ECC, A) colonne capillaire creuse, B) colonne capillaire remplie de particules, C) colonne capillaire monolithique

I COLONNES CAPILLAIRES CREUSES [71-74]

Les colonnes capillaires creuses, aussi appelées colonne tubulaires ouvertes par traduction du terme anglo-saxon « open-tubular capillary », comportent une partie creuse en leur centre ; la phase stationnaire et ses greffons se situe au niveau des parois internes du capillaire.

Ce type de colonne a été développé non seulement pour sa facilité de fabrication, mais également pour éviter un certain nombre de problèmes rencontrés avec les autres types de colonnes. En particulier, il permet d'éviter les frittés qui sont utilisés pour immobiliser les particules de phases stationnaires.

En revanche, le greffage de la paroi du capillaire peut diminuer, voire éliminer le FEO. La limite principale des colonnes creuses est leur faible surface spécifique, étant donné que la phase stationnaire n'est présente que sous forme d'une couche assez mince recouvrant les parois internes du capillaire. De plus, cette faible surface spécifique nécessite l'injection de faibles quantités d'échantillon, ce qui limite la sensibilité des analyses par ECC sur colonnes capillaires creuses.

Pour augmenter la surface spécifique, il est possible d'augmenter soit le rapport surface sur volume interne en utilisant des capillaires de diamètre assez faible (5 à 25 μm), soit la longueur des capillaires (> 40 cm). Cependant, la réduction du diamètre du capillaire entraîne une diminution du trajet optique et réduit encore davantage la sensibilité des analyses.

Une autre solution, développée par Pesek [75-80] pour augmenter la surface spécifique consiste à graver la paroi interne des capillaires de silice par un traitement chimique, généralement à l'aide de bifluorure d'ammonium. Comme nous le voyons sur la figure 22, une gravure au bifluorure d'ammonium peut engendrer des états de surface très différents selon la température et la durée du traitement. Selon Onuska *et al.* [81] la gravure de la paroi interne permet de multiplier la surface spécifique par 1000. Pullen *et al.* [82] arrivent à la même estimation par microscopie de forces atomiques. Cependant, la gravure peut entraîner des phénomènes de pollution et une inhomogénéité de la surface.

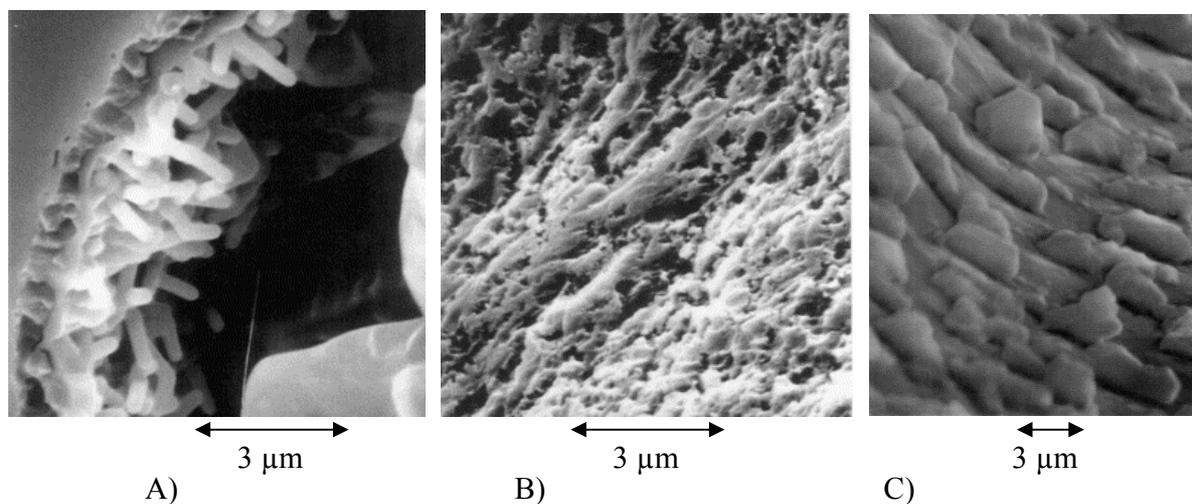


Figure 22 : Images de microscope électronique à balayage (MEB) de parois internes de capillaires silice gravés à l'aide de bifluorure d'ammonium Influence de la durée et de la température de gravure : A) 3 h à 300°C, B) 2 h à 300°C et 2 h à 400°C, C) 2 h à 300°C et 1 h à 400°C d'après [75]

Les parois internes des capillaires creux, gravées ou non, peuvent être fonctionnalisées par greffage covalent ou par adsorption de composés. Pesek *et al.* ont testé des greffages covalents, par exemple de groupements octadécyle, diols ou de sélecteur chiraux [75, 83]. Ce type de fonctionnalisation donne des colonnes capillaires très stables [71] et reproductibles, mais un peu plus délicates à fabriquer que les colonnes obtenues par simple adsorption de composés. Des surfactants

cationiques, des polymères, mais aussi des protéines et des peptides ont déjà été employés comme phase stationnaire adsorbée sur ce type de colonne [71, 84-85]. Kamande *et al.* [86] ont même constitué une double couche de polymères de charges opposées sur les parois du capillaire.

Mais, que le capillaire soit gravé ou non, les capacités de pic restent généralement faibles, en général 100 fois plus petites que celles obtenues avec des colonnes capillaires remplies [75, 85].

La formation de couche de polymère réticulé à base de polystyrène divinylbenzène a été testée afin d'augmenter la surface spécifique, par Huang *et al.* [87]. Des globules de polymère sont formés à la surface du capillaire (Fig. 23), mais ce traitement fait disparaître le flux électroosmotique et la diffusion des analytes dans la couche de polymère est souvent lente. Soit la couche est épaisse et la diffusion entraîne un élargissement des pics, soit la couche est mince et le gain en surface spécifique est alors trop faible.

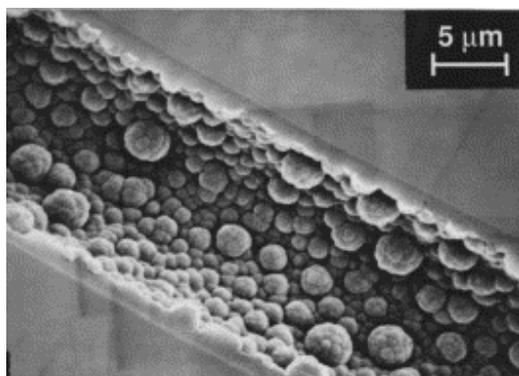


Figure 23 : Image obtenue par microscope électronique à balayage (MEB) de la paroi interne d'un capillaire de silice fondue recouverte de polystyrène-divinylbenzène d'après [87]

Pour résoudre le problème de diffusion des composés dans la phase stationnaire, il a été proposé de fabriquer des couches poreuses de phase stationnaire. C'est le plus souvent une couche de silice poreuse qui est fabriquée, *in situ*, par un procédé de type "sol-gel" [88]. Dans un procédé sol-gel [89], des précurseurs sont hydrolysés en milieu acide ou basique et se condensent en particules stables en suspension. Ce stade caractérise les "sols". La suite de la condensation donne naissance à un réseau tridimensionnel : un "gel humide". L'excédent de solution réactionnelle est enlevé sous pression, soit de gaz comme l'argon [90], soit de solvants tel que l'éthanol [91]. Après élimination des molécules de solvant, par séchage et/ou vieillissement, un gel sec et stable, appelé aussi "xérogel", est obtenu [88, 92]. Les précurseurs les plus employés sont des alkoxydes de silice, leur chimie étant très bien connue. Mais d'autres types de constituants, comme les alkoxydes de zircon, ont été testés pour les propriétés acido-basiques du zircon et pour sa bonne résistance sur une large gamme de pH [91].

Le mélange réactionnel employé pour la formation d'un sol-gel se compose généralement des constituants suivants:

- un ou plusieurs précurseurs
- un catalyseur, souvent un acide ou une base
- eau
- solvant(s) organique(s)
- un agent porogène

En variant la composition de ce mélange, sur les différentes conditions opératoires (préconditionnement du capillaire, température, durée, mode séchage) il est possible de faire varier les caractéristiques du xérogel, en terme de type de greffon, d'épaisseur de la couche de phase stationnaire, de porosité, de taille et de distribution des pores [88].

Même si Malik [88] a proposé une fonctionnalisation de cette couche après l'étape de synthèse du sol-gel. Un support chromatographique fonctionnalisé peut être obtenu lors d'une même étape de synthèse, dans ce cas un précurseur déjà fonctionnalisé est incorporé au mélange réactionnel.

Les sols-gels sont, par ailleurs, particulièrement stables à haute température et en présence de solvants [88]. Des surfaces spécifiques suffisantes et des efficacités de quelques centaines de milliers de plateaux théoriques par mètre ont pu être obtenues [93].

Les colonnes capillaires creuses présentent conventionnellement des groupements alkyle, mais certains travaux ont montré qu'elles peuvent permettre des séparations chirales, en utilisant des cyclodextrines, ou des produits biologiques (peptides, protéine, cellulose) ou encore par synthèse d'empreinte moléculaire [71, 72]. Toutefois, les colonnes creuses restent en petit nombre en comparaison avec les colonnes remplies, plus généralement employées.

II COLONNES CAPILLAIRES REMPLIES

Les colonnes remplies ont généralement deux portions, une portion remplie où la phase stationnaire est maintenue, et une portion vide qui permet la détection des analytes, comme cela est présenté dans le cas de colonnes remplies de particules de phase stationnaire à la figure 24. Les capillaires employés ont généralement des diamètres de 20 à 100 μm , et les colonnes capillaires remplies se classent en deux grandes familles :

- ✚ les colonnes remplies de particules de phase stationnaire immobilisées dans le capillaire
- ✚ les colonnes remplies d'un bloc unique et continu de phase stationnaire : ces colonnes sont regroupées sous le terme de colonnes capillaires monolithiques.

II.1 Colonnes remplies de particules de phase stationnaire [67, 94]

Les colonnes capillaires remplies les plus utilisées en ECC contiennent des phases stationnaires commerciales, notamment à base de particules de silice greffée, qui sont identiques à celles des colonnes utilisées en CLHP. Ces phases stationnaires sont le plus souvent immobilisées, au sein du capillaire, par des frittés fabriqués *in situ* (Fig. 24).

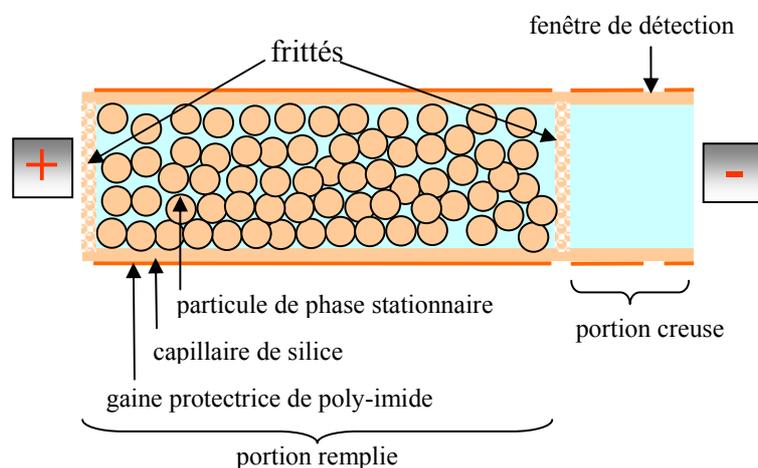


Figure 24 : Schéma d'une colonne capillaire de silice remplie de particules de phase stationnaire, maintenues par deux frittés.

Ces colonnes ont de grandes surfaces spécifiques comparées aux colonnes creuses et présentent l'avantage de pouvoir utiliser des phases stationnaires variées, avec des propriétés déjà très bien définies. De plus, les meilleures efficacités observées pour ces colonnes sont très supérieures aux autres types de colonnes : des efficacités exceptionnelles d'un million de plateaux théoriques ont été reportés par Smith et Evans [3].

En revanche, ces atouts sont quelquefois limités par les difficultés liées au remplissage de la colonne et à l'immobilisation de la phase stationnaire, qui sont évoquées dans les paragraphes suivants.

II.1.A Méthodes de remplissage des capillaires [68, 69, 95, 96]

La majorité des remplissages de colonnes capillaires sont effectués sous pression et en phase liquide ; cette méthode est aussi nommée « remplissage hydrodynamique ». Brièvement, elle consiste à placer la phase stationnaire en suspension dans un solvant approprié, puis à remplir un réservoir de cette phase stationnaire. Le réservoir est ensuite connecté au capillaire. La phase stationnaire est alors entraînée du réservoir vers le capillaire grâce à un solvant ou à un mélange de solvants approprié délivré par une pompe [94, 97]. La phase stationnaire est maintenue dans le capillaire, grâce à un fritté amovible placé à l'extrémité de sortie du capillaire.

Ce protocole doit être adapté à chaque phase stationnaire pour déterminer le solvant ou le mélange de solvants de mise en suspension, de plus le remplissage peut être assez laborieux et dépend de l'expérience de l'opérateur.

D'autres procédés de remplissage ont été proposés [95], comme le remplissage par fluide supercritique [98], par voie électrocinétique, par force centripète, par gravité ou plus récemment par aspiration sous vide [99]. Le fluide supercritique permet des remplissages rapides et les colonnes présentent souvent de bonnes efficacités. La technique par aspiration convient davantage à des remplissages par des particules de faible diamètre (1 μm) [99].

II.1.B Méthodes d'immobilisation des particules de phase stationnaire

Une fois le capillaire rempli de phase stationnaire, la dernière étape consiste à immobiliser cette phase. L'immobilisation doit permettre à la colonne de résister à la mise sous tension lors des analyses et à la mise sous pression lors de rinçage ou de préconditionnement des colonnes, et ceci à différents pH et pour différents solvants. L'immobilisation doit répondre à un certain nombre de critères. Elle ne doit pas détériorer les séparations, ni induire de pollutions dans la colonne, ni entraîner d'adsorption des analytes, ni provoquer de trop importantes pertes de charge. Par ailleurs les discontinuités occasionnées par l'immobilisation, notamment sur le potentiel zêta, doivent être les plus faibles possibles. Actuellement, la quasi totalité des immobilisations sont faites par fabrication *in situ* de frittés aux deux extrémités de la zone remplie de la colonne capillaire.

II.1.B.a Frittés

Le mode de fabrication des frittés le plus courant consiste à chauffer à haute température, sur quelques millimètres, le capillaire rempli de phase stationnaire à base de silice. Sous l'effet de la chaleur, les particules de phase stationnaire se fixent aux parois du capillaire de silice et s'agglomèrent les unes aux autres en formant un réseau poreux.

Cette opération se fait avec un écoulement d'eau pour assurer une certaine porosité au fritté, pour éliminer les produits de dégradation des greffons brûlés, pour éviter la formation de bulles au niveau de la zone chauffée et pour maintenir la phase stationnaire bien tassée lors du chauffage.

Hélas, ce mode d'immobilisation, assez simple, soulève un nombre conséquent de problèmes [100]. Premièrement, le chauffage du capillaire brûle la gaine protectrice de poly-imide (Fig. 24), ce qui rend le capillaire de silice extrêmement fragile. Deuxièmement, les frittés forment une discontinuité par rapport à la portion remplie de la colonne capillaire.

Une discontinuité du potentiel zêta (cf chapitre I) entre le fritté et la phase stationnaire ou entre le fritté et le capillaire creux peut entraîner de grandes variations du FEO local. D'une part, cette

discontinuité augmente, très probablement, la dispersion des analytes et engendre un élargissement des pics. D'autre part, cette discontinuité peut entraîner la formation de bulles au niveau du fritté. Par exemple, si une zone I avec un faible FEO est suivie par une zone II avec un fort FEO, la zone II joue le rôle de pompe et « aspire » la phase mobile. Il en découle une baisse de pression à l'interface des zones I et II qui peut se traduire par la formation de bulles [68], formation observée par Wang *et al.* [101] grâce à la microscopie confocale. Des frittés très poreux seront particulièrement fragiles vis-à-vis des mises sous pression lors des préconditionnements de la colonne capillaire, tandis que des frittés de faible porosité produisent une grande résistance à l'écoulement et peuvent aussi entraîner la formation de bulles. La création de bulles, qui constitue l'un des problèmes majeurs de l'utilisation des frittés, va donc dépendre de la structure du fritté, c'est-à-dire de sa nature, mais aussi de sa longueur. Enfin, les frittés ne peuvent pas être réalisés avec toutes les phases stationnaires. Pour contourner ce problème il est possible de réaliser les frittés dans une phase stationnaire différente de la phase de remplissage, mais ceci complique la procédure d'immobilisation. Les procédures de remplissage et d'immobilisation nécessitent alors des étapes supplémentaires et peuvent engendrer de plus grandes discontinuités du potentiel zêta.

Il existe d'autres méthodes de fabrication de frittés [102]. En 2000, Pyell [68] relève trois méthodes d'immobilisation : par formation d'un sol-gel, par fixation des particules à l'aide de silicate de sodium (ou de potassium) avec ou sans chauffage. Mais l'auteur souligne les problèmes de stabilité à long terme et de reproductibilité de ces frittés. Piraino *et al.* [103] ont comparé des frittés fabriqués par méthode sol-gel, par photo-polymérisation et par chauffage de la phase stationnaire. La méthode sol-gel et la photopolymérisation forment des frittés plus reproductibles, cependant, les frittés réalisés par chauffage restent ceux qui entraînent la plus faible dispersion des analytes. Les problèmes rencontrés avec les frittés ont amené les scientifiques à rechercher des solutions alternatives pour l'immobilisation de la phase stationnaire au sein des capillaires.

II.1.B.b Restriction du diamètre interne du capillaire

Plusieurs autres méthodes d'immobilisation de la phase stationnaire dans le capillaire ont été proposées, en particulier, la restriction du diamètre interne du capillaire pour empêcher les particules de phase stationnaire de bouger [100, 104, 105]. Ceci peut être obtenu par un raccord à un capillaire de diamètre interne plus faible. A titre d'exemple, un capillaire de diamètre interne de 50 μ m pour des particules de phase stationnaire de 5 μ m de diamètre peut être utilisé [106] (Fig. 25, a). Le capillaire peut aussi être étiré (Fig. 25, b) ou comporter une restriction interne (Fig. 25 c).

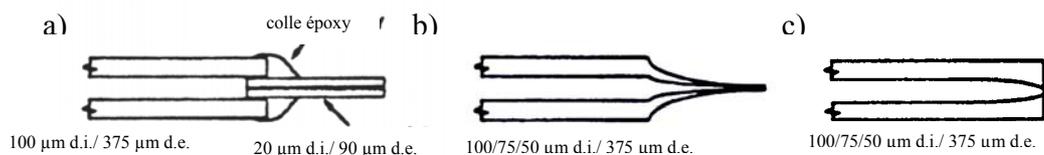


Figure 25 : Immobilisation de la phase stationnaire dans un capillaire de silice par restriction du diamètre interne du capillaire, a) par connection à un capillaire de diamètre interne plus réduit b) par étirement c) par rétrécissement du diamètre interne [105]

Ces restrictions permettent d'éviter la formation de frittés et ne nuisent pas à l'efficacité des analyses puisque des efficacités de plusieurs centaines de milliers de plateaux théoriques par mètre sont obtenus avec ces colonnes [68, 100]. Elles sont particulièrement adaptées pour un couplage avec un appareil de spectrométrie de masse [67], mais sont aussi employées pour une détection UV [104]. Elles restent cependant d'un emploi marginal en raison de la technologie originale et difficile à maîtriser [67].

D'autres approches ont consisté à ne plus immobiliser les particules de phase stationnaire aux extrémités de la colonne, mais sur toute la longueur de la portion remplie, par immobilisation au moyen de sol-gel ou par immobilisation thermique.

II.1.B.c Nano-glue

La méthode dite « nano-glue » a été mise au point par l'équipe de Tang et Lee [107-110]. Elle consiste à immobiliser les particules de phase stationnaire par formation de petits ponts de sol-gel formés *in situ* (Fig 26).

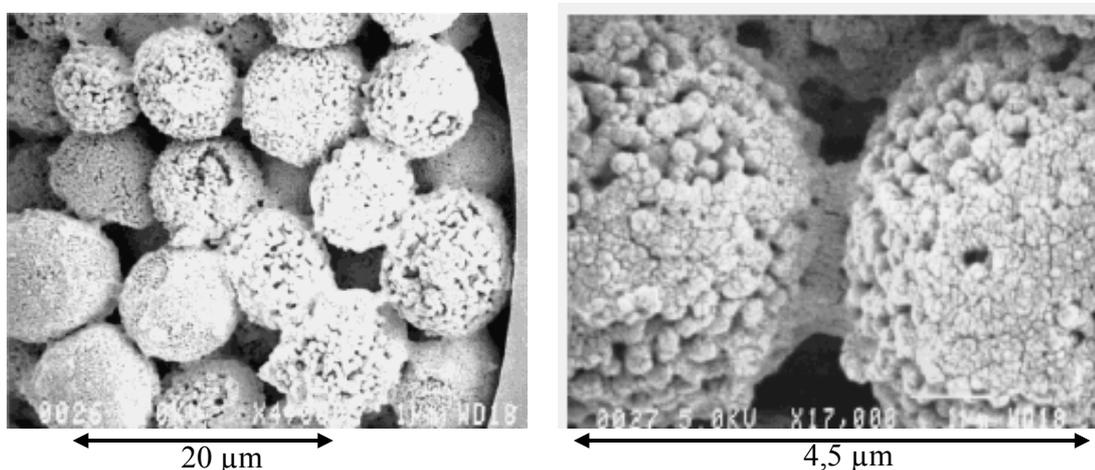


Figure 26 Phase stationnaire octadécyle, 7 µm, 4000 Å immobilisée par nano-glue sol-gel, observée par MEB (d'après [108])

Elle nécessite un remplissage du capillaire par la phase stationnaire, puis par un mélange réactionnel pour synthétiser un gel *in situ* et immobiliser les particules de phase stationnaire. L'excédant

de solution sol-gel est éliminé par un flux de dioxyde de carbone en conditions supercritiques. Ces colonnes sont effectivement mécaniquement stables, poreuses et le gel paraît inerte.

Des efficacités de 200.000 plateaux théoriques par mètre ont été mesurées pour des composés aromatiques neutres sur des colonnes remplies de phase stationnaire octadécyle, "macroporeuse" (1 400 Å, 7 µm). D'autres méthodes, proposées par Dulay *et al.* [111] consistent à remplir le capillaire de phase stationnaire et de solution sol-gel simultanément. Ces colonnes, où les particules sont emprisonnées dans un réseau sol-gel tout le long de la portion remplie du capillaire, donnent des efficacités faibles, environ 100 000 p/m pour des composés neutres tels que l'anthracène [111] et 20 000-50 000. p/m pour l'histamine, la méthylhistamine et la serotonine dérivée par l'*o*-phthalaldéhyde [112].

Cependant peu de travaux [113] ont été menés sur la relation entre la présence de gel et notamment le bouchage des pores de la phase stationnaire et le recouvrement des greffons de la phase stationnaire. La difficulté de réalisation et le manque de recul sur ces deux derniers aspects expliquent sans doute le peu de données présentes dans la littérature.

II.1.B.d Immobilisation thermique sur la totalité de la colonne [114]

Une autre méthode d'immobilisation consiste à chauffer la totalité de la colonne au moyen d'une résistance qui se déplace à une vitesse constante le long du capillaire. Dans ce cas, un phénomène d'agrégation similaire au cas des frittés se produit, mais cette fois sur toute la longueur de la portion remplie du capillaire. Généralement, des conditions d'immobilisation plus douces que dans le cas des frittés sont employées, ce qui évite de brûler la gaine protectrice de poly-imide et limite le dégreffage des particules de phase stationnaire. La colonne est bien stable d'un point de vue mécanique. De plus, Adam *et al.* [114] n'ont décelé aucune modification des temps de rétention et des sélectivités avant et après immobilisation, lors de l'analyse d'une série de p-hydroxy-benzoates d'alkyle sur une colonne greffée octadécyle (Hypersyl, 3 µm). Mais cette méthode d'immobilisation nécessite un matériel adapté, une optimisation pour chaque phase stationnaire et une détérioration des greffons de la phase stationnaire par chauffage est toujours à craindre.

Les deux dernières techniques d'immobilisation forment des phases stationnaires d'un seul tenant, nous nous trouvons déjà dans le domaine des phases stationnaires monolithiques, dans le sens strict du terme. Mais le terme "phase monolithique" est associé à des capillaires remplis d'une phase stationnaire à base de sol-gel ou de polymère organique.

II.2 Colonnes monolithiques [115-121]

Les colonnes monolithiques connaissent un engouement croissant ces dernières années. Elles se sont développées, en premier lieu, pour éviter l'étape de remplissage du capillaire avec des particules de phase stationnaire et surtout pour contourner les difficultés liées aux frittés. Elles présentent, elles aussi, l'avantage par rapport aux colonnes creuses d'offrir une plus grande surface d'échange. D'autre part, les phases monolithiques ont des structures tout à fait originales, qui se composent d'un squelette de phase stationnaire qui forme un réseau de canaux (Fig. 27).



Figure 27 : Schéma de la structure d'un monolithe synthétisé in-situ dans un capillaire de silice fondue. Modèle proposé par Gusev *et al.* pour un copolymère de styrène et styrène divinyl benzène ancré sur des parois préalablement silanisées (d'après [122])

Ces canaux se distribuent généralement selon leur taille en deux grands types : d'une part, les macropores et d'autre part les mésopores et/ou les micropores. Les colonnes monolithiques présentent souvent une très grande perméabilité et donc une faible perte de charge.

Jiang *et al* [123] soulignent les problèmes liés aux tailles de pore : pour limiter l'élargissement des pics observé surtout dans le cas des grosses molécules, il convient de réaliser une phase stationnaire pourvue de mésopores et non de micropores, en effet une taille trop réduite des pores favorise l'existence de phase mobile stagnante et peut entraîner un phénomène d'exclusion stérique lors des séparations.

Deux grands types de colonnes monolithiques se distinguent :

- ▶ les colonnes inorganiques ou organique-inorganiques
- ▶ les colonnes remplies d'un polymère organique, tels que les poly-acrylamides, les polystyrènes et les poly (méth)acrylates.

Dans tous les cas la synthèse est réalisée en plusieurs étapes :

- 1) prétraitement du capillaire de silice pour favoriser l'ancrage de la phase stationnaire sur la paroi du capillaire (étape considérée comme facultative par certains groupes de recherche).

- 2) remplissage du capillaire par un mélange réactionnel puis condensation ou polymérisation *in situ* par initiation chimique, thermique ou par radiation (UV-visible).
- 3) élimination du mélange réactionnel excédentaire
- 4) greffage du monolithe si le greffon n'a pas été introduit dans le mélange réactionnel initial.

pour les monolithes inorganiques deux étapes supplémentaires s'ajoutent :

- le vieillissement du monolithe
- le séchage

Le mode d'initiation de la polymérisation est un point crucial de la synthèse : il permet de maîtriser finement la zone de polymérisation au sein du capillaire. La détection au sein d'une portion de capillaire remplie de monolithe est rarissime [124], en particulier pour les monolithes organiques qui sont très rarement UV transparent [125]. De plus la détection au travers de monolithe de silice transparents aux UV se heurte souvent à des phénomènes de dispersion optique. Il est donc nécessaire d'avoir une zone du capillaire dépourvue de phase stationnaire, juste après la colonne proprement dite, pour créer une fenêtre de détection. Avec une initiation par catalyse chimique ou thermique, tout le mélange réactionnel va polymériser : le capillaire sera entièrement rempli de polymère. En revanche, une initiation par radiation permet de définir, à l'aide de caches, la portion exacte de capillaire irradié et de laisser une zone non polymérisée dans le capillaire, et facilite ainsi la réalisation de fenêtre de détection.

Pour ménager une portion creuse de capillaire pour la détection, d'autres stratégies ont été expérimentées selon la nature du polymère; il peut s'agir soit d'éviter la polymérisation au niveau de la fenêtre par remplissage partiel du capillaire avec le mélange de polymérisation, soit de détruire la phase stationnaire polymérisée au niveau de la fenêtre de détection, par chauffage ou par irradiation UV.

II.2.A Monolithes inorganiques, méthode sol-gel [89, 126-129]

La méthode sol-gel permet d'obtenir un monolithe inorganique et ainsi de fabriquer un support du même type que celui employé traditionnellement en CLHP. Le terme de polymère inorganique est parfois abusivement employé pour les sol-gel, en effet un polymère est la répétition d'un même motif, le monomère. Or lors de la réaction sol-gel deux types de condensations sont mis en jeu. De plus, la part de chaque condensation dans la formation du monolithe influence grandement la structure de la phase stationnaire [92].

Le mélange réactionnel employé est du même type que celui que nous avons déjà présenté, pour les colonnes creuses. Il repose sur la présence d'un ou plusieurs précurseurs qui vont établir la structure de base du gel, il s'agit le plus souvent d'alkoxyde de silicium.

Trois réactions décrivent le procédé sol-gel :

1) L'hydrolyse de l'alkoxyde



2) La condensation d'un hydroxyde et d'un alkoxyde



3) La condensation de deux hydroxydes



Les paramètres expérimentaux tels que la composition du mélange réactionnel, le pH, la température, les durées de réactions vont influencer les caractéristiques structurales et chimiques du monolithe. Par exemple, une faible proportion d'eau va favoriser la condensation alcoolique par rapport à l'hydrolyse : la condensation sera lente et le monolithe comportera davantage de canaux microscopiques.

Les sol-gels offrent une bonne résistance à la chaleur et aux solvants [88]. En revanche, les monolithes peuvent présenter des déchirures et des rétractations (occasionnées lors de la formation du gel ou lors du séchage [130]), qui nuisent à l'homogénéité de la phase stationnaire et à son adhésion à la surface interne du capillaire. De plus, le mode opératoire est assez complexe, du fait des nombreux paramètres qui rentrent en compte. Mais ces multiples paramètres peuvent aussi constituer un avantage, puisqu'ils permettent de moduler finement la structure micro et macroscopique, la porosité et la perméabilité du monolithe. Cette diversité a été illustrée par Tanaka *et al.* [128] qui jouent sur trois paramètres : (i) le type de monomère, (ii) la quantité de polyéthylène glycol (PEG), (iii) le volume de solvant. Comme les images obtenues par MEB (Fig. 28) le montrent, une augmentation du pourcentage de solvant augmente le volume total des pores, tandis que la quantité de PEG fait varier la taille des macropores. Ils obtiennent une grande variété de structures. Les monolithes à base de silice sont généralement stables dans le domaine du pH d'utilisation de la silice (pH 2,5-8,5), et sont inertes et souvent très poreux.

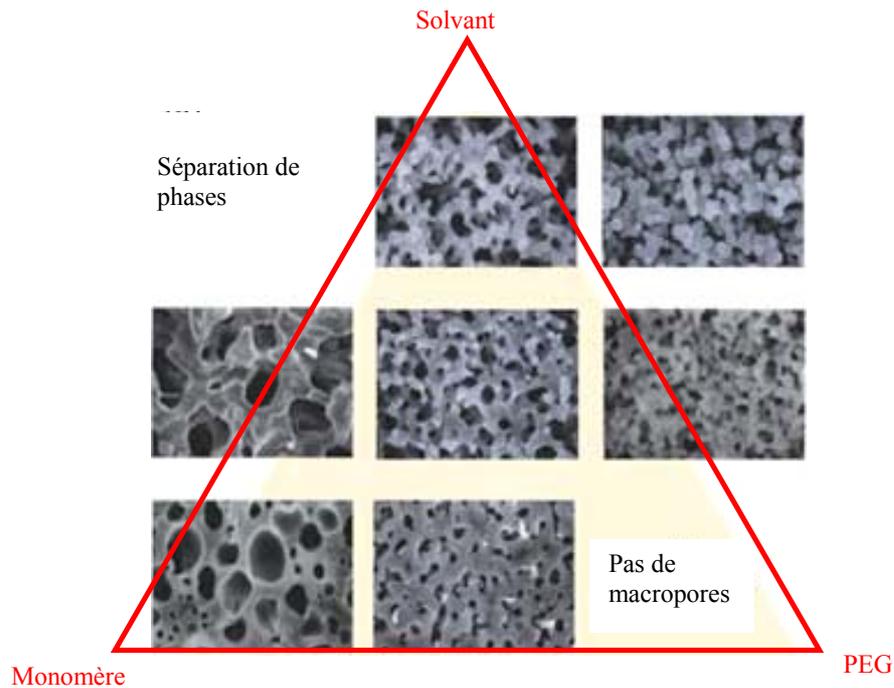


Figure 28 : Illustration de la relation entre la composition du mélange de gélification et la structure du monolithe, d'après [128]

A ce jour, les monolithes inorganiques, fabriqués par procédé sol-gel, sont quasiment exclusivement à base de silice, mais le procédé sol-gel peut parfaitement être développé avec d'autres alkoxydes, comme des alkoxydes de zirconium ou de titane, ce qui permet, par exemple, d'obtenir des propriétés acido-basiques du support originales.

II.2.B Monolithes organiques [117-119, 121, 131]

La rigidité d'un polymère est liée à son "taux de réticulation". Ainsi les différentes familles de monolithes polymères se classent en deux catégories : les monolithes dits "souples", qui correspondent principalement aux monolithes à base de poly-acrylamide et les monolithes dits "rigides" correspondant aux copolymères des familles des polystyrène-divinylbenzènes, des poly-acrylates et des poly-méthacrylates.

II.2.B.a Monolithes à base de polyacrylamide

Cette famille de monolithes a été principalement développée par l'équipe d'Hjertén [133]. Les poly-acrylamides sont connus pour former des monolithes souples, car ils sont souvent formés de longues chaînes peu réticulées, le monolithe est alors très poreux et fortement solvaté. Ce type de polymère contient rarement plus de 5% de polymère solide [131, 132].

Ce type de polymère est bien connu dans le domaine des séparations électrophorétique bi-dimensionnelle sur gel. En ECC, les monolithes à base de poly-acrylamide, qui présentait l'intérêt de pouvoir être synthétisé à température ambiante et dans l'eau ont longtemps été limités par un nombre réduit de monomères disponibles pour une synthèse en milieux aqueux. Palm et Novotny [134] ont, en 1997, introduit une méthode permettant la synthèse des monolithes de poly-acrylamides comportant des chaînes hydrophobes (C4, C6 ou C12) en présence de N-méthylformamide. L'utilisation de solvants organiques lors de la synthèse du monolithe a permis d'élargir la gamme des monomères utilisables [132].

Le squelette du polymère le rend peu hydrophobe (Fig. 29) et donc peu utile pour séparer les analytes peu polaires [132].

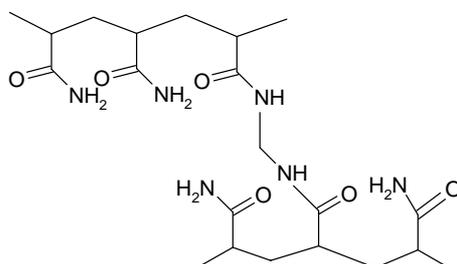


Figure 29 : squelette d'un monolithe à base de poly-acrylamide, avec comme agent de réticulation le N,N'-méthylène bis(acrylamide)

Les premières recherches de Fujimoto *et al.* [124] ont d'ailleurs montré en 1995 qu'une séparation de petites cétones neutres reposait davantage sur un phénomène de tamisage, tandis que des interactions électrostatiques et hydrophiles avec des acides aminées chargés étaient mise en évidence par Freitag en 2004 sur des monolithes à base de N,N-diméthacrylamide ou de méthacrylamide [135]. D'autres auteurs ont exploité le caractère polaire des fonctions amines et nitriles pour séparer des carbohydrates [136].

D'autre part, le caractère souple du polymère génère un certain nombre de problèmes comme sa faible résistance mécanique ou son faible ancrage aux parois du capillaire [131]. Le polymère est généralement fortement solvaté, ce qui rend le changement de phase mobile, et le temps d'équilibrage de la colonne assez long. De plus, il est sensible à des phénomènes de séchage qui peuvent entraîner une rétractation du polymère [68]. Mais en 2003, Hoegger et Freitag [137] ont démontré la possibilité de synthétiser des polymères beaucoup plus rigides et résistants.

De plus certains monolithes de polyacrylamides présentent l'avantage d'être UV-transparents, c'est ce qui a permis à Fujimoto *et al.* [124], de détecter par UV directement au sein du capillaire d'acides aminés dansylés.

II.2.B.b Monolithes à base de polystyrène-divinylbenzène

Les phases stationnaires à base de polystyrène divinyl benzène sont bien connues en CLHP [142], du fait de leur grande stabilité sur une large gamme de pH (1 à 14). Les monolithes à base de polystyrène divinylbenzène (PS-DVB) présentent une morphologie de globules, qui a pu être observées par Gusev *et al.* [122], Légido-Quigley *et al.* [138] et Ivanov *et al.* [139] (Fig. 30 B). Ces monolithes ont une grande perméabilité et Legido-Quigley *et al.* [138] souligne leur bonne résistance mécanique pour des capillaires de 50 et 100 μm de diamètre interne.

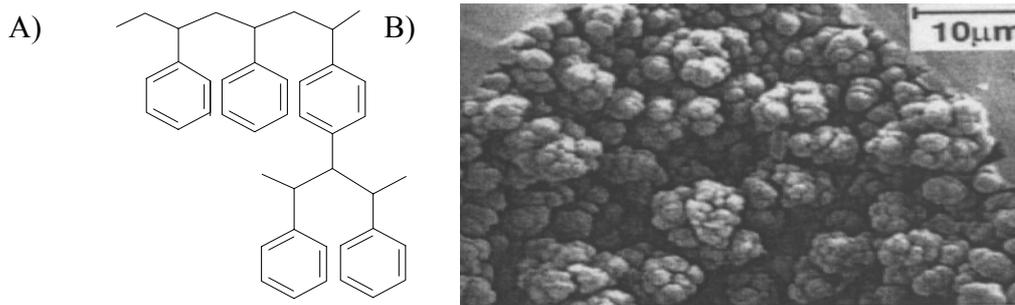


Figure 30 : Monolithe de polystyrène divinyl benzène A) représentation schématique de deux chaînes de poly-styrène réticulée par divinylbenzène B) Image MEB d'un monolithe de ce type (d'après [122]).

Les équipes de Horváth [87, 122], Huber [140, 141] ont synthétisé de nouveaux monolithes à base de polystyrène pour introduire différents greffons, notamment des chaînes alkylées. Jin *et al.* [142] ont montré que des composés aromatiques, des hormones, des peptides et des composés pharmaceutiques basiques pouvaient être séparés en ECC, avec des efficacités allant jusqu'à 200 000 p/m sur un monolithe de PS-DVB doté d'acide méthacrylique.

Bien que largement cités dans la littérature [67, 117, 121, 131, 132], ces monolithes n'ont que faiblement retenu l'intérêt en ECC, sans doute à cause de l'absence de charge dans le squelette du polymère et donc de FEO lors des analyses d'ECC. Cependant, des polymères contenant des greffons chargés, tel que l'acide méthacrylique, dans des conditions alcalines, ont permis d'obtenir un FEO, et ouvrent peut être la voie à un plus grand développement de ces monolithes pour l'ECC.

Chirica et Remcho [143], ont proposé d'utiliser les particules de phase stationnaire uniquement pour contrôler la porosité des colonnes suivant un protocole visualisé à la figure 31.

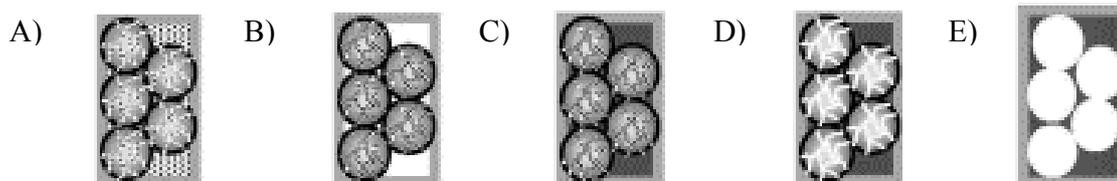


Figure 31 : Processus de synthèse d'une phase monolithique dont la porosité est contrôlée par des particules de silice. A) remplissage de la colonne par méthode hydrodynamique, B) séchage de la phase sous pression d'azote, C) Remplissage de l'espace interstitiel avec le mélange de polymérisation et polymérisation thermique, D) Dissolution lente des billes de silice par une solution de soude, E) colonne finale après dissolution des particules de silice d'après [143]

Dans une colonne remplie de particules de silice (figure 31, A), les auteurs introduisent un mélange d'agent de réticulation et de butyle méthacrylate ou de styrène. Le mélange polymérise entre les particules (figure 31, C). Puis, les particules sont dissoutes à l'aide d'une solution de soude, ne laissant alors que le polymère (figure 31, D et E). La colonne se compose alors du polymère qui présente l'empreinte en creux des particules. Mais ces colonnes qui nécessitent un remplissage par une phase stationnaire n'ont pas connu de postérité.

II.2.B.c Monolithes à base de polyacrylate et de poly-méthacrylate

Fréchet et son équipe ont été les pionniers en matière de synthèse de monolithe à base de poly-méthacrylate et polyacrylate en publiant un mode opératoire au début des années 90 [144-145]. Les polymères de poly-méthacrylates ont démontré une très bonne stabilité pour des pH de 2 à 12 [121].

Les poly-acrylates sont actuellement les polymères les plus utilisés et étudiés pour former des colonnes capillaire d'ECC. En effet, si une catalyse thermique peut être employée [121, 139], les monolithes à base de méthacrylate présentent surtout le grand avantage d'être photo-polymérisables, ce qui permet, grâce à l'utilisation de caches, de définir précisément la zone polymérisée lors de l'exposition aux radiations UV (lampe généralement calibrée sur la longueur d'onde 254 nm ou 365 nm). De plus la photo-catalyse assure une polymérisation rapide (moins d'une heure, [125]), par comparaison avec la catalyse thermique qui dure souvent plusieurs dizaines d'heures [139]. Cette particularité est d'autant plus intéressante, que ces polymères peuvent alors être aussi bien polymérisés au sein de puces, ou de micro-système intégré d'analyse totale [146].

De nombreuses études portent actuellement sur ces monolithes à base d'acrylate et de méthacrylate. Certains auteurs ont plus particulièrement étudiés les conditions de polymérisation telle que le préconditionnement du capillaire [147], qui peut être évité avec certains mélanges de polymérisation [144]. D'autres études ont porté sur le mélange de polymérisation en faisant varier la quantité et la nature des monomères, des agents porogènes ou encore des solvants [123, 125, 144, 145]. Selon le mélange de polymérisation retenu, des monolithes de structure et de porosité variées peuvent être obtenus : ces monolithes peuvent présenter un aspect "spongieux" (Fig. 32, B) ou posséder une structure "globulaire" (Fig. 32, C). A priori la structure "spongieuse" assure une très grande surface spécifique et comporte de nombreux méso et miro pores, tandis que la structure "globulaire" génère une très grande porosité et évite une séparation par taille des molécules.

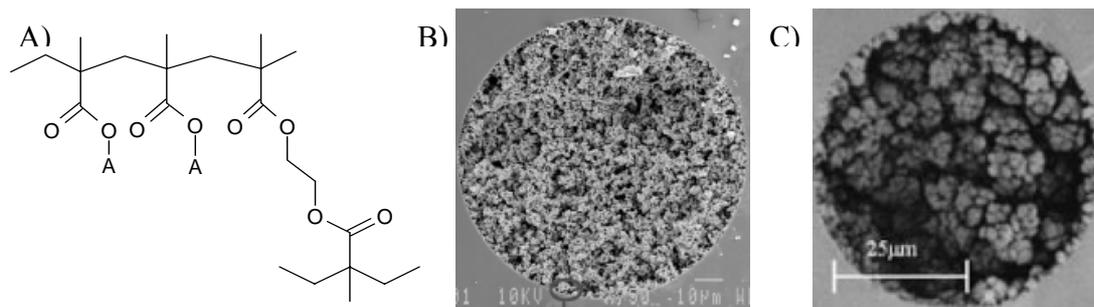


Figure 32 : Monolithe à base de méthacrylate A) représentation schématique de deux chaînes de poly-méthacrylate reliées par l'éthylène diméthacrylate comme agent de réticulation B) Monolithe à base de butyl méthacrylate (d'après [123]) C) Monolithe à base d'éthylène glycol méthacrylate, méthyl méthacrylate et de glycidyl méthacrylate (d'après [139]).

La synthèse de ces monolithes, est d'autant plus aisée [121, 139] que ces monolithes sont facilement fonctionnalisables.

CONCLUSIONS

Même si des types de colonnes très divers existent actuellement, les colonnes remplies de particules restent les plus employées. Ces colonnes présentent un certain nombre d'atouts, en particulier une très grande variété de phases stationnaires disponibles commercialement. D'autre part, ces phases ont des structures et des propriétés très bien connues. Pour la compréhension des mécanismes de l'ECC, les colonnes capillaires remplies de phase stationnaire particulière restent particulièrement attractives. Toutefois, la fabrication délicate et la fragilité des colonnes remplies de phase stationnaire continuent à porter préjudice à ce type de colonne, bien que des progrès importants aient été réalisés pour améliorer le remplissage et l'immobilisation de la phase stationnaire.

Les colonnes monolithiques connaissent un grand essor actuellement, en particulier les colonnes capillaires remplies par des monolithes à base de silice ou à base de polymères organiques type poly-méthacrylate. Elles répondent à un certain nombre de problèmes rencontrés avec les colonnes remplies de particules, en particulier, elles ne nécessitent pas de frittés et sont d'un remplissage beaucoup plus aisé. En revanche, la structure du monolithe doit être parfaitement maîtrisée. Il paraît nécessaire de s'assurer de la distribution de pores du monolithe et de son homogénéité. Si les phases monolithiques ont déjà démontré de très grandes possibilités en ECC, les monolithes connaîtront très probablement une période d'étude et de caractérisation importante avant d'arriver à maturité, comme les phases stationnaires particulières à base de silice en leur temps.

CHAPITRE III

PHASES STATIONNAIRES MIXTES EN ELECTROCHROMATOGRAPHIE CAPILLAIRE

INTRODUCTION [148,149]

Les phases stationnaires à polarité de phases inversée furent les premières employées en ECC du fait de leur très large utilisation en CLHP et de la vaste gamme de phases stationnaires particulières commerciales disponible. Mais les silices greffées, à polarité de phases inversée, proposées actuellement sur le marché sont souvent conçues pour limiter les interactions des groupements silanols résiduels du support silice et la plupart subissent un traitement également appelé « end capping » pour bloquer ces fonctions. Aussi ces phases stationnaires se caractérisent souvent par un nombre très faible de charges à leur surface et donc par un FEO très faible en ECC [3], en particulier quand les analyses sont réalisées en conditions acides pour limiter les phénomènes d'adsorption sur les silanols résiduels. La même faiblesse du flux se rencontre avec des phases stationnaires monolithiques non chargées. Souvent, une mise sous pression des colonnes, ou pECC, est nécessaire pour accélérer les analyses [54, 150]. Mais comme nous l'avons exposé, l'usage d'une pression auxiliaire entraîne la perte du profil plat des vitesses et engendre une perte des nombreux atouts de l'ECC. De plus, certains auteurs observent une rétention encore trop élevée en pECC pour des composés faiblement chargés [62, 151]. D'autre part, des problèmes de mouillabilité sont rencontrés en ECC avec les phases stationnaires à polarité de phases inversée [152, 153].

Une alternative originale a consisté à ajouter aux phases mobiles des tensio-actifs chargés tels que le sodium dodécyle sulfate qui, en interagissant avec une phase stationnaire hydrophobe de type Hypersyl, crée des charges qui vont être responsables d'un FEO [154].

Pour obtenir des phases chargées sans adjonction de tensio-actifs, des phases comportant un grand nombre de silanols ont été envisagées [55, 155], mais les problèmes inhérents à la présence des silanols demeurent : le FEO est très variable d'une analyse à l'autre, il est dépendant du pH, et l'adsorption des composés basiques qui entraîne de larges traînées de pics demeure une limitation majeure [3].

Une autre stratégie consiste à recourir à des phases stationnaires dites « mixtes », chargées. Les phases mixtes se caractérisent par la coexistence de groupements polaires et de groupements hydrophobes à leur surface [156]. Ces phases mixtes ont été développées en premier lieu pour la CLHP. Elles sont alors proposées d'une part pour leur propriété intéressante de mouillabilité qui permet de travailler avec de très forts pourcentages d'eau dans la phase mobile [157] et d'autre part parce qu'elles permettent de masquer les silanols résiduels (Fig. 33) [158]. Le masquage des silanols résiduels peut s'effectuer soit par répulsion électrostatique des analytes soit par des interactions entre le groupement polaire de la phase stationnaire et les silanols.

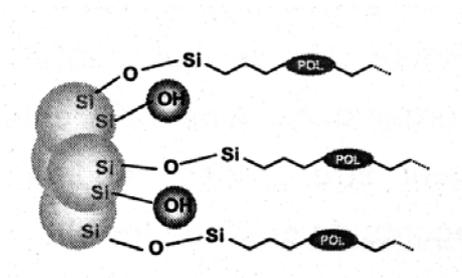


Figure 33 : **Représentation schématique de la surface d'une silice greffée mixte** d'après [158]

En ECC, l'intérêt se porte sur les phases mixtes qui portent un groupement ionisable ou ionisé pour assurer un FEO assez intense et des groupements apolaires (classiquement des chaînes alkylées linéaires) pour assurer la rétention selon un mécanisme de partage à polarité de phases inversée.

Nous présenterons dans ce qui suit les phases stationnaires chargées de manière covalente en excluant les revêtements par adsorption ou par greffage de colonnes capillaires creuses qui relèvent de l'ECC sur colonne capillaire creuse.

I LES DIFFERENTS TYPES DE PHASES STATIONNAIRES MIXTES

Nous considérons comme phases "mixtes", les phases comportant deux types de fonctions, l'une polaire, l'autre apolaire. Les phases stationnaires mixtes existent sous forme de monolithes ou de phases particulières, elles sont traditionnellement scindées en deux catégories qui présentent par ailleurs des caractéristiques chromatographiques différentes en CLHP [156].

- les phases où les groupements polaires et apolaires sont greffés côte à côte sur le support de la phase stationnaire. Nous parlerons de phase stationnaire mixte de type I. Les phases mixtes particulières de type I présentent généralement un end-capping polaire (Fig. 34 A), sur les silanols de la silice.
- les phases avec un groupement polaire inséré dans un greffon hydrophobe, le plus souvent une chaîne alkyle. Nous parlerons de phase stationnaire mixte de type II. (Fig. 34 B)

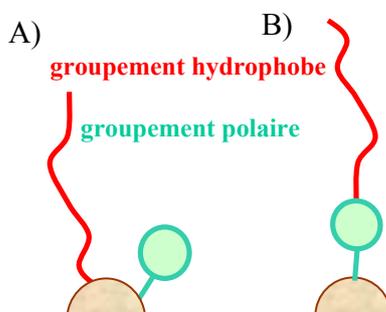


Figure 34 : **représentation schématique des deux types de phases stationnaires mixtes**, A) avec un end-capping chargé B) avec une groupement chargé interne au greffon hydrophobe.

Des deux familles de phases stationnaires mixtes, les phases de type I sont les plus proches, par leur rétention en CLHP, des phases à polarité de phases inversée [156]. Les phases stationnaires mixtes de type II se distinguent particulièrement en CLHP des phases conventionnelles par une rétention préférentielle des composés donneurs de liaisons H et une rétention amoindrie pour les composés accepteurs de liaisons H et les espèces ionisées. La plupart des phases mixtes se caractérisent par la présence de groupements chargés ou ionisables au sein de groupements apolaires permettant d'assurer de manière prédominante un partage à polarité de phases inversée. Cependant, des phases mixtes hydrophiles ou échangeuses d'ions ont parfois été décrites [151, 159, 160] mais restent d'un emploi assez rare ou se trouvent souvent assimilées à des phases échangeuses d'ions.

Le cas des phases stationnaires monolithiques est plus complexe. Elles présentent souvent plusieurs fonctions sur un même squelette qui peut être plus ou moins hydrophobe et elles peuvent inclure des greffons chargés pour assurer un FEO assez intense. Ainsi, lors de la séparation des analytes, le squelette du polymère et les fonctions participent à la séparation. Ces phases stationnaires présentent à leur surface une grande variété de fonctions, liées à la synthèse du monolithe. Par exemple, Bedair et El Rassi [161] décrivent un monolithe possédant à la fois des groupements ester, hydroxyl, mais aussi des fonctions ammonium quaternaire et des chaînes alkylées C₁₇. Les monolithes peuvent être considérés comme des phases mixtes dans de nombreux cas, mais le type des fonctions présentes et leur répartition sont très variables dans ces monolithes [162] et semblent souvent beaucoup moins bien définis que pour les phases stationnaires particulières.

Notons que pour les phases stationnaires monolithiques d'ECC, un nouveau type de greffage mixte a été récemment proposé par Hilder, Svec et Fréchet [64], qui consiste en une première couche de greffons chargés, suivi d'un second greffage de la phase stationnaire avec des greffons alkyles. La structure répond donc à la définition d'une phase stationnaire mixte de type I, mais la position des charges dans une couche bien localisée et sous-jacente à la couche alkylée semble plutôt caractériser une phase stationnaire mixte de type II.

Pour simplifier cette partie, nous avons fait le choix d'exclure de ce chapitre les colonnes encore un peu exotiques qui possèdent un "gradient" de greffage, c'est-à-dire qui présentent une évolution du type de greffons présents tout le long de la colonne. De même ne seront pas traités dans ce qui suit les aspects concernant les colonnes possédant un flux annulaire, c'est-à-dire ayant les

charges localisées au niveau de la paroi du capillaire et avec une phase stationnaire neutre au centre de la colonne [163].

Les phases mixtes comportant un groupement anionique sont les plus répandues, nous les évoquerons rapidement et nous développerons ici davantage les phases stationnaires mixtes cationiques, qui sont particulièrement attractives pour l'analyse de composés basiques.

II PHASES MIXTES COMPORTANT DES GROUPEMENTS ANIONIQUES

Les phases mixtes anioniques sont très majoritairement des phases de type I, comportant des groupements acides sulfoniques. Cette prédominance a été confortée par l'apparition des phases monolithiques, en particulier dans le cas des monolithes à base de poly-méthacrylate [62, 125, 144, 145, 162, 164-166], où il suffit d'introduire du 2-acrylamide-2-méthyl-acide propane sulfonique (Fig. 35) lors de leur synthèse pour disposer d'une phase chargée. Mais ce type de groupement a aussi été introduit sur des monolithes à base de poly-acrylamide [134, 137] ou sur des particules de silice [116]. Dans ces différents cas, les greffons hydrophobes sont dissociés de l'acide sulfonique, et l'on s'approche donc des phases mixtes de type I. Le plus souvent pour une facilité de fabrication, les greffons hydrophobes mis en jeu sur monolithe à base de poly-méthacrylate sont de petite taille (groupements méthyl, butyl ou hexyl [137]), mais quelques tentatives ont été effectuées pour employer des chaînes plus longues comme les C12 [125, 167].

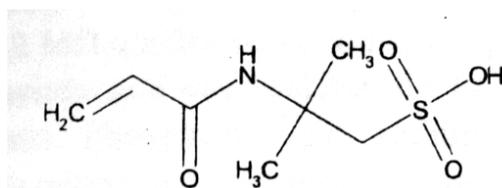


Figure 35 : Structure du 2 acrylamide-2-méthyl-acide propane sulfonique

En théorie, les groupements acides sulfoniques sont ionisés quelque soit le pH. Les résultats présentés par Steiner et Lobert [116] donnent l'évolution du FEO en fonction du pH, sur des phases silice, C6, C18, une phase échangeuse de cations et deux phases mixtes dotées de greffons C 6 et C18 (Fig. 36). Aux pH acides, les phases porteuses d'acides sulfoniques ont bien un flux beaucoup plus intense que les phases normales et inverses. Toutefois, une baisse de 25 % du FEO lors d'un passage de pH 8,5 à pH 4,6 est enregistrée avec ces phases mixtes.

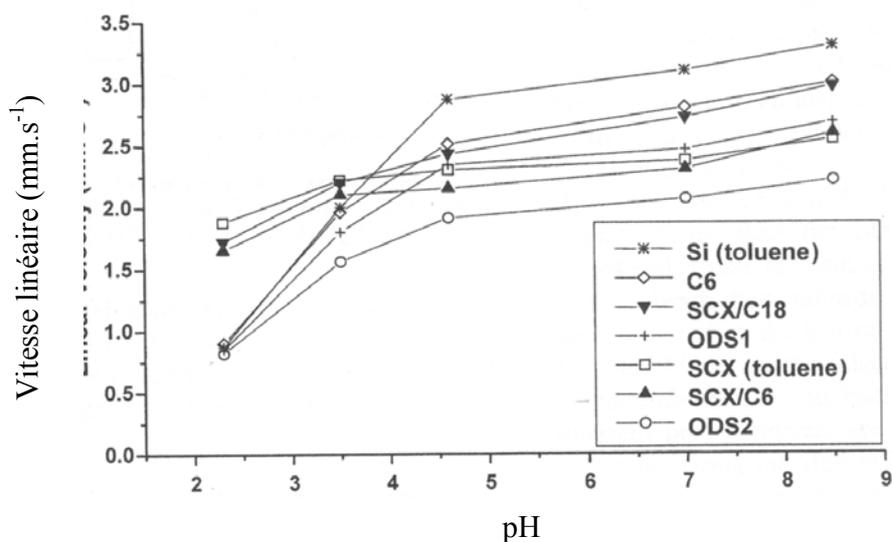


Figure 36 : Influence du pH sur le FEO sur différentes phases stationnaires. Colonne 100 μm \times 25/33 cm, phase mobile : tampon phosphate 20 mM/ ACN 30/70 (v/v), tension : 29,7 kV, marqueur de flux thiourée, ou toluène, détection : 214 nm, injection électrocinétique : 5 kV, 5 s, 25°C, pression de 5 bar sur les flacons de phase mobile (d'après [116]).

Le FEO reste donc dans ce cas légèrement sensible au pH de la phase mobile [52]. D'autres auteurs cependant observent des variations plus faibles (moins de 11% pour des variations de pH de 2,5 à 6,5 [62]) voire non significatives [10, 125]. On invoque pour expliquer ces variations, l'évolution de l'ionisation des silanols résiduels présents sur les parois du capillaire [62] ou encore l'adsorption de composés positifs sur les groupements chargés de la phase stationnaire.

Mais l'inconvénient majeur de ces phases reste les interactions qui peuvent avoir lieu entre ces phases chargées négativement et des composés basiques. Ces interactions peuvent entraîner des phénomènes d'élargissement des pics [168, 169] comme c'est déjà le cas en présence de silanols résiduels sur des phases conventionnelles. Des peptides avec de fortes charges positives peuvent ne pas être élués du tout [52, 116]. Hindocha et Smith [168] n'observent ainsi aucun pic pour des composés pharmaceutiques basiques, tels que la nortriptyline, amytriptyline, en conditions acides (tampon phosphate pH 2,5, 20 mM/ACN, 80/20, (v/v)) et sur une phase monolithique à base de méthacrylate et doté d'acides sulfoniques [168]. Pour résoudre ce problème d'adsorption les auteurs transposent leurs analyses sur une phase monolithique greffée cationique.

Sur une phase Spherisorb C₁₈-acide sulfonique, les peptides les plus fortement chargés positivement sont élués en dernier, du fait d'interactions électrostatiques avec la phase stationnaire et ce, malgré la forte molarité en tampon de la phase mobile (Fig. 37) [52]. Une hausse de la concentration en tampon dans la phase mobile peut diminuer les interactions électrostatiques, mais les phénomènes d'échauffements dus à l'effet Joule limitent cette stratégie. De plus, d'importants bruits de fond et des analyses non reproductibles sont à craindre [137].

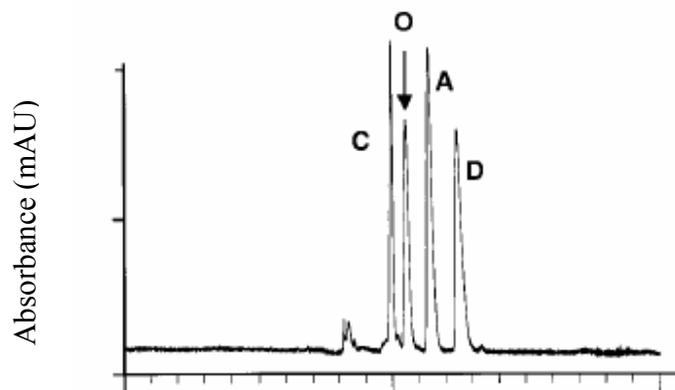


Figure 37 : Séparation de peptides sur une phase Spherisorb C18/SCX. Phase mobile :100 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ pH 2,5/ACN 50/50 (v/v), tension 15 kV, rampe de tension 0,1 min, détection 214 nm, 10 bar à chaque extrémité du capillaire, Desmopressin (D), peptide A (A), oxytocine (O), carbetocine (C) d'après [52]

Une solution consiste à se placer à pH neutre ou basique. Ainsi Throckmorton *et al.* [165] effectuent des analyses de peptides à pH 8,5, Ping *et al.* [166] et Wu *et al.* [62] celles de dérivés de l'aniline respectivement à pH 12 et 7, sans noter d'élargissement particulier des pics.

Toutefois, l'utilisation de phases stationnaires anioniques reste délicate dans le cas d'analyses de composés basiques car des phénomènes d'échanges d'ions se superposent à ceux de partage en polarité de phases inversée et conduisent à d'importantes pertes d'efficacité.

III PHASES MIXTES COMPORTANT DES GROUPEMENTS CATIONIQUES

Du fait d'interactions électrostatiques très intenses, l'emploi d'une phase stationnaire mixte chargée positivement semble la seule réelle issue pour l'analyse de composés basiques [170] et surtout de biomolécules [161]. Mais ce type de phases génère un FEO anodique, ainsi, à pH acide, la mobilité électroosmotique et la mobilité électrophorétique des composés basiques sont opposées. Le FEO doit donc être suffisamment intense pour assurer la migration et l'élution de tous les analytes.

Les phases stationnaires mixtes, particulières ou monolithiques, comportant un groupement cationique, sont très généralement dotées d'un ammonium quaternaire, portant une chaîne alkyle C2, C4, C6, C8 [122, 171, 172], C12 [171], C17 [161] ou C18 [124, 172]. Ces greffons sont soit obtenus par greffage après synthèse du support de phase stationnaire [122], soit par une co-polymérisation utilisant des monomères comportant déjà les greffons d'intérêt [173]. Pour les monolithes, une fabrication en une seule étape est bien sûr très attractive, mais les greffons alors introduits jouent

grandement sur la polymérisation et donc sur la structure du monolithe, ce qui complique la mise au point du procédé de polymérisation.

Peu de phases de type I sont reportées dans la littérature, les études reportées sur les phases à base de particules de silice [174] ou sur monolithe [170] ne comportent que des chaînes alkyles de faibles longueurs (C6, C2) et présentent des mécanismes à la fois de partage à polarité de phases inversée et d'échange d'ions.

En ce qui concerne les phases stationnaires de type II, Gusev et al [122], ont synthétisé des monolithes à base de poly-styrène, et de chlorure de vinylbenzyle, ensuite greffés par des groupements N,N diméthyl-octylamine. La phase stationnaire permet d'analyser un mélange de polypeptides, de 8 à 10 acides aminés, acides et basiques à pH 3, sans élargissement notable des pics (Fig. 38).

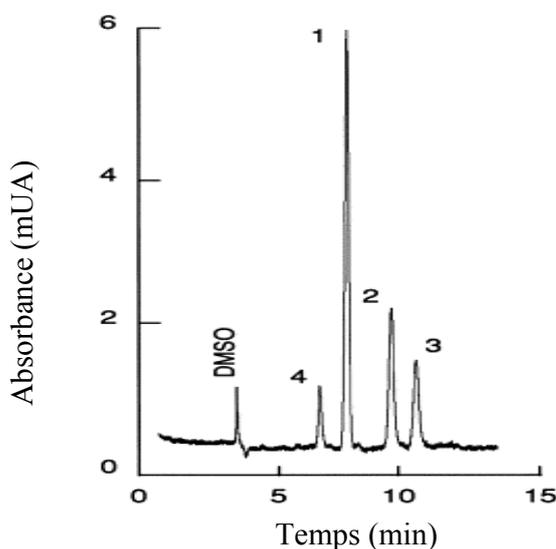


Figure 38 : Electrochromatogramme de polypeptides acides et basiques sur monolithe cationique. Colonne :75 μm \times 21/31 cm, monolithe à base de polystyrène divinylbenzène greffé avec des groupements ammonium quaternaire, et chaîne octyle; phase mobile, 50 mM NaCl dans un tampon phosphate 5 mM pH 3,0/ACN 75/25 (v/v), tension, -15 kV, injection électrocinétique 2 s, 5kV, (1) angiotensine II, (2) angiotensine I, (3) [Sar¹, Ala⁸]-angiotensine II, (4) insuline; concentration des analytes 4 mg/ml dans le tampon d'analyse. D'après [122]

Mais les auteurs relèvent une sélectivité non basée sur le caractère hydrophobe des composés, mais plutôt sur l'acidité des composés. Les auteurs attirent l'attention sur la complexité des phénomènes séparatifs : le FEO et les mobilités électrophorétiques sont opposés, et des phénomènes de répulsion coulombiennes doivent être également pris en compte. De plus, il conviendrait peut-être d'ajouter les interactions des peptides avec les chlorures résiduels. Ce type de complication est visualisé par l'allure des courbes montrant l'effet du pourcentage d'ACN sur le temps de rétention des polypeptides (Fig. 39).

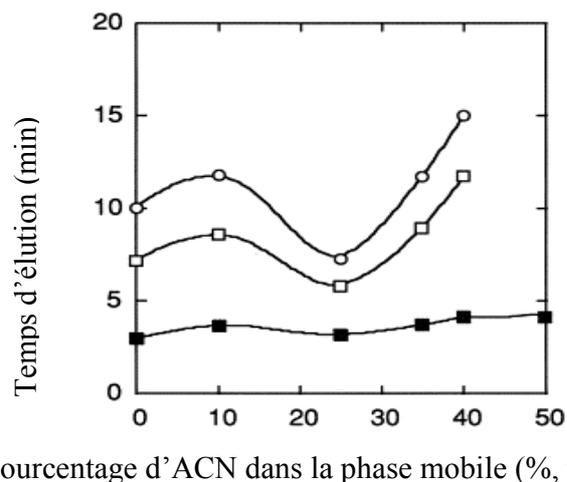


Figure 39 : Evolution du FEO et des temps d'éluion des peptides en fonction du pourcentage d'ACN dans la phase mobile sur un monolithe cationique. Concentration des échantillons : DMSO (■) à 2 µl/ml, angiotensine II (□) angiotensine I (○) à 2 mg/ml dans la phase mobile, autres conditions voir Fig. 38, d'après [122]

Yang et El Rassi [175] ont proposé, dès 2000, des colonnes remplies de phase stationnaire qu'ils greffent avec de l'octadécyle diméthyl (3-triméthoxysilyl propyl) ammonium pour obtenir le groupement C18 et pour à la fois limiter les silanols résiduels et augmenter l'homogénéité des groupements présents à la surface de la silice du capillaire et des billes (Fig. 40).

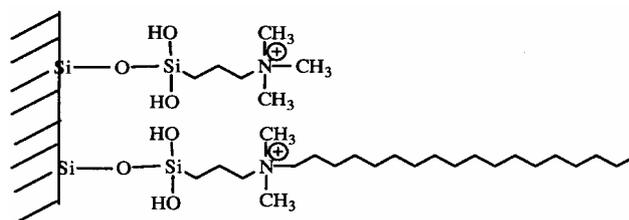


Figure 40 : Exemple de phase stationnaire mixte cationique sur particules, d'après [175]

Dans le cas de cette phase stationnaire, le FEO varie toujours avec le pH, ce que les auteurs expliquent par un grand nombre de silanols résiduels et par une grande influence de la paroi interne du capillaire, ce qui semble indiquer tout de même un faible taux de greffage. Sur des composés neutres tels que des alkyles de benzène, la séparation se fait bien selon le caractère hydrophobe des analytes, mais cette phase stationnaire se révèle beaucoup moins rétentive qu'une ODS traditionnelle. Cette faible rétention entraîne une baisse de sélectivité pour les 9 herbicides dérivés de l'urée, la séparation restant satisfaisante (Fig. 41).

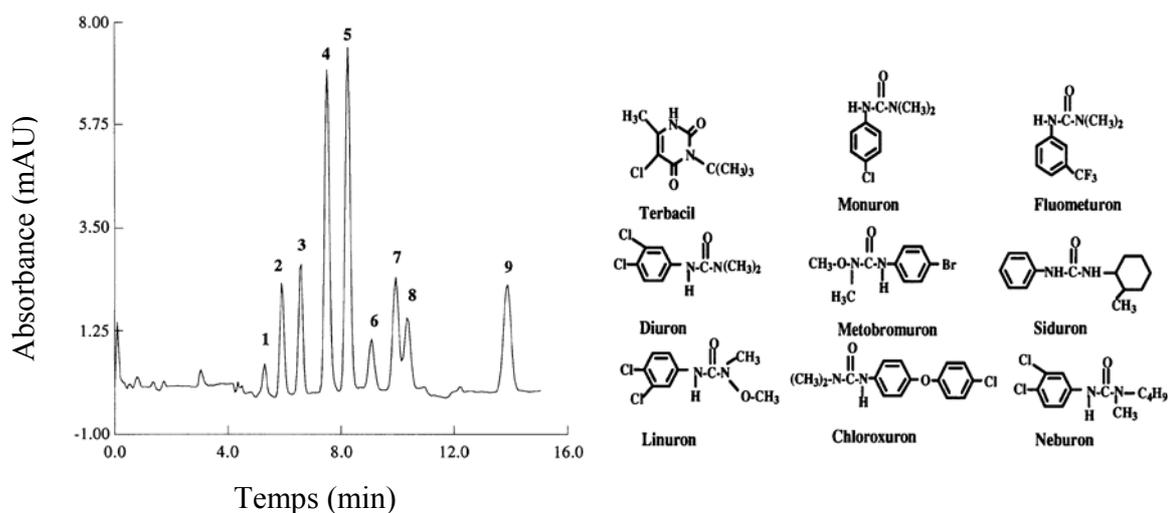


Figure 41 : Electrochromatogramme d'herbicides dérivés de l'urée sur phase particulaire greffée ammonium-octadécyle. Colonne : 100 μm \times 24/32 cm, phase stationnaire Zorbax, 5 μm , 150 \AA , phase mobile : tampon phosphate 5 mM, pH 6/ACN, 50/50, v/v, 1 :terbacil, 2 : monuron, 3 : fluometoron, 4 : diuron, 5 : metobromuron, 6 : siduron, 7 : linuron, 8 :chloroxuron, 9 : neburon, détection à 254 nm, tension : -20 kV, (d'après [175]).

Toutefois les analyses effectuées sur cette phase présentent de plus faibles efficacités ; cette baisse d'efficacité est attribuée à l'existence de greffons de charges différentes et opposées à pH 6 et donc aux FEO opposés qu'ils génèrent.

A coté de ces phases présentant un grand nombre de silanols résiduels et de groupements chargés non souhaités et parasites, Hayes et Malik [176] ont synthétisés un colonne monolithique à base de sol-gel, portant un greffage de type II (ammonium quaternaire-C18) et un end-capping avec des groupements phényle (Fig. 42). Grâce à cette phase, les auteurs ont pu analyser un mélange d'aldéhydes et de cétones.

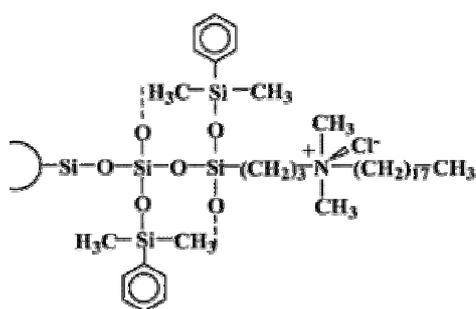


Figure 42 : Exemple de phase stationnaire mixte cationique avec "end-capping" sur une structure sol-gel, d'après [176]

Les différentes phases stationnaires mixtes avec un ammonium quaternaire inséré dans une chaîne que nous avons évoquées présentent rarement la stabilité escomptée du FEO en fonction du pH, souvent du fait de silanols résiduels. D'autre part, la présence de groupements autres que des chaînes alkyles (silanol, chlorure....) entraîne souvent des phénomènes d'échanges d'ions et généralement des

réentions plus faibles sont observées par comparaison à celles obtenues sur des phases octadécyle classiques.

Pour pallier ces inconvénients, Zhang *et al.* [172] en 2002, ont envisagé de travailler sur des billes de polyméthacrylate, ce qui élimine le problème lié aux silanols résiduels, et Kornyšova *et al.* préconisent l'emploi de monolithe à base de méthacrylate [173].

En dehors de ces phases comportant des ammoniums quaternaires sertis, d'autres types de greffons ont été envisagés. Kitagawa *et al.* [50] ont développé sur particules de silice un greffage original présenté à la figure 43, A) qu'ils étudient par pECC. Les auteurs rencontrent des difficultés pour estimer la mobilité électroosmotique du fait de l'existence d'une portion remplie et d'une portion creuse dans la colonne capillaire, de plus nous pouvons envisager que la pression appliquée masque, au moins partiellement, les phénomènes électrocinétiques. Toutefois malgré ces réserves, le FEO présente la particularité d'être quasiment nul pour une polarité positive et significativement plus intense pour une polarité négative [Fig. 43 B)] avec une phase mobile Na₂HPO₄ 20mM/méthanol, 40/60, v/v. Les auteurs expliquent cette dissymétrie par une modification de la densité de charges à la surface des particules en fonction de la tension appliquée. Ils considèrent que la tension négative accélère à la fois la protonation de l'ammonium et la dissociation des silanols. De plus les silanols seraient plus affectés par la mise sous tension dans les conditions d'analyse reportées.

Malgré l'absence de preuves sur les hypothèses avancées par les auteurs, cette étude présente l'intérêt de souligner la complexité des phénomènes rencontrés sous tension, avec une phase mixte, comportant des charges positives aux cotés de silanols résiduels.

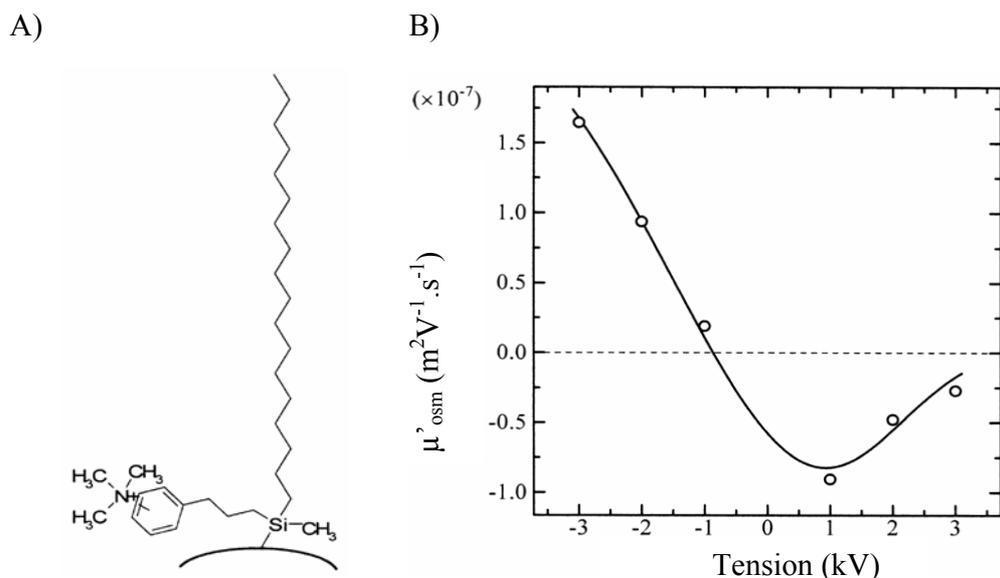


Figure 43 : Cas d'une phase mixte portant des groupements cationique et alkyle sur une même atome de silice A) schéma du greffon sur des particules de silice, B) Effet de la différence de potentiel et de son sens sur la mobilité électroosmotique estimée lors d'analyse par pECC, capillaire : 100 μm d.i., longueur utile 12 cm, longueur totale 20,4 cm, phase mobile : Na₂HPO₄ 20 mM/ méthanol 40/60 pression 60 kgf/cm, marqueur de flux : uracil adapté de [50].

Parallèlement aux phases portant directement les greffons hydrophobes et chargés, Scherer et Steiner [177] ont synthétisé en 2001 des polymères, greffés sur des billes de silice Spherisorb, et portant eux-mêmes les chaînes C18 et des ammoniums quaternaires. La figure 44 présente ces deux types de chaînes polymères, qu'il est possible de copolymériser.

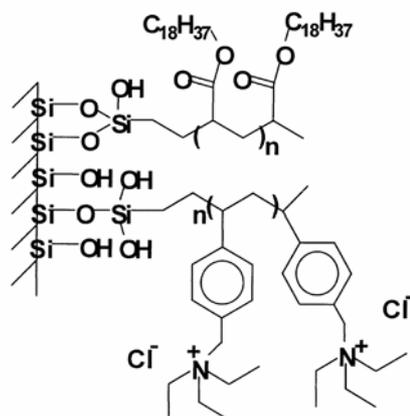


Figure 44 : Greffons polymériques mixtes échangeur d'anions et de partage à polarité de phases inversée, d'après [177]

Le FEO sur ces phases décroît aux pH neutres et alcalins, en tampon phosphate 5mM, probablement du fait de la présence de silanols résiduels qui contre balancent le flux anodique à ces pH. Cependant, un effet de la nature du tampon lui-même et une adsorption irréversible des espèces H_2PO_4^- et HPO_4^{2-} peut aussi expliquer ce comportement. D'autre part, cette phase, comparée à une phase particulière de type II, comportant une ammonium quaternaire et une chaîne C18 (phase Stability BS-C23), indique un caractère "échangeur d'ions" beaucoup plus prononcé, sans doute du fait de la plus grande accessibilité de l'ammonium.

La charge des greffons présentés est liée à la présence d'un ammonium quaternaire, mais elle peut aussi provenir d'un groupement ionisable selon les conditions d'analyses [42, 65, 168, 178]. Huang *et al.* [178] emploient une phase stationnaire mixte à base de silice greffée, comportant des chaînes C18 et des groupements dialkylamine en pECC. L'amine permet d'avoir un FEO stable dans les conditions acides, mais décroît dès pH 6. Un monolithe à base de méthacrylate, comportant une amine tertiaire [Fig. 45, A]) a été synthétisé par Zhang *et al.* [65] et par Szucs et Freitag [42]. Zhang *et al.* observent bien un flux anodique, suffisamment intense (mobilité électroosmotique apparente de $3 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$ à pH 2,5) pour entraîner les peptides et les protéines analysés et qui décroît avec une augmentation du pH [Fig. 45, B)]. Cette phase permet bien une séparation selon un partage à polarité de phases inversée en ECC, puisque l'ordre de sortie des protéines analysées (ribonucléase A, insuline, α -lactalbumine, myoglobuline), est identique à celui obtenu en CLHP dans les mêmes conditions

acides (phosphate pH 2,5, 60mM/ACN, 70/30, v/v) par chromatographie à polarité de phases inversée. Les travaux de Szucs [42] ont indiqué les mêmes tendances pour un même type de phase.

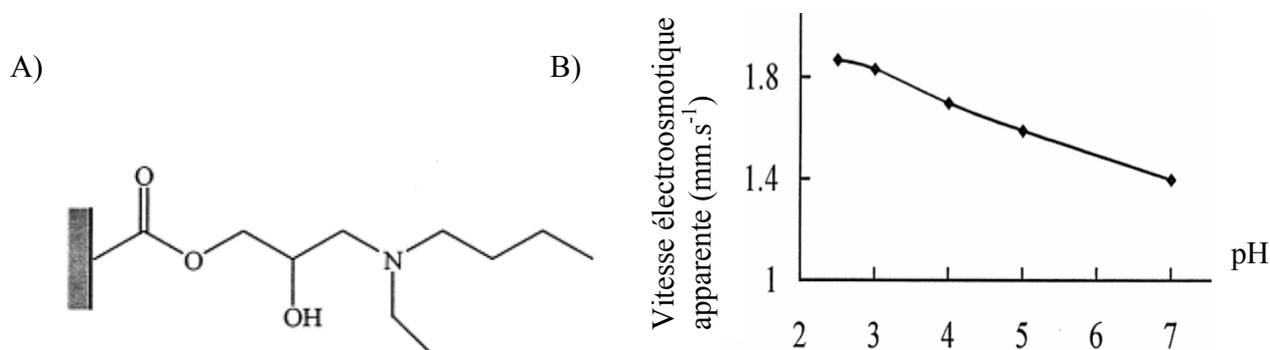


Figure 45 : A) Monolithe poreux portant un groupement glycidyl fonctionnalisé par le N-éthylbutylamine B) Effet du pH sur la vitesse électroosmotique apparente. Colonne : 50 μm d. i., 375 μm d. e., lg totale : 39 cm, lg utile : 29 cm, monolithe copolymère de glycidyl méthacrylate, méthyl méthacrylate, éthylène glycol diméthacrylate, N ethylbutyl amine, tampon phosphate 60 mM pH 2,5 à 7, tension -25 kV, 25°C, détection à 214 nm, DMSO comme marqueur de flux, injection DMSO 2 $\mu\text{l/ml}$ -2 kV, 1 s d'après [65].

La compréhension des phénomènes de séparation est limitée par une méconnaissance des phases stationnaires. En effet, un certain nombre de phases stationnaires mixtes sont disponibles commercialement, mais les fournisseurs ne donnent pas toujours toutes les indications nécessaires, en particulier en ce qui concerne la nature du groupement polaire et presque jamais le taux de greffage des différents groupements. Et bien entendu, comme en CLHP, les phases stationnaires mixtes, disposant des mêmes greffons présentent des propriétés différentes selon les fabricants, et avec une même valeur de FEO, des ordres de rétention différents sont observés [63]. La densité de charges à la surface de la phase stationnaire a un effet sur les séparations. Walhagen et Unger [63] incriminent d'ailleurs ce paramètre pour expliquer les différences d'ordre d'éluion observées pour des peptides très basiques en condition acide, en présence de phosphate triéthylammonium sur des phases stationnaires de deux fabricants différents mais possédant les mêmes types de greffons et présentant une même valeur de FEO (Fig. 46).

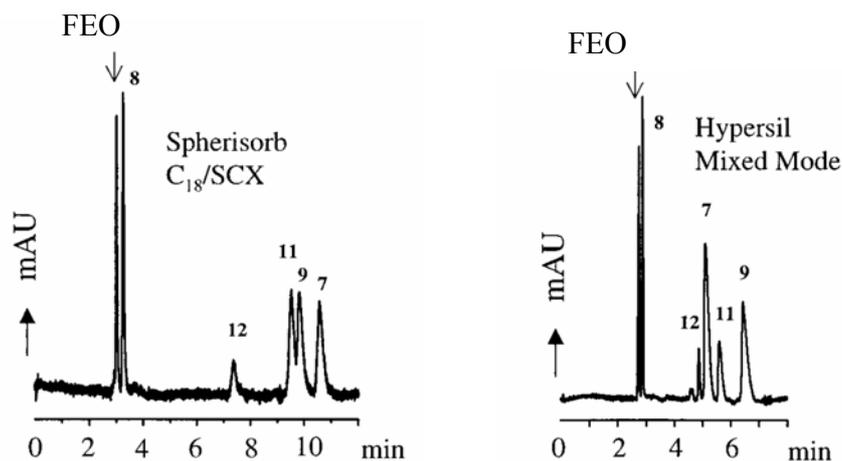


Figure 46 : Comparaison de l'ordre d'élution de cinq peptides sur deux phases stationnaires mixtes présentant par ailleurs un FEO identique et les mêmes types de greffons chargés et hydrophobes. Colonne : 100 μ m d. i., lg totale 33,5 cm, lg remplie 25 cm, particules de 3 μ m de diamètre, eau/ phosphate de triéthylammonium 38 mM/ACN 1/1/3 (v/v), analyses effectuées à 25 kV, 20°C, 10 bar exercés sur les flacons d'entrée et de sortie d'après [63]

Ainsi les phases stationnaires mixtes, de type I ou II ont déjà permis de surmonter le premier obstacle, en ce qui concerne la possibilité de générer un FEO suffisamment intense et de limiter l'influence du pH sur ce FEO. L'introduction de greffons cationiques dans les phases mixtes permet par ailleurs de diminuer l'adsorption de composés basiques. Cependant, les mécanismes de séparation restent variés (échange d'ions, partage à polarité de phases inversée) et souvent difficiles à découpler des mécanismes d'électromigration. Des études plus approfondies sont à entreprendre pour être capable de prédire la rétention des composés en ECC.

Si le concept de phases mixtes commence à se développer pour les colonnes monolithiques en ECC, jusqu'à présent aucun travail ne fait état de l'emploi de phases stationnaires mixtes particulières de type II et possédant un groupement chargé pour réaliser des analyses de peptides en ECC. Ces phases stationnaires commencent pourtant à être disponibles sur le marché sous la forme de colonnes pour la CLHP. Au début de ma thèse la seule phase stationnaire mixte particulière et chargée commerciale était cationique : il s'agissait de la Stability BS (CIL-Cluzeau). Cette gamme de phases mixtes cationiques s'est élargie à trois longueurs différentes de greffons : C13, C17 et C23. Ces phases ayant été introduites en 2000-2001, aucune étude fondamentale et peu d'applications avaient été reportées dans la littérature. Les principales caractéristiques de ces phases que j'ai étudiées lors de ma thèse seront présentées dans la partie expérimentale. Depuis, d'autres phases à base de silice greffées, comme les gammes Primsep (Interchim) sont apparues, celles-ci se déclinant en phases mixtes anioniques (Primsep A) et cationiques (Primsep B). L'étude de ces phases en ECC représente donc une voie d'investigation encore largement inexplorée.

CHAPITRE IV

CARTES PEPTIDIQUES

PAR

ELECTROCHROMATOGRAPHIE CAPILLAIRE

INTRODUCTION

Les analyses de peptides peuvent aussi bien relever de la peptidomique, qui correspond à la cartographie des différents peptides présents dans un organisme, tissu ou cellule à un temps donné, que de l'identification ou du contrôle d'une protéine par digestion de celle-ci et identification de ses fragments peptidiques. Les mélanges peptidiques issus de prélèvements biologiques ou de digestion de protéines, sont particulièrement complexes à analyser : les peptides peuvent présenter des structures très proches et des masses molaires, des hydrophobies et des points isoélectriques très variés. Protéines et peptides sont très rarement neutres et présentent des régions hydrophobes, de plus ils peuvent adopter des conformations particulières qui caractérisent leur structure secondaire et tertiaire. La combinaison de groupements ionisables et de fonctions hydrophobes rend l'ECC particulièrement attractive pour l'analyse de ces composés. De plus, la SM étant souvent requise pour pouvoir identifier les peptides, l'ECC présente des possibilités de couplage aisé avec la SM [61].

Divers revues traitent, au moins partiellement de l'application de l'ECC à l'analyse de peptides et de protéines [1, 61, 117, 179-185]. Parmi les travaux présents dans la littérature, la grande majorité se réfère à l'analyse de mélange de peptides synthétiques, rarement des peptides de plus de 5 à 6 acides aminés. Le nombre d'études consacrées à des mélanges de peptides de plus de 6 acides aminés ou à des mélanges issus de la protéolyse de protéine est beaucoup plus restreint.

Cette partie bibliographique est précisément dédiée aux mélanges "complexes" de peptides ; nous nous limiterons donc, à l'analyse des fragments peptidiques issus de la digestion de protéines. En revanche, en raison du nombre relativement faible de publications à ce sujet, nous traiterons aussi bien des analyses effectuées par ECC que celles réalisées par des techniques dérivées (pECC, ECC sur colonne capillaire creuse, ECC sur support gravé).

Le tableau II énumère, pour ces méthodes, les différentes conditions d'analyse de protéines digérées, qui sont reportées dans la littérature jusqu'à ce jour. Différentes méthodes ont été employées, en premier lieu la pECC, très généralement réalisées avec un gradient d'élution. L'ECC sur colonnes capillaires creuses et sur support gravé a également été exploité et finalement quelques essais ont été réalisés en ECC sur colonnes remplies, principalement monolithiques.

I ELECTROCHROMATOGRAPHIE CAPILLAIRE PRESSURISEE (PECC)

Les premières analyses de digestion de protéines ont été réalisées par chromatographie assistée par électrophorèse [54, 57, 150, 186, 187]. Ces travaux se caractérisent par l'emploi de phases stationnaires à base de particules de silice greffées octadécyle, et, pour assurer une séparation satisfaisante, l'emploi d'un gradient d'élution pour les mélanges peptidiques les plus complexes. Le choix du type de phase stationnaire dérive directement des phases employées en CLHP pour le même type d'analyse.

Ces premières analyses ont été réalisées en conditions acides (addition d'acide trifluoroacétique de 0.04 à 0.1 % dans la phase aqueuse ou tampon phosphate pH 2,5 à 3) pour limiter l'adsorption des peptides sur les silanols résiduels de la phase stationnaire. Ces conditions entraînant une très faible ionisation des groupements silanols impliquent aussi un FEO très faible. Mais les essais réalisés à pH légèrement plus élevé de 3 à 4, avec un mélange de TFA et d'hydroxyde d'ammonium pour l'analyse d'une digestion trypsique de la β lactoglobuline A bovine, engendrent l'élargissement des pics de peptides (Fig. 47) [57].

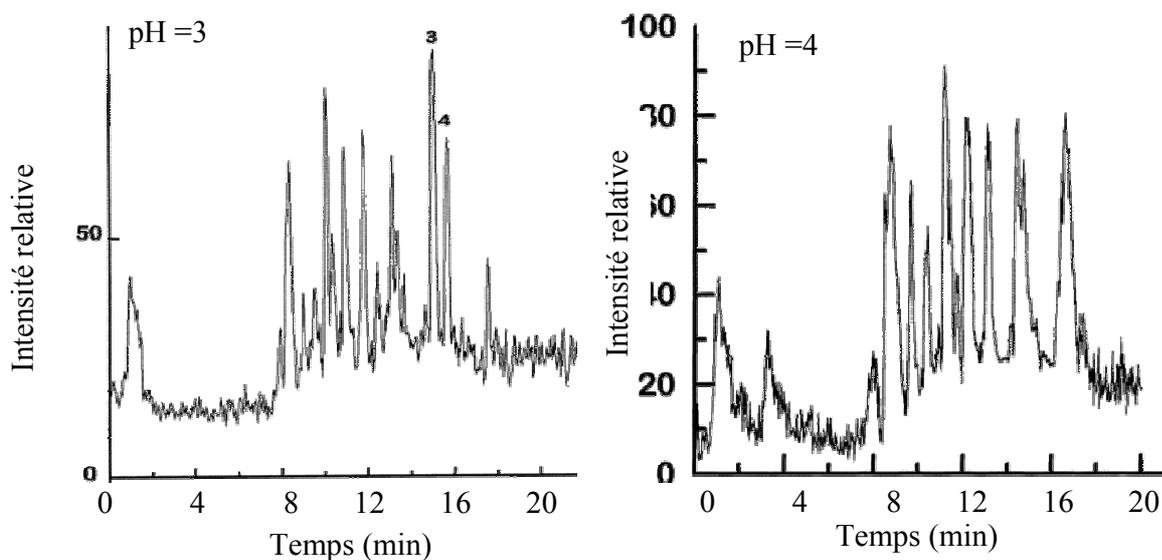


Figure 47 : Influence du pH sur les électrochromatogrammes de la digestion trypsique de la β lactoglobuline A bovine. Colonne : capillaire 360 d. e., 180 μ m d.i., longueur de la colonne 6 cm, phase stationnaire : C18, 3 μ m (Vydac), gradient : eau (solvant A) /ACN (solvant B) : 0.04% TFA dans les solvants A et B, 0% de B à 75% de B en 30min, 1,5 kV, débit 200 μ L min⁻¹ (80 bars), Injection : 1,5 μ L à 5. 10⁻⁶ M A) pH= 3 B) pH = 4, pH ajusté par adjonction d'hydroxyde d'ammonium ajouté dans les phases A et B (d'après [57]).

Dans ces séparations l'utilisation d'une pressurisation permet d'avoir un débit stable et assez élevé pour éviter des analyses trop longues. De plus, pression et tension étant des paramètres

totallement indépendants, les auteurs ont souligné la possibilité d'ajuster l'amplitude de ces deux paramètres avec beaucoup de liberté pour obtenir les séparations désirées [188].

Ces études réalisées en pECC ont démontré les possibilités de l'ECC pour l'analyse de mélanges complexes de peptides qui se traduisent par (i) un gain de temps significatif par rapport aux analyses par CLHP (cartes peptidiques réalisées en moins de 15min contre 45 à 90 min en CLHP classique [150]) et (ii) un gain de sélectivité (Fig 48).

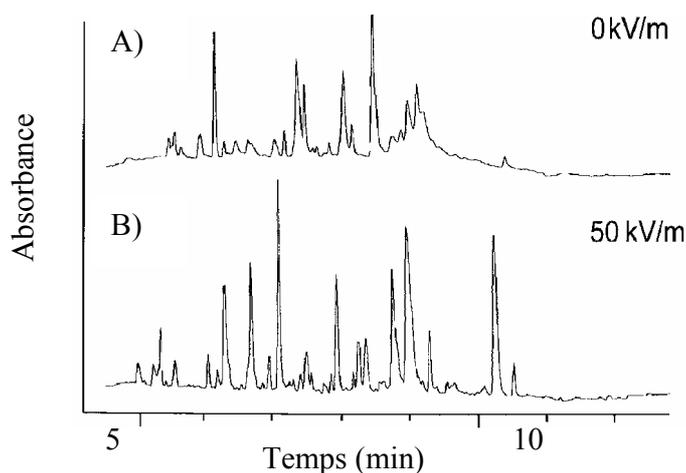


Figure 48 : Effet de la tension sur la sélectivité lors d'analyse par nano-CLHP d'une digestion trypsique de cytochrome c. Colonne : 100 μm d. i., 360 d.e. lg remplie 6 cm, lg tot 20 cm, phase silice greffée C18, 1,5 μm , 100 \AA , (Gromsil ODS-2) Injection : 20 μL a 2mg/mL, détection : 210 nm phases mobiles : A :eau 0,1 % TFA, B :50/50% eau 0,1 % TFA /ACN, gradient : B 0-100 % en 10 min, 1 $\mu\text{L min}^{-1}$. A) nano CLHP B) pECC 12kV, 250 bar, 98 μA , d'après [150]

D'autres phases stationnaires que les phases greffées octadécyle ont été testées ultérieurement. Huang *et al.* [178] ont employé une phase stationnaire mixte octadécyle et un groupement dialkyle amine. Par comparaison avec une phase stationnaire greffée octadécyle, une différence de sélectivité a été obtenue, les efficacités sont similaires, en revanche la stabilité du FEO pour des pH allant de 2,5 à 5, permettrait un choix plus libre du pH.

Une phase stationnaire hydrophile amide a été testée par Nakashima *et al.* [189] pour séparer les peptides par interactions hydrophiles (mode de chromatographie "HILIC"). Ce mode, appliqué à l'analyse d'un mélange de digestion trypsique de l'albumine de sérum bovin, entraîne cependant des analyses assez longues (de 20 à 40 minutes en conditions acides).

Bien que l'emploi de la pression permettent d'accélérer les analyses, il entraîne un profil parabolique des vitesses et donc fréquemment une perte d'efficacité. D'autre part, il est très difficile de prédire la rétention des peptides et l'influence des phénomènes commandés par la pression et par l'électrophorèse [150], les contributions n'étant pas additives [61].

Les analyses présentées ci-dessus sont davantage des "variantes" de la CLHP que de l'ECC à proprement parler, ceci est particulièrement vrai pour les analyses réalisées en gradient d'élution. En fait, la mise sous tension lors de l'analyse de mélanges peptidiques ne permet souvent qu'une légère modulation de la rétention chromatographique [54, 57, 186] (Fig 49). Appfel *et al.* [186] d'ailleurs n'utilisent une mise sous tension que sur une période bien précise de l'analyse, pour augmenter la résolution de quelques peptides difficiles à séparer.

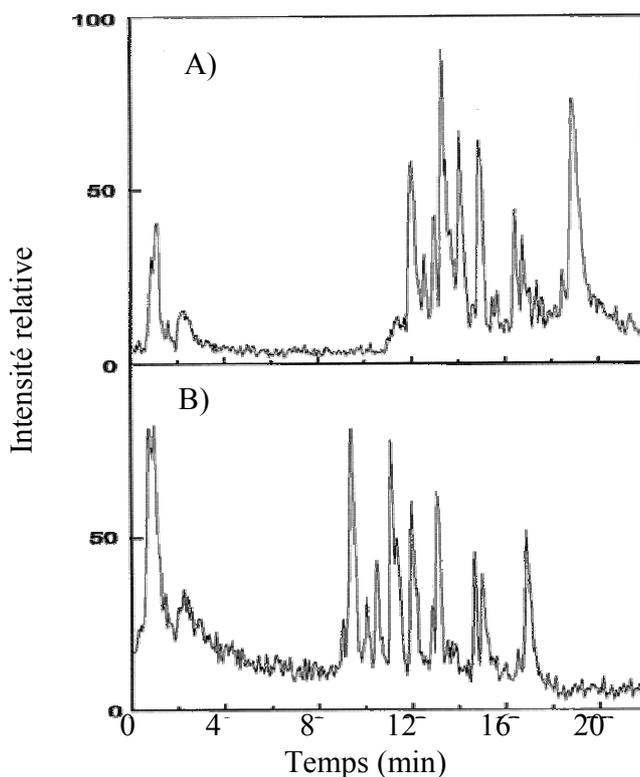


Figure 49 : Comparaison des chromatogrammes et electrochromatogramme de digestion trypsique de β lactoglobuline bovine en nano-CLHP et en pECC à pH=2,4, A) Nano-CLHP B) pECC, 1,2 kV, voir figure n°47 pour les autres conditions, d'après [57].

Le principale inconvénient de la pECC est de nécessiter des appareils spécialement dédiés (Fig. 50), permettant une mise sous pression de la colonne allant jusqu'à 250 bar [150] et la possibilité de créer un gradient d'élution.

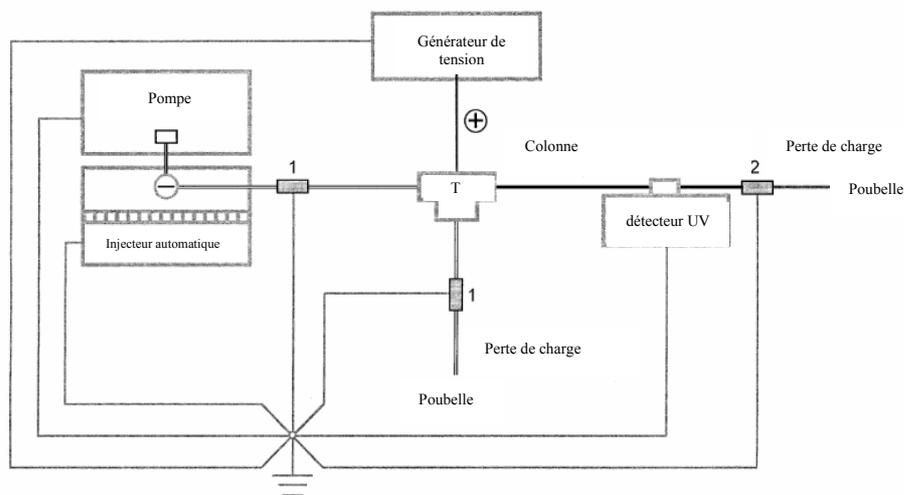


Figure 50 : Exemple de dispositif permettant de réaliser l'électrochromatographie pressurisée, (1) filtre (2) union en acier inoxydable d'après [150]

Ces dispositifs expérimentaux assez lourds, entraînent une complication de la mise au point, et introduisent de nouveaux facteurs de dispersion. Ainsi Zhang *et al.* [188], sur le même type de dispositif, démontrent que le volume de la chambre de mélange utilisée pour les gradients a une influence significative sur l'efficacité des analyses de peptides par gradient d'élution. Pour Nakashima *et al.* [189] qui utilisent d'un diviseur de débit, le flux varie au cours du gradient et divers auteurs [139] attirent l'attention sur la très faible robustesse de ces méthodes.

II ECC SUR COLONNES CAPILLAIRES CREUSES ET ASSIMILES

II.1 ECC sur colonnes capillaires creuses

Les premières applications d'ECC ne nécessitant pas de mise sous pression, ont été réalisées sur colonnes capillaires creuses [190, 191], directement connectées à un spectromètre de masse *via* une source d'ionisation électrospray. Les deux types de colonnes sont dotés de phases stationnaires mixtes pour assurer un FEO important. De ce fait, les cartes peptidiques sont réalisées en moins de 6 minutes, mais aussi, probablement en raison de la faible capacité de pics des colonnes creuses.

Le travail de Wu *et al.*, réalisé en 1997 [190], utilise une phase mixte "côte à côte", octyle et amine, qui limite l'adsorption des peptides, mais nécessite encore un gradient pour assurer leur séparation (non pressurisé). Ces analyses sont trois fois plus rapides que celles effectuées sur le même mélange en pECC [178], mais conduisent à une moins bonne résolution (Fig. 51).

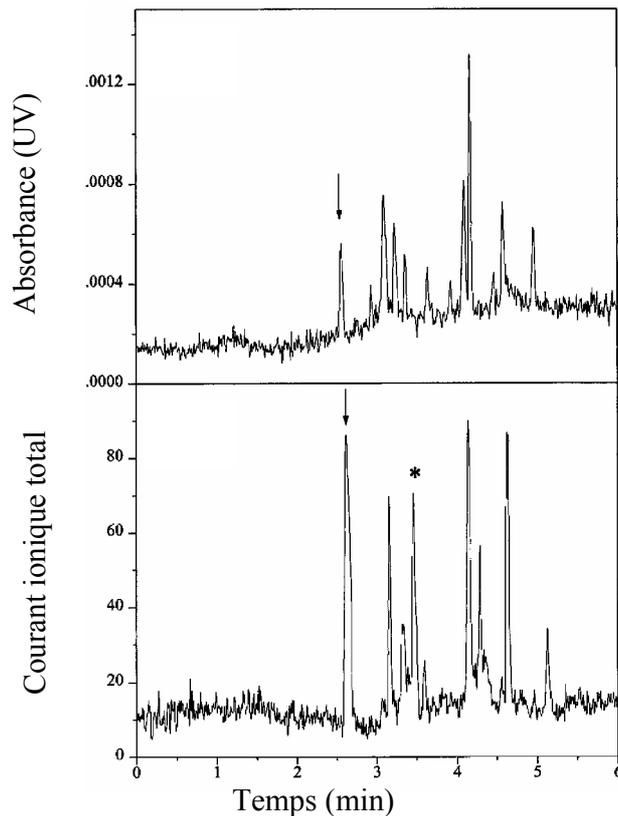


Figure 51 : Analyse de la digestion de myoglobuline cardiaque chevaline par ECC sur colonne capillaire creuse avec gradient d'élution, capillaire 9 μm d. i., 150 μm d.e., lg 35 cm, lg tot 40 cm, parois recouvertes de sol-gel greffé octyl et amine, Injection : -2 kV pendant 5 s, Détection : 214 nm, vitesse d'acquisition du spectromètre de masse 8 Hz. Conditions d'analyse : gradient 0-35 % de B en 6 min avec A : acétate d'ammonium 5 mM, pH 2,5, TFA 0,05 %, B : 80/20 ACN/ acétate d'ammonium 5 mM, pH 2,5, TFA 0,05 % -14kV, d'après [190].

En 2004, Johannesson *et al.* [191] utilisent une phase mixte contenant un groupement C18 et un groupement serti ammonium et greffée sur les parois du capillaire de silice. Ils démontrent que cette phase non seulement limite les phénomènes d'adsorption des peptides sur les silanols résiduels, mais qu'elle permet également d'analyser des peptides aussi bien acides que basiques (pI 3,92 à 9,75), hydrophobes qu'hydrophiles. En revanche, les auteurs n'identifient en SM que 32% des pics attendus pour la digestion de l'albumine bovine. Ils incriminent le protocole de préparation de l'échantillon et la faible quantité injectée pour expliquer ce faible recouvrement.

Les analyses sur colonnes capillaires creuses à phase stationnaire mixte, sont rapides, mais nécessitent impérativement un couplage à un spectromètre de masse car les peptides sont généralement mal séparés et les analyses souffrent des faibles capacités d'injection de ce type d'ECC.

II.2 ECC sur support gravés ou COMOSS

La seconde approche envisagée pour l'établissement de cartes peptidiques par ECC sans pressurisation est l'emploi de supports gravés, ou « Collocate monolith Support Structures » ou COMOSS en anglais [192-194]. Ce type de support présente des réseaux de canaux (par exemple

canaux rectangulaire de $10\ \mu\text{m}$ sur $1,5\ \mu\text{m}$ [193]) sur les parois desquels est greffée la phase stationnaire (Fig. 52). Ces structures ne sont cependant employées que pour des séparations sur puces.

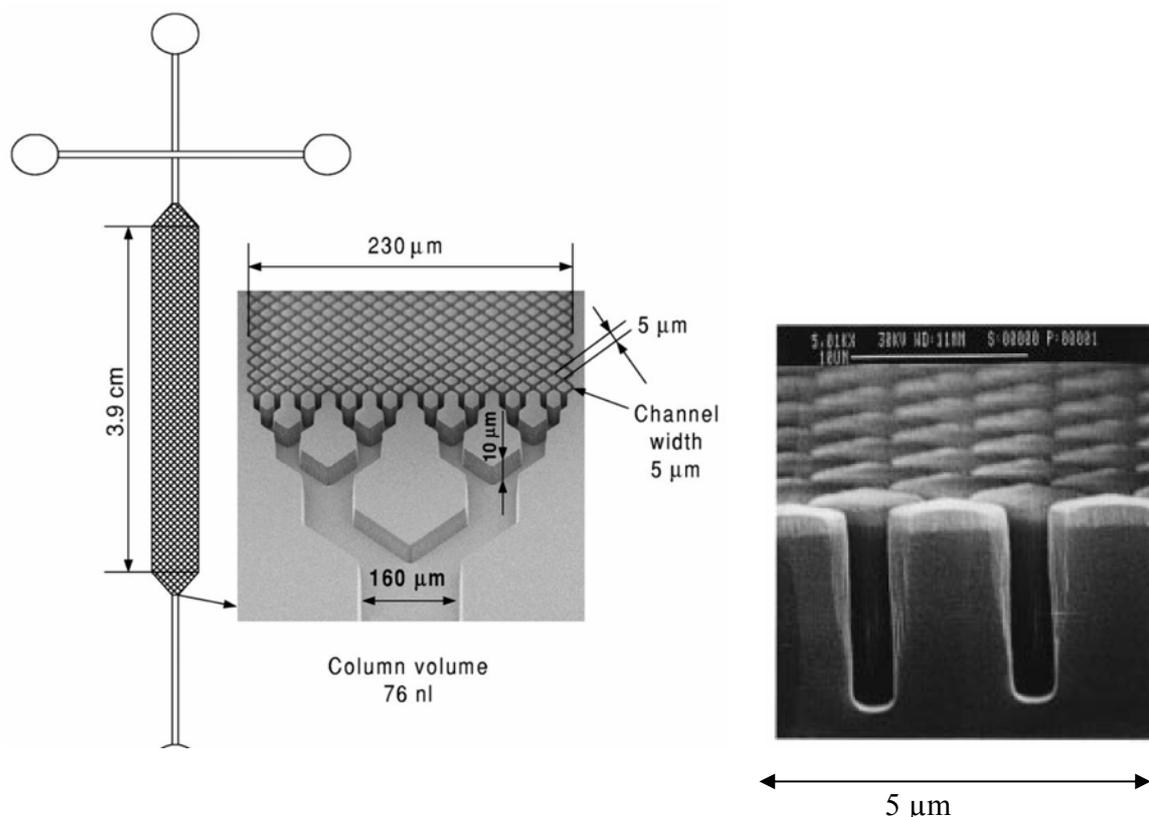


Figure 52 : Exemple de système d'analyses sur support gravé ou COMOSS A) Schéma du système et dimensions (d'après [192]) B) MEB d'une plaque de quartz gravée (d'après [195])

Ces systèmes séparatifs présentent cependant une faible surface spécifique, ce qui entraîne une très faible rétention et ont sans doute les mêmes types de limitations que les colonnes capillaires creuses. Les analyses sont très rapides, de 100s à 600s, mais manquent souvent de résolution [Fig. 53].

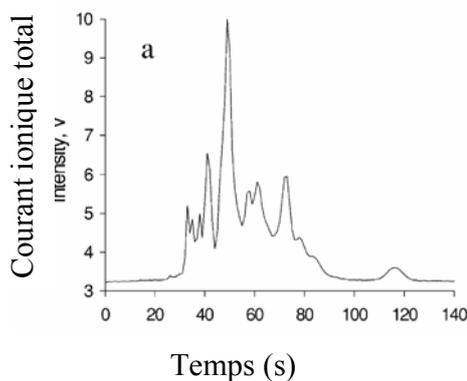


Figure 53 : Carte peptidique d'une digestion d'albumine de sérum bovin marquée par l'isothiocyanate de fluorescéine sur système "COMOSS" greffée C_{18} , 1kV, phase mobile : tampon carbonate 1 mM, phosphate pH 7, 500V/cm (d'après [194]).

Il est toujours envisageable, étant donné les faibles rétentions observées que le phénomène séparatif soit un simple phénomène d'électrophorèse, hypothèse que He *et al.* [193] essaient de réfuter. Enfin, ces analyses sur puce nécessitent une détection fluorimétrique, avec toutes les contraintes que cela entraîne.

Ainsi malgré la facilité d'emploi des colonnes capillaires creuses et le fort potentiel des supports gravés pour les analyses sur puce, les tentatives d'analyser par ces méthodes des digestions de protéines restent très peu nombreuses. Les exemples présentés soulignent, de plus, les problèmes de séparations et de détection des peptides, rencontrés.

III ECC SUR COLONNES REMPLIES

Divers auteurs se sont attachés à analyser les protéines et les peptides, directement par ECC sur colonnes remplies sans aucune pression auxiliaire [139, 151, 196].

Pour assurer un FEO suffisant pour entraîner tous les peptides vers la détection, toutes les phases testées sans pression auxiliaire, sont porteuses de charges. Ohyama *et al.* [151] mettent en œuvre des séparations sur une phase stationnaire portant une fonction sulfonique (Fig. 54).

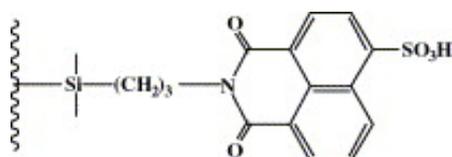


Figure 54 : Schéma du greffon 3-(4-sulfo-1,8-naphtalimido)propyl, d'après [151]

Ce type de phase peut engendrer des effets hydrophobes, des interactions électrostatiques et π - π . La concentration en tampon s'est révélée particulièrement discriminante pour l'analyse de la digestion du cytochrome c, avec un tampon phosphate pH 3,8, puisque le passage de 20 à 50 mM entraîne une réduction du temps d'analyse de 120 à 20 minutes et une amélioration de la séparation (Fig. 55).

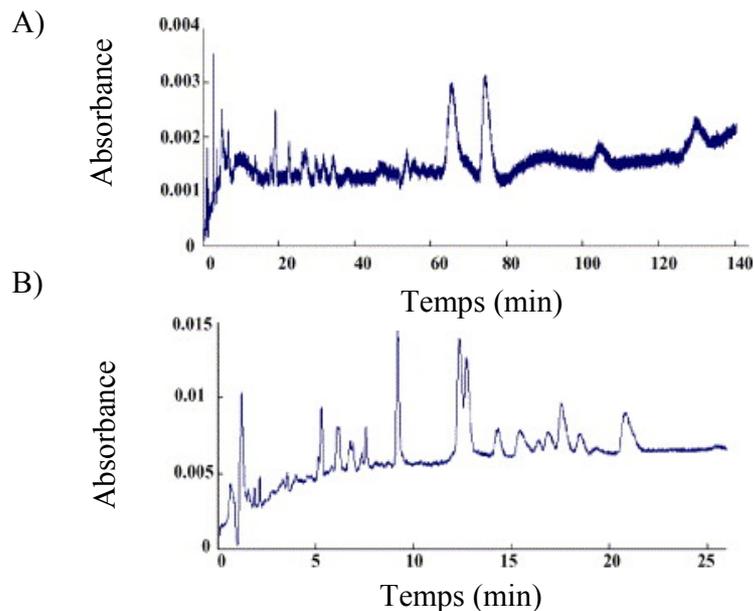


Figure 55 : Effet de la concentration en tampon sur la séparation de la digestion tryptique de cytochrome c. Colonne: 75 μm d. i. 375 μm d. e. longueur efficace 9 cm, longueur totale 37 cm, phase stationnaire (voir Fig. 54) 3 μm ; phase mobile : tampon phosphate (pH 3.8)/méthanol: 60/40 (v/v, %), 18°C A) 20 mM (27 μA); B) 50 mM (95 μA); 20 kV; injection, 20 kV pendant 10 s, solution à 5mg/ml en protéine, détection 205 nm (d'après[151])

Le mécanisme d'échange d'ions semble donc prépondérant, et les interactions avec la phase stationnaire particulièrement fortes. De fait, cette phase permet d'obtenir de meilleures résolutions que celles obtenues par Adam *et al.* [187] ou Nakashima *et al.* [189] en pECC sur phase octadécyle et amide pour le même mélange. Cependant les efficacités, quoique non précisées par les auteurs, semblent assez faibles, et les analyses restent longues. Les molarités supérieures à 50mM qui diminueraient encore la rétention et accéléreraient les analyses ne sont pas évoquées, peut être du fait de l'effet Joule souvent invoqué en ECC d'échange d'ions [184]. Les auteurs envisagent des gradients par paliers de concentration pour des mélanges de peptides standard, mais n'ont pas testé ces gradients sur les cartes peptidiques.

Les trois autres phases stationnaires reportées dans la littérature en ECC pour l'analyse de protéines digérées, sont des phases monolithiques, deux copolymères de vinylbenzène et d'éthylène glycol diméthacrylate pour Zhang *et al.* [196] et Rathore *et al.* [197] et un polymère à base de méthacrylate pour Ivanov *et al.* [139].

Zhang *et al.* utilisent un monolithe greffé par un ammonium quaternaire portant des chaînes butyle et éthyle. Ils observent un FEO comparable à celui obtenu en ECZ et indépendant du pourcentage d'acétonitrile. Cette indépendance peut être mise à profit pour faire varier finement la sélectivité de ces analyses réalisées en mode isocratique, comme les auteurs le démontrent pour un mélange d'angiotensines et d'insuline.

Les auteurs ont étudié également l'effet de la température sur les analyses et ont démontré que le passage de 25 à 55°C permet d'accélérer l'analyse de la carte peptidique du cytochrome c en conditions acides, en passant d'une durée d'analyse de 9 à 6 minutes, sans perte de résolution (Fig°56).

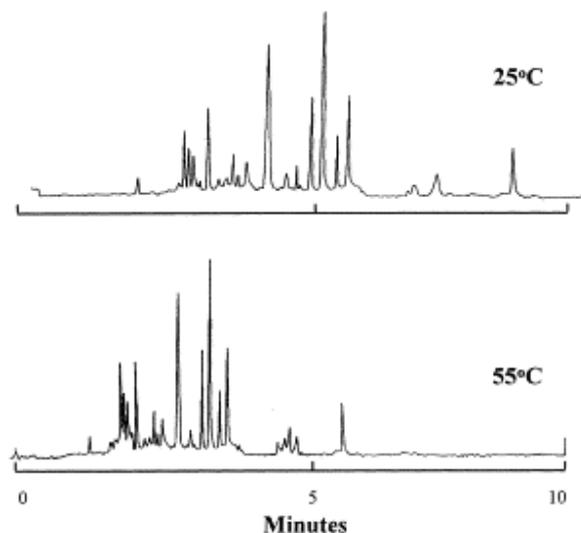


Figure 56 : Effet de la température sur la séparation des fragments de la digestion trypsique de cytochrome c en ECC sur un monolithe phase mixte Colonne : 75 µm d. i., 375 d. e., longueur efficace 30 cm, longueur totale 40 cm, polymère à base de poly-styrène portant des ammonium quaternaire; phase mobile : 40/60% ACN/ tampon phosphate 50 mM, pH 2.5, -30 kV; détection, 214 nm. A) 25°C, B) 55°C d'après [196]

Très récemment, Rathore *et al.* [197] a effectué l'analyse de digestion trypsique de l'hormone de croissance humaine avec une colonne comportant un flux annulaire, il s'agit d'une colonne dont le centre est rempli par un monolithe portant des nano-tubes de carbone (single wall carbon nanotube), mais qui comporte un greffage préliminaire du capillaire. Ce greffage (par une silanisation du capillaire avec fixation de polyéthylène imine) génère un FEO au niveau des parois du capillaire qui entraîne la phase mobile dans toute la colonne [184]. Cet autre type de colonne permet aussi une analyse sans pression auxiliaire. Ils ont démontré en particulier la nécessité de dessaler l'échantillon [Fig.°57]. Les auteurs n'indiquent pas de taux de recouvrement, ni d'efficacité concernant ces peptides, mais 18 peptides sont attendus pour une digestion trypsique théorique, leur analyse ne montre pas plus d'une dizaine de pics, peut être du fait d'une limite de détection trop élevée, de perte de peptides lors du dessalage, mais aussi très probablement du fait de coélutions.

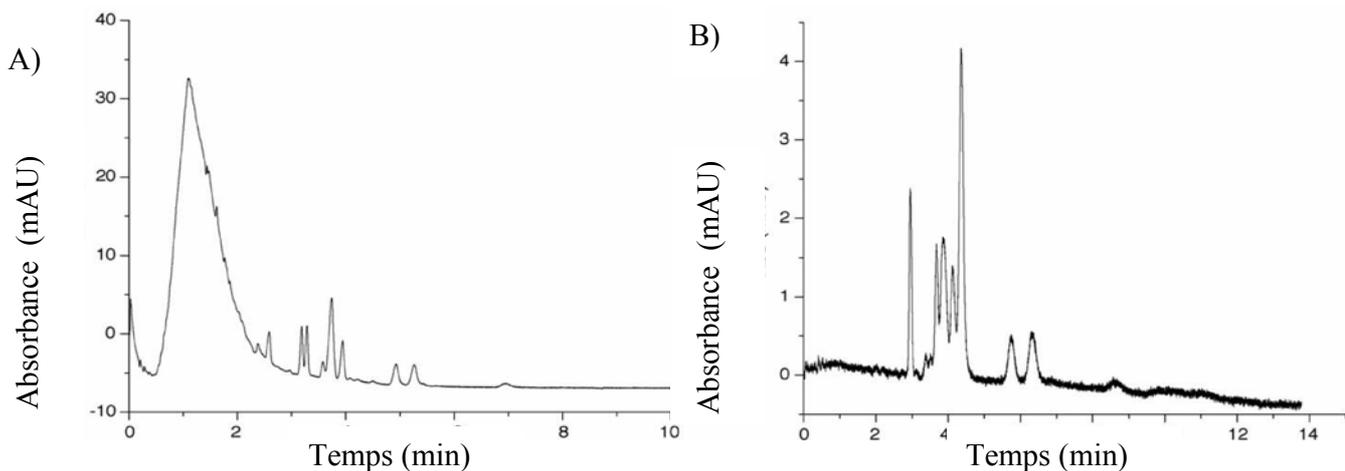


Figure 57 : Analyses de digestion tryptique de l'hormone de croissance humaine par ECC sur un monolithe "mixte" PVB-EGDM-NC à greffage annulaire cationique, Colonne : 75 μm d.i., 375 μm d.e., longueur d'analyse 22,5 cm, longueur totale 31 cm, monolithe de polyvinyl benzène et d'éthylène glycol diméthacrylate, greffage annulaire des parois du capillaire de 3-glycidoxypropyltriméthoxysilane pour la silanisation et de polyéthylène imine, greffage du monolithe central de nano tubes de carbone, tension d'analyse : -20 kV, phase mobile : tampon phosphate de sodium 20 mM, pH 2,5/ACN, 80/20, (v/v), détection : 214 nm, d'après [197]

Par ailleurs, Ivanov *et al.* [139] ont pu réaliser une carte peptidique du cytochrome c, en ECC en 20 min, sans pression auxiliaire et en mode isocratique sur une phase portant un greffon de type N,N éthyl butyl amine. En revanche, pour l'albumine de sérum bovin qui donne plus de 100 peptides après digestion, les auteurs ont recours à la pECC et à un gradient d'éluion. Ils obtiennent un recouvrement de séquence peptidique de plus de 70% en moins de 5 minutes pour cette protéine (Fig.°58 gradient I).

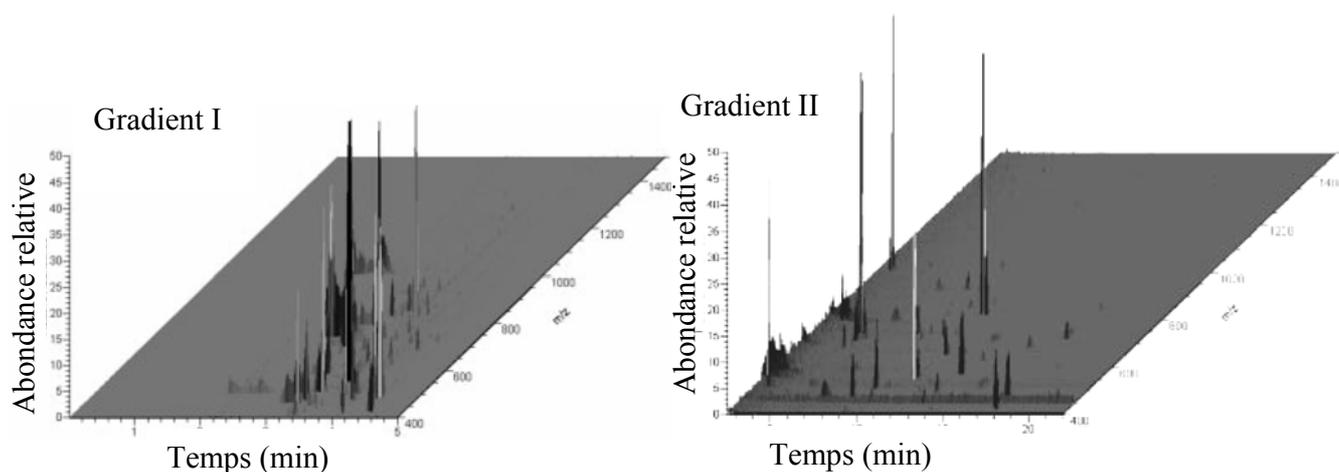


Figure 58 : Analyses de digestion trypsique d'albumine de sérum bovin par pECC-SM sur monolithe à base de méthacrylate, Colonne : 50 μm d. i., 365 μm d. e., longueur 22,5 cm, monolithe à base de méthacrylate, fonction éthyl, butyl amine , phase A : acide acétique 0,1 % dans l'eau, B) acide acétique 0,1 % dans l'ACN, gradient I : 0 min 5% de B-10 min 30 % de B, débit : 180-185 nl/min, tension : 755V/cm, gradient II : 0 min 5% de B-20 min 30 % de B, débit : 60-65 nl/min, tension : 533V/cm (d'après [139])

Ils corrèlent ces bons résultats à la très bonne efficacité de la colonne, en particulier à la très faible résistance au transfert de masse et considèrent que les charges positives portées par la phase

stationnaire évitent un trop grand élargissement des pics. Leurs recherches prouvent aussi la possibilité d'effectuer des analyses plus lentes pour obtenir une meilleure résolution des pics (Fig.°58 gradient II), indispensable pour l'analyse de fragments peptidiques issus de protéines de masse plus élevée.

Le tableau II résume l'ensemble des analyses de fragments générés par protéolyse de protéines et réalisées par ECC ou techniques dérivées. Comme nous l'avons vu, toutes les cartes peptidiques, à l'exception de celles réalisées sur support gravé, ont été établies en milieux acide (TFA en solution aqueuse, tampon phosphate) pour analyser des peptides cationiques et protoner les silanols résiduels. Ce choix permet de limiter les phénomènes d'adsorption, souvent observés avec ce type de composés. Le TFA est par ailleurs utile, puisqu'il forme des paires d'ions avec les peptides cationiques, favorisant d'une part leur rétention et limitant d'autre part les traînées de pic.

La majorité des analyses a été effectuée sur des phases stationnaires particulières C18 identiques à celles employées en CLHP et ont toutes nécessité une pressurisation et la mise en œuvre de gradients d'élution [54, 57, 150, 178, 186, 187, 198]. Pour les cartes peptidiques, comme dans les autres domaines, les équipes de recherche tentent de s'affranchir de la pression auxiliaire, des contraintes liées aux gradients d'élution tout en essayant de réduire les temps d'analyse. L'ECC sur colonne capillaire creuse a très vite montré ses limites pour la séparation de mélanges complexes de peptides, en raison de sa faible capacité de pic [190,191]. Il a fallu attendre l'introduction de phases mixtes pour parvenir à réaliser des cartes peptidiques en ECC sans aucune pression auxiliaire, au moins pour des mélanges constitués de quelques dizaines de peptides. La littérature fait état de quelques applications dans ce domaine, essentiellement sur phases monolithiques, mais les phases proposées sont encore peu nombreuses et assez "exotiques" [151, 197]. Et, comme le montre le travail d'Ivanov *et al.* [139], lorsque le mélange devient plus complexe le recours à un gradient d'élution et à une pECC est indispensable. L'ECC montre donc ses capacités pour des analyses rapides de cartes peptidiques, mais les cartes de centaines de peptides sont encore difficiles à atteindre.

L'arrivée de phases particulières possédant une charge comme celle sur laquelle nous avons réalisé le travail de thèse a ouvert une nouvelle voie de recherche pour réaliser de l'ECC sur colonne remplie sans pressurisation, tout en disposant de groupements C18, capables d'assurer une rétention des peptides. Les travaux entrepris dans le cadre de ma thèse ont donc consisté à explorer les possibilités de ces "nouvelles phases stationnaires particulières et mixtes" pour la réalisation de cartes peptidiques et d'en comprendre les limites.

Tableau II : Cartes peptidiques réalisées ECC et techniques dérivées

Mode d'analyse	Type de colonne	Phase stationnaire	Protéine analysée	Tampon*	Réf.
pECC + gradient	particulaire	Vydac, C ₁₈ , 3µm	cytochrome c bovin ovalbumine de poulet	TFA 0,07%	54
pECC + gradient	particulaire	Vydac, C ₁₈ , 3µm	β-lactoglobuline A bovine hémoglobine humaine	TFA 0,04% et TFA (pH 2,4) 0,04%+ NH ₄ ⁺ OH, pH 3 et 4	57
pECC + gradient	particulaire	Gromsil ODS 2, 1,5µm	cytochrome c bovin	TFA 0,1% (pH 2)	150
pECC + gradient	particulaire	Vydac, C ₁₈ , 5µm, 300Å	hormone de croissance recombinante humaine Activateur du plasminogène tissulaire	TFA 0,1% et 0,05%	186
pECC + gradient	particulaire	Vydac, C ₁₈ , 5µm, 300Å C ₁₈ , dialkylamine, 1:1, 5µm, 100Å	myoglobine cardiaque chevaline	TFA 0,025%	178
pECC + gradient	particulaire	Hypersil, ODS, 3µm	cytochrome c	TFA 0,1%	187
pECC + gradient	particulaire	C ₁₈	cytochrome c	acide formique acétate d'ammonium, 50 mM, pH 3	198
pECC + gradient	particulaire	TSK gel, Amide-80, 5µm	cytochrome c albumine de sérum bovin	TFA 0,01%	189
ECC + gradient	col. capillaire creuse	C ₈ +amine	myoglobine cardiaque chevaline	acétate d'ammonium 5 mM + TFA 0,05%, pH 2,5	190
ECC	col. capillaire creuse	C ₁₈ et ammonium inséré	albumine de sérum bovin	acide acétique 5 mM	191

ECC	support gravé COMOSS	C ₁₈ , grpt amide et acide sulfonique	albumine de sérum bovin marquée fluoresceine isothiocyanate	carbonate 1 mM, pH 9	192
ECC	support gravé COMOSS	C ₁₈ , grpt amide et acide sulfonique	albumine de sérum bovin marquée fluoresceine isothiocyanate	phosphate 1mM, pH 7	194
ECC	support gravé COMOSS	C ₁₈	ovalbumine	phosphate de potassium, pH 9	193
ECC	particulaire	3-(4-sulfo-1,8-naphthalimido)propyl sur particule de silice, 3µm	cytochrome c cardiaque chevalin	phosphate 20 et 50mM, pH 3,8 méthanol	151
ECC, pECC, pECC + gradient	monolithe	Méthacrylate, grpt N,N éthyl butyl amine	albumine de sérum bovin cytochrome c	Tris HCl, 25mM, pH 8 Acide acétique 0,1%	139
ECC	monolithe	Poly styrène, grpt N,N diméthyl butyl ammonium	cytochrome c	phosphate 50 mM, pH 2,5	196
ECC	monolithe	Greffage annulaire positif de poly éthylène imine / monolithe central à base de poly-vinyle benzène et comportant des nanotubes de carbone	hormone de croissance humaine	phosphate 25 mM, pH 2,5	197

* sauf indications contraire les solvants employés sont l'eau et l'acétonitrile et les gradients sont des gradients d'élution

PARTIE EXPERIMENTALE

INTRODUCTION

Le travail expérimental que j'ai mené au cours de ma thèse présentait un triple objectif : explorer les propriétés d'une nouvelle phase stationnaire mixte particulière en ECC, comprendre les phénomènes électrochromatographiques sur une telle phase et enfin tester le potentiel de cette phase pour la séparation de peptides et plus particulièrement de mélanges peptidiques issus de la digestion de protéines.

J'ai concentré mes recherches sur la phase Stability BS-C23, qui est une phase stationnaire mixte cationique et particulière et qui était, au début de ma thèse, la seule phase mixte, à groupement chargé inséré, présente sur le marché.

Elle répondait de plus à plusieurs critères que j'ai présentés dans les chapitres II et III : il s'agit d'une phase particulière, qui possède donc une structure beaucoup mieux définie qu'une phase monolithique, et qui peut être étudiée en CLHP. Ensuite cette phase mixte est dotée d'un greffon chargé positivement inséré : un FEO est donc envisageable, y compris aux pH acides. De plus la présence d'un groupement polaire était susceptible de limiter les phénomènes d'adsorption des peptides fréquemment rencontrés avec les phases stationnaires à base de silice. Enfin si la gamme des Stability BS comprend des greffons alkyles plus courts, C13, C17, nous nous sommes concentrés sur la Stability BS-C23 pour conserver la chaîne alkyle C18, particulièrement adaptée à la rétention de peptides. A l'heure actuelle, seules deux ou trois gammes de phases stationnaires de ce type sont commercialisées.

La première partie de mon travail a consisté d'une part, à mettre en oeuvre, au laboratoire, un protocole de remplissage de capillaires de silice de 75 μm de diamètre interne avec cette phase, destinés à être employés ensuite en ECC sur un appareil P/ACE MDQ Beckman-Coulter. J'ai ensuite mis au point et optimisé le procédé d'immobilisation de la phase stationnaire et évalué la stabilité des colonnes capillaires dans des conditions réelles d'analyse en ECC, face à des conditions de pH acide et basique (chapitre V).

Dans un second temps, pour réaliser une caractérisation pertinente de la colonne, j'ai été amené à étudier les différents outils mathématiques disponibles pour exploiter les données expérimentales d'ECC. Ainsi deux paramètres se sont révélés importants, le premier reposant sur une évaluation du FEO, et le second sur la porosité électrocinétique. J'ai testé ensuite

l'utilité de ces paramètres pour suivre l'impact de la composition de la phase mobile sur les analyses de peptides et sur leur efficacité (chapitre VI).

La dernière partie de mon travail de thèse a été consacrée à une étude plus "mécanistique" du comportement électrochromatographique du peptide ou de composés tests sur une telle phase stationnaire. Dans une première étude j'ai tenté d'évaluer et de dissocier la part chromatographique et électrophorétique impliqués dans les séparation en ECC de peptides modèles. Puis pour approfondir la compréhension des phénomènes de rétention en ECC, j'ai complété mon travail par une comparaison de la rétention de ces peptides en CLHP et en ECC (chapitre VII).

CHAPITRE V

FABRICATION DE COLONNES CAPILLAIRES

D'ELECTROCHROMATOGRAPHIE

INTRODUCTION

La phase située dans la colonne capillaire est le cœur du système d'électrochromatographie, comme je l'ai détaillé dans les chapitres I et II. Des recherches intensives ont été menées dans ce domaine pour trouver ou améliorer les modes de fabrication des colonnes capillaires.

Un certain nombre des caractéristiques de la colonne est lié à son mode de remplissage, y compris dans le cas de colonnes remplies par des particules de silice greffée [cf chapitre II, 20, 94]. Ainsi le procédé de remplissage doit être optimisé, pour chaque type de phase stationnaire employée. Pour une colonne capillaire remplie de particules, les différentes étapes critiques concernent le milieu de mise en suspension et de remplissage ainsi que le procédé d'immobilisation de la phase. En effet, le choix du solvant ou du mélange de solvants de remplissage permet d'assurer la mise en suspension de la phase stationnaire, d'éviter une sédimentation trop rapide ou la formation d'agrégats et d'obtenir des remplissages homogènes.

Dans cette partie je présente les études préliminaires que j'ai réalisées pour conduire à l'élaboration d'un protocole de remplissage de colonnes d'ECC à partir de particules de silice greffée. Plusieurs phases stationnaires ont été étudiées au cours de ce travail, des phases octadécyle classiques ou mixtes. La mise au point du remplissage se compose de plusieurs étapes, et je préciserai en particulier le choix des solvants employés lors du remplissage et les études menées pour définir le mode d'immobilisation de la phase stationnaire. Parmi les différents modes d'immobilisation existants, je me suis concentré sur les méthodes conduisant à la création d'un réseau de polymère ou de sol-gel emprisonnant les particules de phase stationnaire, ainsi que sur la formation de frittés par chauffage et agglomération de particules de phase stationnaire. Enfin après avoir sélectionné et optimisé le mode de fabrication des frittés, je me suis assuré de la stabilité à moyen terme des colonnes remplies de phase stationnaire mixte et ceci aux pH acide et basique.

I PHASES STATIONNAIRES

I.1 Phases de séparation

J'ai concentré mes recherches sur la phase Stability BS-C23, qui m'a été fournie en vrac par la société Cluzeau Info Labo (C.I.L., Sainte-Foy-la-grande), puisque aucune colonne capillaire commerciale possédant des dimensions compatibles avec l'ECC, n'est actuellement

disponible avec ce type de phase. La Stability BS-C23 porte un ammonium quaternaire greffé sur une particule de silice par l'intermédiaire d'une chaîne propyle. L'ammonium porte à son tour une chaîne C18 comme cela est illustré à la figure 59. Cette phase se range donc dans la catégorie des phases mixtes de type II à groupement polaire inséré.



Figure 59 : Représentation schématique du greffon de la phase mixte Stability BS-C23

Les caractéristiques des trois types de Stability BS-C23 étudiés au cours de ma thèse sont recensées dans le tableau III. Deux phases "end-cappées" présentent des tailles de pores différentes, mais une granulométrie identique, tandis qu'une troisième phase non end-cappée a été introduite pour étudier l'impact du end-capping sur le FEO.

Tableau III : Caractéristiques des phases Stability BS-C23 fournies par C.I.L.

	diamètre particules	taille des pores	forme	Surface spécifique ($m^2 \cdot g^{-1}$)	"end- capping"
Stability BS-C23	5 μm	300 Å	sphérique	250	oui
Stability BS-C23	5 μm	300 Å	sphérique	250	non
Stability BS-C23	5 μm	100 Å	sphérique	250	oui

I.2 Phases utilisées pour la formation de frittés

Les caractéristiques des frittés réalisés par chauffage dépendent principalement du type de phase stationnaire (nature des greffons, densité de greffage, taille, forme et porosité des particules, taille des pores) dans laquelle ils sont réalisés. J'ai donc envisagé et comparé plusieurs phases stationnaires différentes pour la fabrication de frittés. Parmi les phases envisagées, outre la Stability BS-C23, j'ai testé des phases à base de particules aussi bien sphériques que totalement irrégulières, que des particules possédant des granulométries et des tailles de pore variées (tableau IV).

Tableau IV : Caractéristiques des phases étudiées pour la formation de frittés par chauffage

	diamètre particules	taille des pores	taux de greffage (%)	forme	Surface spécifique (m ² .g ⁻¹)	"end- capping"
Turbo CIL, ODS-3	1,5 µm	80 Å	11	sphérique	220	oui
Stability RP18	5 µm	100 Å	12	sphérique	250	oui
Lichrosorb RP 18	7 µm	100 Å	21	irrégulière	150	oui
Upti-Prep, 1000 ODB, C 18	5 µm	1000 Å	-	sphérique	-	oui

II MATERIELS ET METHODES

II.1 Appareillages

II.1.A Remplissage des colonnes

- Pompe de CLHP, isocratique, Shimadzu LC-9A, (Touzard et Matignon, France), avec possibilité de travailler à pression ou à débit constant.
- Bac à ultra-sons Transsonic Digital, avec régulateur d'intensité, (Elma),
- Microscope optique (Reicher, Autriche)
grossissements ×10, ×40, ×100
- Appareil de chauffage ACF-Burner, (Innovatech, Stevenage, UK), équipé de résistances simple et double boucles chauffantes. Cet appareil fonctionne à l'aide de 12 programmes pré-enregistrés permettant de choisir la température et la durée du chauffage (Fig. 60)

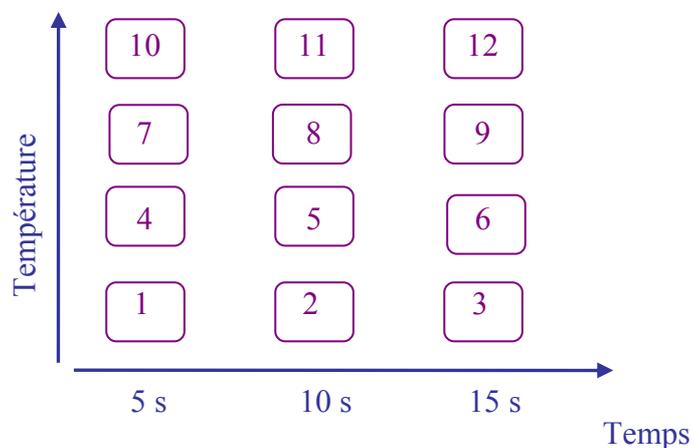


Figure 60 : Programmes de chauffage disponibles sur l'ACF-burner

II.1.B Microscopie électronique à Balayage (MEB)

- Appareil pour le dépôt d'or SCD 040, Balzer Union, (Furstentum, Liechtenstein)
- Microscope électronique à balayage : Stereoscan 440, (Zeiss, Nanterre, France)
Matériel du service de microscopie électronique de l'Université Paris VI [Ivry sur Seine]

II.1.C Analyses par ECC

- Appareil d'électrochromatographie : P/ACE MDQ, équipé d'un détecteur U.V., logiciel d'exploitation Karat 32, (Beckman-Coulter, Villepinte, France)

II.1.D Introduction de sol-gel dans un capillaire

- Pousse seringue : CMA/100 (Phymep, Paris, France)

II.2 Méthodes

II.2.A Remplissage de la colonne

Cette étape ayant été optimisée, elle sera décrite un peu plus loin. De manière générale 10 mg de phase stationnaire ont été mis en suspension dans 150 μ l de solvant, agités et placés 10 min dans un bac à ultra-sons pour casser les agrégats de phase stationnaire. L'entraînement et le tassement après remplissage de la phase stationnaire est systématiquement effectué avec le même solvant que celui de mise en suspension.

II.2.B Protocoles d'immobilisation par formation d'un sol-gel

Tous les capillaires que j'ai employés ont été prétraités par lavage alcalin pour assurer le meilleur ancrage possible des sol-gels sur les parois du capillaire. Le prétraitement a consisté en un lavage avec de la soude 1 M (0,1 ml.min⁻¹, 10 min), puis un rinçage à l'eau (0,1 ml.min⁻¹, 5 min) et enfin un séchage à l'étuve (80°C).

II.2.B.a Protocole dérivé des travaux de Tang *et al.* [110]

Ce protocole a été testé dans une étude préliminaire destinée à immobiliser les particules de phase stationnaire situées à une extrémité de la colonne par procédé sol-gel.

Mélanges de gélification :

tétra méthoxy silane (μl)	éthyl tri méthoxy silane (μl)	méthanol (μl)	formamide (μl)	solution aqueuse TFA, pH=2 (μl)
18	18	200	200	12

Le formamide est utilisé comme agent de séchage chimique et ajuste le pH.

Procédure de gélification et de séchage :

- ▶ capillaires laissés 24h à température ambiante (ici 31°C)
- ▶ séchés sous flux d'azote 50 min à 40°C
- ▶ puis sous flux d'azote de 40 à 250°C, à 1°C par min

Ma procédure s'écarte du protocole présenté par Tang *et al.* par l'emploi d'un flux d'azote pour le séchage au lieu du dioxyde de carbone supercritique proposé par cette équipe.

II.2.B.b Protocoles dérivés des travaux de Chirica et Remcho [113]

Mélanges de gélification :

Vingt-quatre mélanges ont été testés, en faisant varier (i) la nature du monomère ou le mélange de monomères utilisés, (ii) le catalyseur employé et (iii) l'effet de l'addition de formamide, comme agent de séchage chimique (dans le cas de catalyses acides).

Catalyse acide : trois catalyseurs acides ont été testés :

- ▶ TFA pH 2 ($9,3 \cdot 10^{-3}$ N)
- ▶ AcOH 0,01 N dans l'eau
- ▶ HCl 0,01 N dans l'eau

Catalyse basique : Deux concentrations du catalyseur basique ont été testées :

- ▶ NaOH 0,01 N
- ▶ NaOH 0,1 N

Les différents catalyseurs acides ont été systématiquement testés sur les six mélanges présentés au tableau V. Dans le cas de la catalyse basique, seuls les mélanges I à III ont été étudiés. Les constituants ont été ajoutés dans l'ordre suivant : solvant, formamide, monomère ou mélange de monomères ; après agitation le catalyseur est ajouté.

Tableau V : Mélanges de gélification employés lors de tests d'immobilisation de phase stationnaire par un sol-gel.

Mélange sol-gel	Tétra éthoxy silane (TEOS) (μl)	Méthyl tri éthoxy silane (MTEOS) (μl)	Méthanol (μl)	Formamide (μl)	Catalyseur (μl)
I	500	/	700	/	300
II	250	223	700	/	300
III	/	450	700	/	300
A	500	/	700	88	300
B	250	223	700	88	300
C	/	450	700	88	300

Procédure de gélification et de séchage pour les mélanges retenus sur des capillaires fermés aux extrémités :

- ▶ capillaires laissés 24h à température ambiante (ici 21°C)
- ▶ 24 h à 80°C
- ▶ 48 h à 100°C

II.2.C Mode d'introduction du mélange sol-gel dans un capillaire rempli

Pour voir aisément la progression des liquides lors de l'introduction des mélanges sol-gels, les capillaires remplis de phases stationnaires ont été préalablement remplis de méthanol, puis séchés à l'étuve à 35°C. Différents mode d'introduction de ces solutions ont été envisagés.

II.2.C.a Introduction par capillarité

Consiste à tremper l'embout du capillaire rempli dans le mélange de gélification (pendant 10 min). Le mélange pénètre dans la colonne par capillarité.

II.2.C.b Introduction sous pression de gaz

Pour l'introduction de la solution de gélification sous pression j'ai fabriqué le montage qui est présenté à la figure 61.

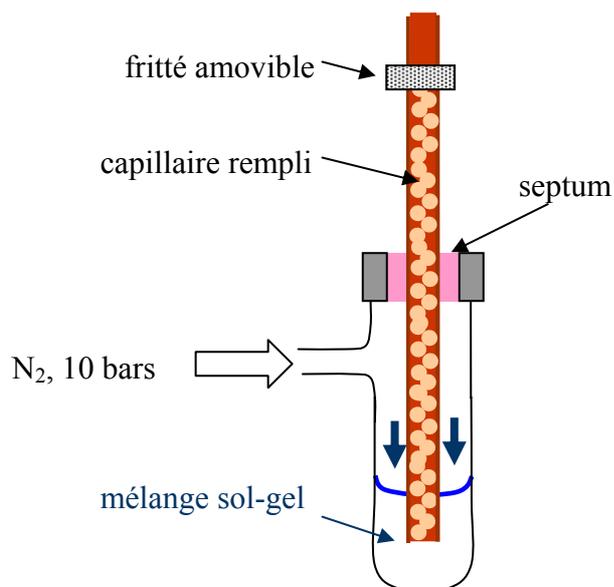


Figure 61 : Montage d'introduction sous pression de gaz d'un mélange sol-gel dans un capillaire rempli de phase stationnaire sous pression de gaz

II.2.C.c Introduction à l'aide d'un pousse seringue

Dans ce cas le capillaire rempli, muni d'un fritté amovible, est directement connecté à une seringue Hamilton de 50 μ l, par l'intermédiaire d'une férule et d'un écrou en inox (Vici). Le pousse seringue est réglé pour délivrer un débit nominal de 0,1 ml/min. Cependant, pour faire progresser le mélange de gélification dans le capillaire rempli il est nécessaire d'atteindre des pressions qui entraînent souvent des fuites et/ou des détériorations des seringues.

II.2.D Fabrication des frittés par chauffage

Les frittés ont été réalisés avec les filaments simple boucle de l'"ACF burner", tandis que les fenêtres de détection sont réalisées une fois le capillaire mis en place dans la cartouche, à l'aide d'un filament double boucles. Les frittés présentent des longueurs de phase immobilisée de 3 à 8 mm et leur fabrication entraîne l'enlèvement de la couche protectrice de polyimide.

Les frittés ont été réalisés tandis que de l'eau sous pression passe dans le capillaire rempli de phase. Le débit d'eau assure l'élimination des résidus de greffons éventuellement dégradés par la chaleur et évite de polluer le fritté. De plus, un flux continu d'eau évite la formation de bulles préjudiciables à l'homogénéité du remplissage. De même la pression maintient en place les particules de silice lors du chauffage et évite le colmatage du capillaire.

II.2.E Observation par Microscopie Electronique à Balayage

Les frittés réalisés avec les différentes phases et protocoles testés sont sectionnés soit au milieu de la zone chauffée, soit au milieu de la zone de gélification. Une couche d'or (20-30 nm) est déposée sur la section de la colonne par pulvérisation cathodique sous plasma d'argon, en appliquant une différence de potentiel de 300 V, pendant 130 s.

II.2.F Test de résistance mécanique des frittés

Les frittés sont raccordés à la pompe CLHP. La pression de 400 bars est atteinte en délivrant un débit d'eau de 0,1 ml/min. Une fois cette pression atteinte, la pression est maintenue pendant 30 min. Dans le cas des frittés réalisés par chauffage, la phase stationnaire excédentaire est éliminée et les frittés sont soumis lors du test à des ultra-sons.

II.2.G Test de stabilité de colonnes capillaires Stability BS-C23 à pH acide et basique

Phases mobiles :

- tampon phosphate, pH 2,5, force ionique 10 mM/ ACN, 40/60 (v/v)
- tampon Tris HCl pH 9,1 force ionique 10 mM/ ACN, 40/60 (v/v)

Colonnes : Phase Stability BS-C23, end-cappée, 300 Å, longueur de la portion remplie : 9,5 cm, longueur totale : 31,2 cm, frittés réalisés par chauffage de la phase de remplissage Prog. 9.

Mise sous tension des colonnes pendant un minimum de 8h :

Tension : -5 kV

Rampe d'établissement de la tension : 30 s

Température de la cartouche : 25°C

Pression sur les flacons de phase mobile : 100 psi soit 6,9 bars

Mélanges tests :

Marqueur de flux : DMSO : 3,3 mM

Série de phénols : Phénol : 0,07 mM

3 méthyl phénol : 0,09 mM

3,4 diméthyl phénol : 0,06 mM

3,4,5 triméthyl phénol : 0,012 mM

Les mélanges ont été préparés dans la phase mobile.

Analyse par ECC du mélange test de phénols :

Injection : 10 s à une tension de -5 kV

Tension : -15 kV

Rampe d'établissement de la tension : 30 s

Température de la cartouche : 25°C

Pression sur les flacons de phase mobile : 100 psi soit 6,9 bars

III MISE AU POINT DU PROTOCOLE DE REMPLISSAGE

Parmi les modes de remplissage, j'ai opté pour la méthode hydrodynamique, qui est peu exigeante en matériel et largement employée pour le remplissage de colonnes capillaires de CLHP et d'ECC.

Succinctement, le mode de remplissage hydrodynamique que j'ai employé se compose des étapes suivantes, dont les principales sont décrites à la figure 62.

- (i) Mise en suspension de la phase stationnaire dans un solvant ou un mélange de solvants approprié
- (ii) Remplissage d'un réservoir connecté au capillaire lui-même doté à son autre extrémité d'un fritté amovible, ou d'un fritté temporaire [Fig. 62 A]
- (iii) Transfert, sous pression et débit de solvant, de la phase stationnaire du réservoir vers le capillaire [Fig. 62 B]
- (iv) Tassement de la phase, pendant 30 min, sous 400 bars, la colonne étant soumise aux ultra-sons
- (v) Immobilisation par formation de frittés [Fig. 62 C]
- (vi) Retrait du fritté amovible et élimination de la phase stationnaire excédentaire [Fig. 62 D]
- (vii) Dépressurisation de la colonne
- (viii) Mise en place du capillaire dans une cartouche de type P/ACE MDQ Beckman-Coulter et formation de la fenêtre de détection.

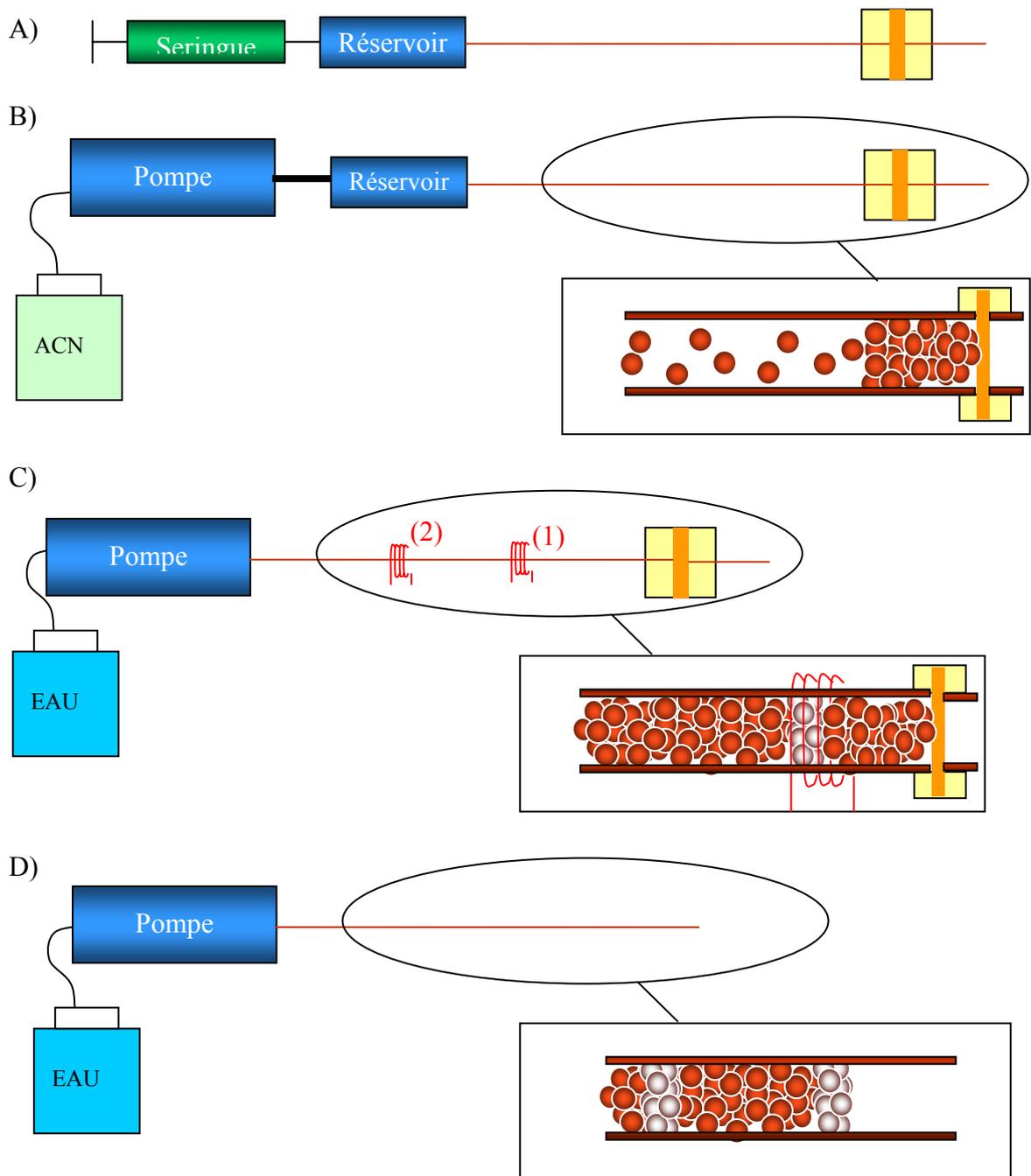


Figure 62 : Principales étapes du remplissage d'une colonne capillaire par une phase particulaire selon la méthode hydrodynamique, A) remplissage du réservoir, B) Transfert sous pression de la phase du réservoir vers le capillaire, C) Fabrication de frittés par chauffage à l'aide d'un filament chauffant, D) dépressurisation.

Comme Angus *et al.* [94] l'ont démontré, le solvant ou le mélange de solvants utilisés d'une part pour la mise en suspension de la phase stationnaire, d'autre part pour son entraînement du réservoir vers le capillaire, ont une influence sur les propriétés de la colonne et doivent être optimisés pour chaque type de phase stationnaire.

J'ai testé l'eau, l'acétonitrile, le méthanol et l'éthanol comme solvants de mise en suspension sur deux phases octadécyle Lichrosorb et Stability, ainsi que sur la phase mixte

Stability-BS-C23, end-cappée. Le tableau VI décrit les observations faites pour les différents solvants testés.

Tableau VI : Test des solvants de mise en suspension et de tassement des phases stationnaires Lichrosorb C18, Stability C18 et Stability BS-C23.

	eau	éthanol	méthanol	ACN	Eau/ACN 50/50 (v/v)
Lichrosorb C18	sédimentation très rapide	remplissage totalité cap. (difficile, >45 min)	remplissage totalité cap.	remplissage totalité cap.	-
Stability RP18	sédimentation très rapide	-	remplissage totalité cap.	remplissage totalité cap.	-
Stability- BS-C23	sédimentation très rapide	remplissage partiel cap.	remplissage partiel cap.	remplissage totalité cap.	sédimentation rapide

cap. : capillaire de 75 µm de diamètre, longueur 40 cm

Une sédimentation rapide de la phase empêche le transfert de la phase de la seringue vers le réservoir, la phase se déposant dans la seringue. L'eau a ainsi été immédiatement rejetée comme solvant de mise en suspension. D'une façon générale, les phases octadécyles testées ont été beaucoup plus faciles à mettre en suspension et à tasser que la phase stationnaire mixte Stability BS-C23. Ceci s'est traduit par un remplissage plus rapide du capillaire, sans qu'il soit forcément nécessaire d'appliquer des pressions aussi élevées que 400 bars. Le méthanol et l'éthanol ne permettent pas un remplissage complet d'un capillaire de 40 cm avec la Stability BS-C23, à l'inverse de l'ACN.

D'autre part, pour tenir compte de la présence de l'ammonium quaternaire, un essai a été réalisé avec un mélange 50/50 (v/v), eau-ACN pour la phase mixte. Une sédimentation plus rapide qu'en ACN pur a été observée dans ces conditions, empêchant de remplir le capillaire.

A l'issue de mes tests préliminaires de mise en suspension, l'ACN s'est révélé être le meilleur solvant de mise en suspension de la phase Stability BS-C23.

Notons toutefois que pour tous les remplissages de capillaire, aucun vide ou inhomogénéité n'ont été remarqués, après observation au microscope des capillaires remplis. De ce point de vue, éthanol, méthanol et ACN assurent un remplissage homogène du capillaire.

IV OPTIMISATION DU PROTOCOLE D'IMMOBILISATION DE LA PHASE STATIONNAIRE

L'immobilisation est un élément particulièrement critique de la fabrication des colonnes d'électrochromatographie capillaire à base de particules de silice greffée. Il détermine (i) la résistance mécanique de la colonne à la pression et à la tension, (ii) participe à la perte de charge, joue un rôle dans (iii) la dispersion des solutés, ou (iv) la formation de discontinuités dans le lit de la colonne qui génèrent des bulles lors des analyses.

Parmi les différentes approches présentées dans la littérature, les immobilisations nécessitant des restrictions de capillaires ont été écartées pour garantir l'intégrité du capillaire et éviter les problèmes de micro-fuite, et je me suis tourné vers les immobilisations par des frittés ou assimilés.

J'ai testé deux modes d'immobilisation, d'une part la fixation des particules de phase stationnaire par une nano-glue (sol-gel) et d'autre part l'immobilisation par chauffage et agglomération de particules de Stability BS-C23 ou de phases stationnaires uniquement dédiées aux frittés.

IV.1 Immobilisation de la phase stationnaire par un procédé sol-gel

Les frittés réalisés par chauffage fragilisent la colonne d'ECC, car ils entraînent l'élimination de la gaine protectrice de polyimide. J'ai étudié la possibilité d'immobiliser les particules de phase stationnaire sur toute la longueur de la colonne ou de créer des frittés par une autre méthode que l'agglomération par chauffage de la phase stationnaire, ces deux alternatives permettant de respecter l'intégrité de la gaine de polyimide. Ainsi, j'ai exploré dans un premier temps les immobilisations par création d'une "nano-glue" à base de sol-gel, qui présentent l'intérêt d'être tout à fait "compatibles" avec les particules de phases stationnaires et avec les capillaires employés, tous deux étant en silice.

Je souhaitais donc former un réseau sol-gel ou des ponts sol-gel résistants, faiblement poreux pour ne pas rajouter de surface d'échange et n'entraînant ni pollution ni phénomène d'adsorption des analytes.

Après avoir testé le seul protocole publié concernant l'immobilisation d'une phase stationnaire mixte établi par Tang *et al.* [110], j'ai tenté de mettre au point des mélanges sol-gel comportant une proportion plus élevée de monomères afin de synthétiser un réseau sol-gel plus résistant.

Pour ce faire, j'ai étudié plusieurs mélanges de gélification en faisant varier la nature des catalyseurs, en présence ou non d'agent de séchage chimique (formamide), et en testant

différents monomères. Après une étude préalable réalisée dans des cupules et dans des pipettes pasteur pour déterminer les temps de gélification et la texture des gels, j'ai testé les effets de rétractation des sol-gels dans des capillaires creux. Enfin des réseaux sol-gel ont été fabriqués au sein de capillaires remplis de phase stationnaire et j'ai testé leur résistance à la pression.

IV.1.A Méthode proposée par Tang *et al.* [110]

Les protocoles que j'ai envisagés dérivent des travaux d'immobilisation de particules de phase stationnaire en CLHP [199] et en ECC reportés par l'équipe de Tang en 1999-2000 [107-110]. Cette équipe a travaillé sur l'immobilisation des particules de phases stationnaires mixte C18-acide propylsulfonique, par une "nano-glue" répartie tout au long de la colonne [110]. Dans mon cas, j'ai testé cette voie ainsi que la possibilité d'immobiliser la phase uniquement sur quelques centimètres à l'extrémité extérieure de la colonne sans recouvrir la totalité du volume mort de la colonne pour créer ainsi des frittés à base de sol-gel.

Dans un premier temps, j'ai testé le protocole de gélification proposé par Tang *et al.*, à la seule différence que le séchage a été réalisé sous flux d'azote. Les capillaires, contenant la phase stationnaire Stability BS-C23 300 Å, ont été partiellement remplis par le mélange de gélification à l'aide d'un pousse seringue. Une observation par Microscopie Electronique à Balayage (MEB), indique que des ponts sol-gel entre les particules de phase stationnaire ont bien été formés et ceci est confirmé à plusieurs endroits de la colonne (Fig. 63). Cependant les ponts que j'indique sur la figure 63 par des ellipses rouges sont peu nombreux. J'ai noté par ailleurs que le mélange sol-gel conservé dans un flacon fermé pendant 24 h à température ambiante formait un bloc au bout de 14 h, mais que celui-ci restait très mou.

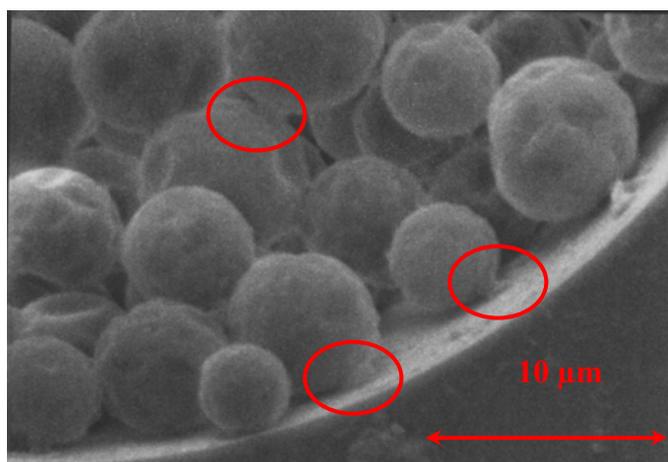


Figure 63 : Visualisation par MEB de l'intérieur d'une colonne remplie par un sol-gel réalisé selon un protocole opératoire adapté de [110]

Ce mode opératoire s'est avéré assez lourd et les sol-gels formés n'ont pas résisté au test de mise sous pression, décrit en II.2.F.

IV.1.B Élaboration du mélange sol-gel

Pour former des sols-gels plus résistants, j'ai alors augmenté la part de monomère de 8 à 30% dans le mélange de gélification, pourcentage proposé par Chirica *et al.* [113]. Je me suis inspiré de leurs résultats et avons testé des variantes à partir d'un de leur mélange optimal.

J'ai employé le tétra éthoxyle silane (TEOS) et le méthyle triéthoxy silane (MTEOS) comme monomères, ainsi que le mélange équimolaire de ces deux monomères (MTEOS+TEOS).

J'ai testé différents catalyseurs, en catalyse acide, le TFA, l'acide acétique (AcOH) et l'acide chlorhydrique et en catalyse basique deux concentrations de soude.

De plus, pour les catalyses acides, j'ai évalué l'effet de l'addition du formamide, employé ici comme agent de séchage chimique et comme ajusteur du pH.

J'ai introduit la catalyse basique avec de la soude 0,1 N et 0,01 N pour tenter d'obtenir des sols-gels plus réticulés, avec une faible porosité. Ce type de sol-gel devrait être tout à fait adapté pour limiter au maximum la surface d'échange provenant de la présence des sols-gels au sein de la colonne mais aussi pour accroître leur solidité.

IV.1.B.a Temps de gélification et aspect

Une première mesure des temps nécessaire à la gélification et une inspection de l'aspect des sol-gels formés est réalisée soit dans des cupules (dépôts de 300 µl), soit dans des embouts de pipettes pasteur remplis au préalable par le mélange (1 mm de diamètre interne, longueur 4 cm). Pour reproduire la faible évaporation du solvant en conditions réelles dans les capillaires, les cupules sont recouvertes de parafilm après remplissage. Les temps nécessaires pour conduire à la gélification des sols dans les cupules ont été relevés et sont reportés pour les différentes conditions testées dans le tableau VII.

Tableau VII : Influence du ou des monomères, du catalyseur et de la présence ou de l'absence de formamide sur le temps de gélification de mélanges sol-gel.

Monomère(s)	Catalyseur	TEOS	TEOS+MTEOS	MTEOS
Catalyse acide	TFA	4 h	4 h	4 h
	AcOH	>24 h	>24 h	>24 h
	HCl	4 h	4 h	4 h
Catalyse acide formamide	TFA	démixion	démixion	démixion
	AcOH	démixion	démixion	démixion
	HCl	démixion	démixion	démixion
Catalyse basique	NaOH 0,01 M	>6h	3 h 10	3 h 30
	NaOH 0,1 M	>6h	2 h 20	2 h 50

Analyses réalisées à température ambiante, cupules, 21-22°C

Les trois mélanges sols-gels comportant l'acide acétique comme catalyseur restent liquides après plus de 24h, et même après 72 h lorsqu'ils sont remplis dans des pipettes pasteur.

Les analyses réalisées dans les cupules et en présence de formamide ont montré une séparation de phases rapide du mélange sol-gel (démixion). D'autre part, ces mélanges sont toujours liquides dans les pipettes pasteur après 24 h. Le formamide destiné à éviter les craquellements s'est révélé défavorable et a été rejeté par la suite.

Si nous considérons maintenant l'aspect des gels obtenus, les sol-gels obtenus par catalyse basique, sont systématiquement blancs et pulvérulents, ce qui m'a conduit à écarter ce mode de fabrication. D'autre part en observant les sol-gels réalisés dans les pipettes pasteur, j'ai constaté que ceux réalisés avec le TFA étaient moins solides que ceux réalisés par une catalyse acide avec HCl.

IV.1.B.b Ancrage au niveau des parois du capillaire et rétractation du gel

Aux vues des résultats précédents, seul le catalyseur acide HCl a été retenu, de plus l'agent de séchage chimique formamide a été écarté.

Pour connaître la capacité des mélanges I, II et III à former un bon ancrage au niveau des parois du capillaire et pour visualiser leur aspect (rugosité, présence de déchirures ou de rétractation) j'ai mené une étude sur capillaire creux cette fois.

Après introduction du mélange sol-gel dans un capillaire creux, le capillaire est laissé une heure à température ambiante. Après ce laps de temps, l'excédent de solution de

gélification et une partie du méthanol sont éliminés sous pression d'hélium (5 bars) pendant 30 min.

Les images obtenues par microscopie électronique à balayage (MEB) pour le mélange comportant uniquement le monomère MTEOS, montrent la présence d'une très fine couche. En ce qui concerne le sol-gel formé uniquement à base de TEOS, la figure 64 A indique une rétractation importante, avec un décollement du sol-gel de la paroi du capillaire. En revanche, pour le mélange équi-molaire de MTEOS et de TEOS, un recouvrement assez épais, adhérent bien aux parois du capillaire est obtenu [Fig. 64 B].

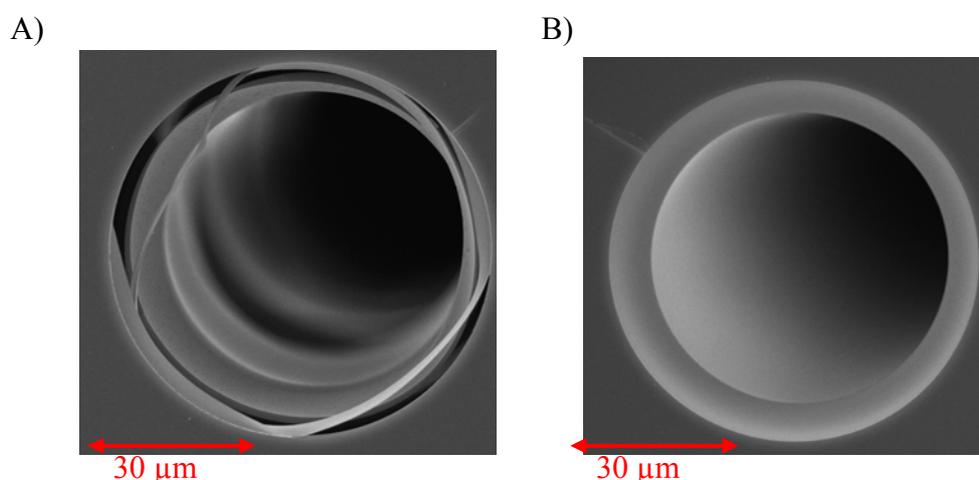


Figure 64 : Ancrage et aspect des sol gel formé au sein de capillaires creux avec une catalyse acide HCl A) mélange à base de TEOS B) Mélange équi-molaire de MTEOS et de TEOS

J'en ai déduit que des problèmes de rétractation du gel étaient envisageables pour la solution contenant le TEOS, comme seul monomère.

IV.1.C Modes d'introduction du sol-gel dans un capillaire rempli de phase stationnaire

Les trois mélanges sols-gels précédents ont ensuite été testés au sein de capillaires remplis de phases stationnaires mixte (Stability BS-C23, 5 μm , 300 Å) et octadécyle (Stability C18, 5 μm , 300 Å).

Trois modes d'introduction dans le capillaire rempli de phase stationnaire ont été testés pour les mélanges sols-gels : une introduction par simple capillarité, une introduction "par pression de gaz" ou à l'aide d'une seringue connectée à la colonne capillaire.

L'introduction par capillarité consiste à tremper l'embout du capillaire rempli dans le mélange de gélification. Une étude par MEB à différentes longueurs du bout du capillaire (0,2 et 5 mm) a mis en évidence une mauvaise répartition des sol-gels dans le capillaire, le sol-gel étant bien visible au bout du capillaire, mais non discernable à 2 et 5 mm. De fait, la solution n'humecte pas plus d'un millimètre de colonne et ce trempage peut dans certains cas entraîner un détassement de la phase stationnaire. D'ailleurs, Schmid *et al.* [200], qui préconisent cette méthode doivent répéter l'opération quatre fois pour obtenir un fritté. Il est possible que les différents mélanges sol-gels que j'ai testés et retenus lors de l'étude préliminaire soient trop visqueux pour entrer dans le capillaire, par capillarité, bien qu'ils soient à base de méthanol comme ceux de Schmid *et al.* [200].

Dans un second temps, j'ai introduit le mélange sol-gel par pression de gaz. Mais là encore le mélange sol-gel ne remplit qu'une portion extrêmement faible de la colonne (quelques millimètres) quel que soit le mélange testé. De plus, aucun fritté résistant à une mise sous pression n'a pu être synthétisé de cette façon.

La dernière méthode d'introduction a consisté à utiliser un pousse seringue, ce qui permet d'accéder à des pressions beaucoup plus élevées. Par l'intermédiaire de cette méthode, des remplissages de 5 à 7 cm ont pu être atteints.

IV.1.D Résultats

Les trois mélanges sols-gels retenus à l'issue des tests préliminaires, à base de TEOS, MTEOS et d'un mélange équimolaire de ces deux monomères, ont été introduits l'aide d'un pousse seringue dans des capillaires préalablement remplis par la Stability BS-C23 300 Å, end-cappée, ou la Stability RP18. Après une gélification d'une heure, l'excédent de mélange de gélification et une partie du méthanol sont éliminés sous pression d'hélium (5 bars) pendant 30 min.

Les sol-gels formés à partir de MTEOS ne donnent aucun pont visible, tandis que le mélange à base de MTEOS et TEOS forme de petits points d'ancrage, qui paraissent assez lisses (Fig. 65 A et B). Le mélange à base de TEOS, en revanche, forme des ponts "rugueux". A titre d'exemple, pour ce dernier mélange, la figure 65 C et D permet de visualiser ces ponts dans le cas d'une phase stationnaire mixte.

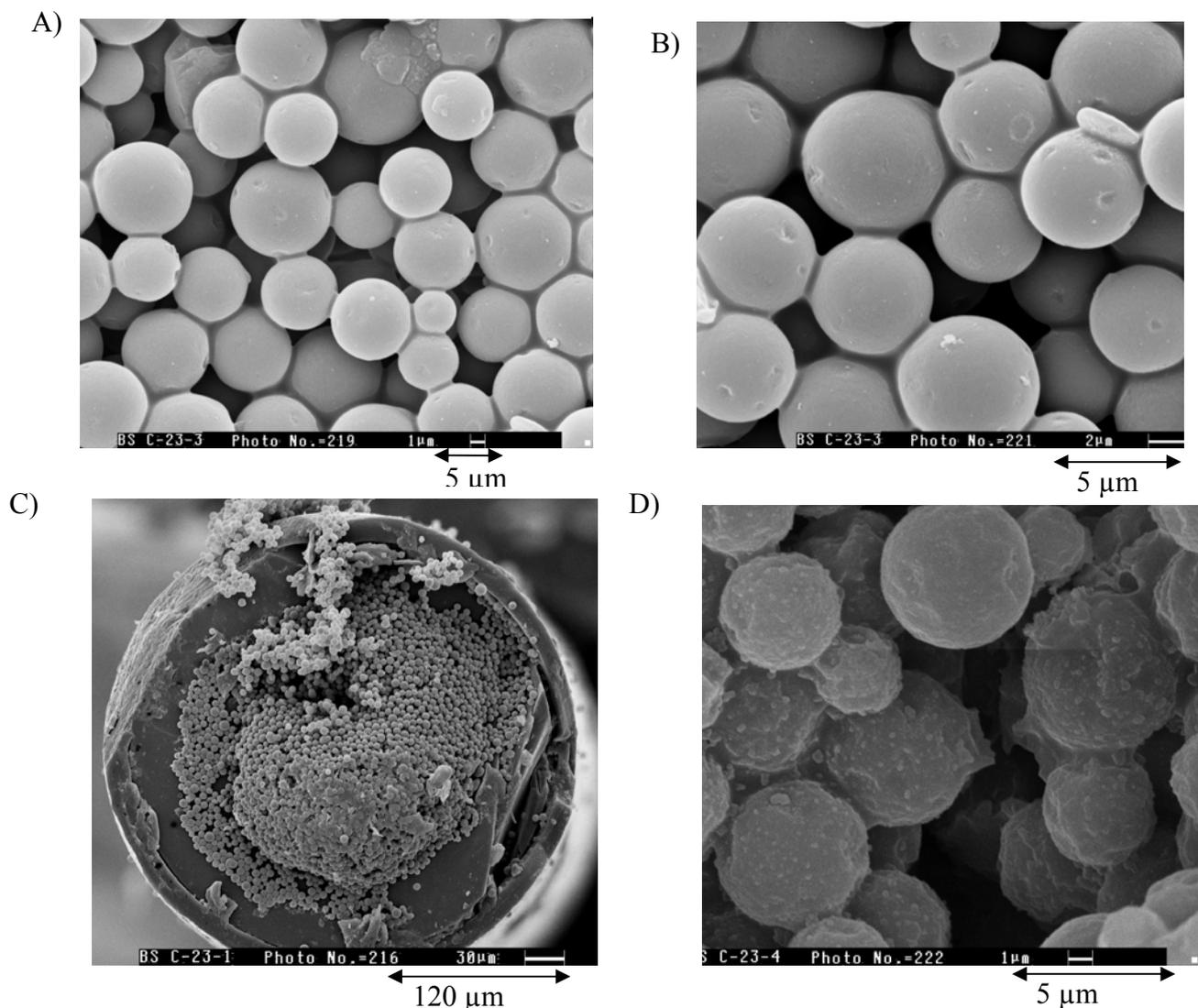


Figure 65 : Aspects des immobilisation par sol-gel réalisées au sein de capillaires remplis de phase stationnaire A) et B) mélange à base de MTEOS et TEOS, sur Stability RP18 C) et D) mélange à base de TEOS, sur Stability BS-C23 300 Å

Même si ces résultats sont très encourageants, l'étude par MEB a montré un manque de répétabilité de la fabrication de ces frittés. En effet, des frittés fabriqués de la même manière présentaient un nombre très variable de ponts sol-gel.

La résistance de ces frittés à une mise sous pression de 400 bars a été testée sur des portions de capillaire de 5 cm. Aucun des différents frittés fabriqués ainsi n'a résisté à ce test.

Malgré le nombre de tests réalisés pour aboutir à un protocole permettant de former des frittés à base de sol-gel, les difficultés d'introduction du mélange sol-gel dans la colonne remplie, mais aussi le nombre élevé de paramètres à optimiser dans un mélange de gélification pour obtenir une immobilisation répétable et résistante, m'ont conduit à abandonner cette approche attrayante et à envisager de réaliser des frittés par chauffage de la phase stationnaire.

IV.2 Frittés réalisés par chauffage

L'agglomération des particules de silice greffée a été réalisée par chauffage à l'aide d'un appareil commercial (ACF burner, voir partie II.1.A). Cet appareil dispose de programmes de chauffage pré-enregistrés qui varient en température et en durée de chauffage.

Les propriétés mécaniques et chimiques des frittés obtenus par agglomération des particules sont fortement dépendantes du type de phase stationnaire employée. Ainsi, pour cette approche, j'ai testé deux stratégies : la première et la plus simple consiste à former des frittés dans la même phase stationnaire que celle qui servira aux séparations. La seconde a été d'introduire une phase spécialement dédiée aux frittés et de nature différente de la Stability BS-C23. Cette deuxième stratégie a l'avantage de pouvoir moduler les caractéristiques du fritté, mais rajoute un nombre important d'étapes à la procédure de fabrication d'une colonne.

J'ai testé sur différentes phases C18 et Stability C23, les programmes de chauffage 8 à 11 de l'ACF burner, les autres programmes se révélant totalement inefficaces. Deux approches ont été envisagées pour estimer l'effet combiné de la température et de la durée de chauffage sur la qualité des frittés ainsi formés : une étude par MEB qui permet de visualiser finement la structure du fritté, et un test de résistance à la pression (*cf* partie II.2.F), qui nous renseigne directement sur la résistance mécanique des frittés.

Les images MEB ont été réalisées sur une section du fritté correspondant au milieu de la zone chauffée. Ces observations ont montré que le chauffage a des effets très variés selon la taille et la porosité des phases stationnaires employées. L'évolution la plus marquée a été obtenue pour la plus faible granulométrie (1,5 μm , Turbo CIL ODS 3) (Fig. 66). En effet pour cette phase, le programme 8 ne fixe pas les particules, qui sortent du capillaire lors du balayage par le faisceau d'électrons. Le programme 9 fixe les particules entre elles qui ne bougent pas sous le balayage d'électrons. Quelques ponts sont de plus observables au niveau de la paroi du capillaire et même entre les particules (signalés par des ronds rouges au niveau de la figure 66). Le nombre de ponts augmente significativement lors de l'augmentation de la température (programme 10). Le programme 11 entraîne même la fusion de certaines particules et la réalisation d'un véritable réseau de silice. Mais, parallèlement, nous observons la formation d'un décollement entre la phase et la paroi interne du capillaire qui s'accroît.

D'après cette étude par MEB, les programmes 10 et 11 ont été exclus pour cette phase.

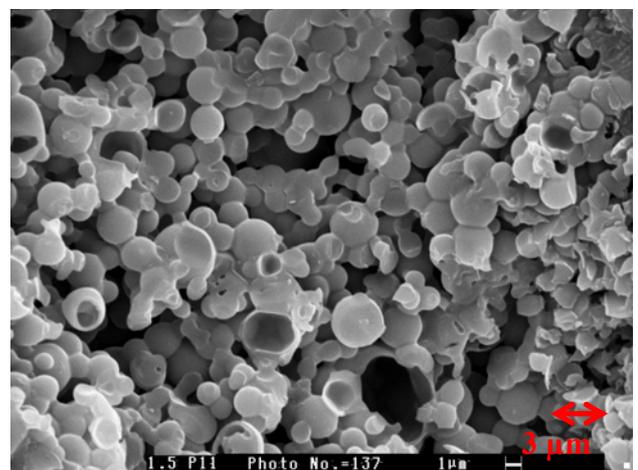
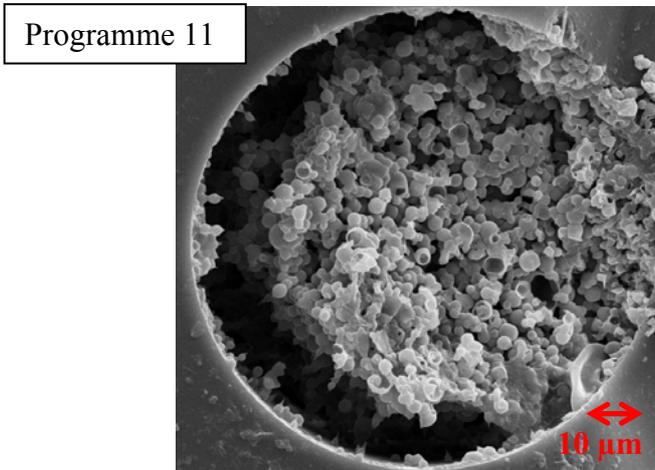
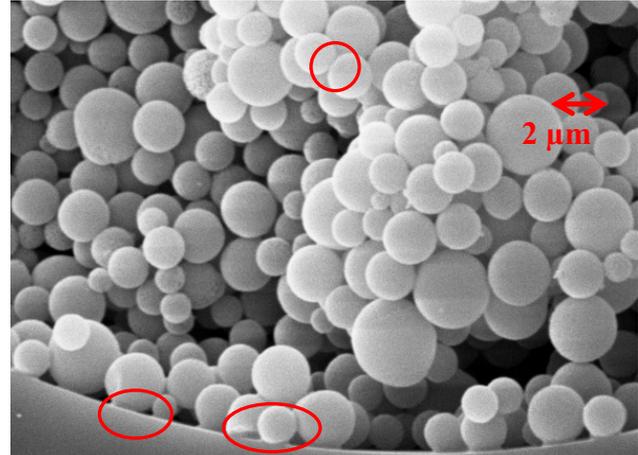
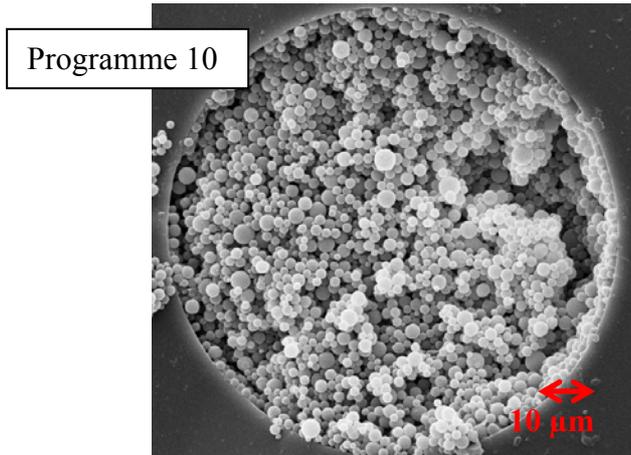
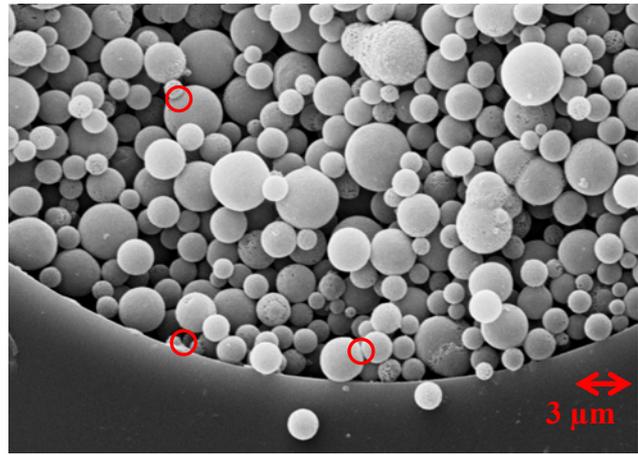
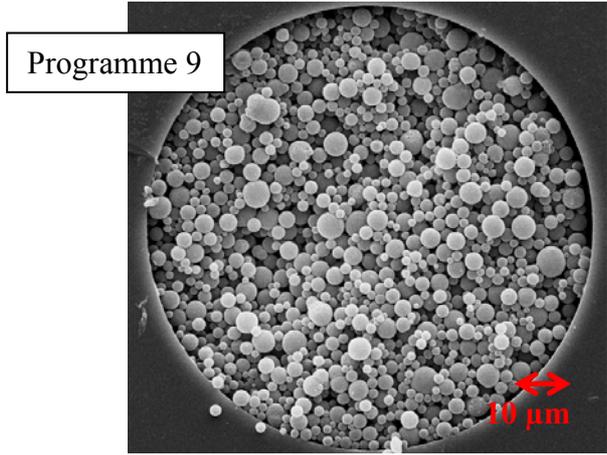
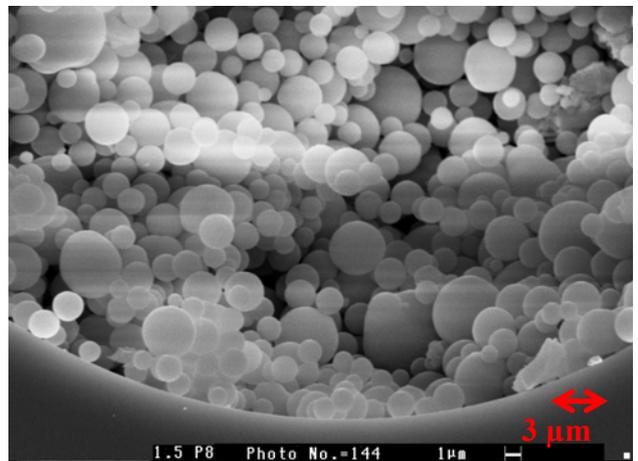
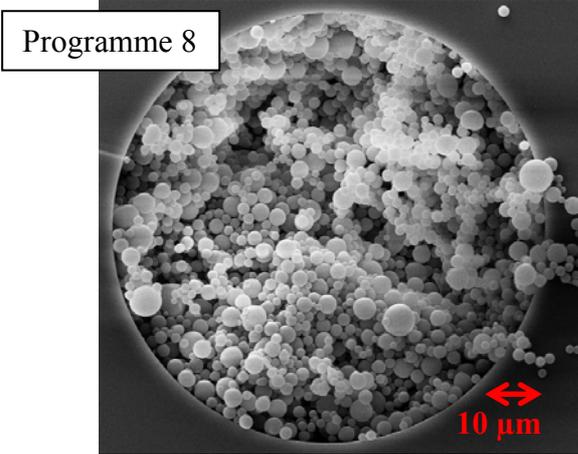


Figure 66 : Effet de la température et de la durée de chauffage sur la structure des frittés obtenus avec une phase Turbo C.I.L., ODS-3, 1,5 μm, 80 Å.

Le même type d'étude a été réalisé sur les autres phases stationnaires, cependant les différences entre les différents programmes sont beaucoup plus difficiles à déceler et les agglomérations entre particules sont alors difficilement visibles. Aucune différence notable n'est visible par exemple entre les frittés réalisés avec les programmes 8 et 11 pour la phase Stability BS-C23 (Fig. 67).

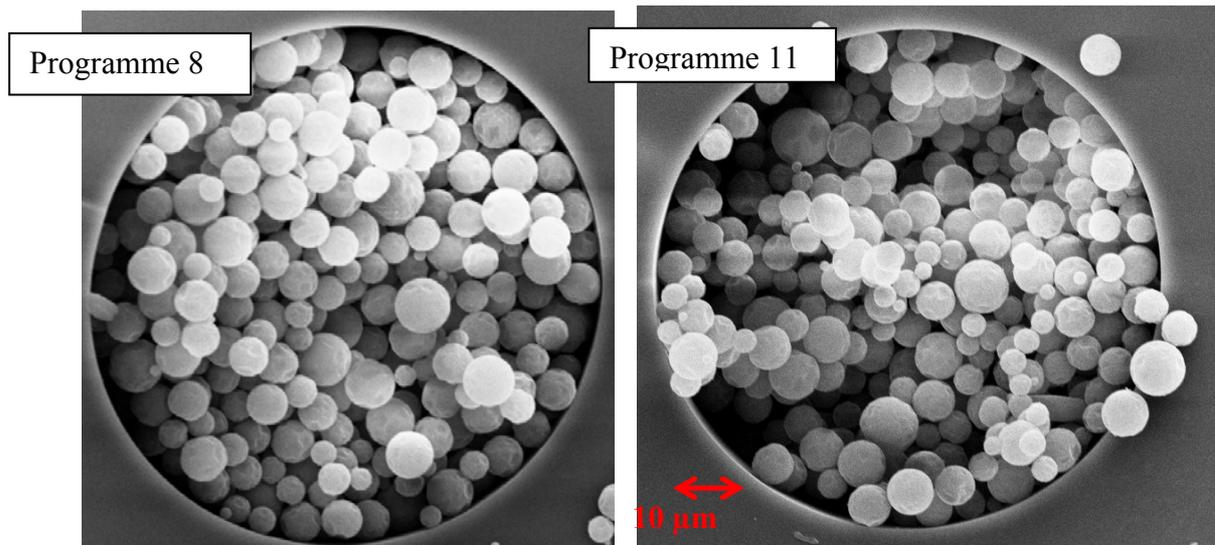


Figure 67 : Frittés réalisés dans la phase Stability BS-C23, 300 Å, end-cappée, programme 8 et 11.

Pour évaluer la qualité des frittés formés il a été nécessaire de recourir à une étude sous pression permettant d'estimer la résistance des frittés. Pour chaque programme, trois frittés ont été réalisés dans la phase étudiée. Tous les frittés réalisés avec une même phase ont été réalisés sur un même capillaire, espacés de 5 cm. A l'issue de cette fabrication, le capillaire a été coupé pour obtenir des morceaux de 5 cm, possédant chacun un fritté à son extrémité. La résistance mécanique des frittés a été testée. Contrairement au cas des immobilisations par sol-gel, les capillaires ont été, pendant cette opération, également soumis à des ultra-sons. Par ailleurs, à l'arrêt de la pompe, j'ai mesuré le temps nécessaire pour dépressuriser le fritté. J'ai considéré qu'un temps long traduisait une perméabilité faible du fritté. Les résultats de ces observations sont rassemblés dans le tableau VIII.

Tableau VIII : Résistance à la pression des frittés réalisés par chauffage dans différentes phases stationnaires

Phase stationnaire	Programme de chauffage				
	7	8	9	10	11
Turbo CIL, ODS-3, 1,5 µm, 80 Å	-	-	+	+	+
Stability C18, 5 µm, 300 Å	-	+	+	-	-
Lichrosorb RP 18, 7 µm	++	++	++	++	++
Stability BS-C23, 5 µm, 300 Å	-	+	++	-	-

- capillaire ne résistant pas à la mise sous pression, + capillaire résistant à la mise sous pression mais présentant une faible perméabilité, ++ Capillaire résistant à la mise sous pression mais présentant une grande perméabilité

Étonnamment, les déchirures du réseau de la Turbo CIL n'affectent pas la résistance à la pression, mais cette phase, du fait de sa faible granulométrie, engendre des frittés faiblement perméables (temps de dépressurisation long). La Stability C18 engendre, par ailleurs, des frittés peu résistants. Inversement la phase Lichrosorb RP 18, 7 µm forme des frittés résistants et perméables. Il s'agit d'une phase stationnaire d'"ancienne génération", absolument pas sphérique. Peut être le manque de pureté de la silice, sa forme assez irrégulière ou la grande dispersité des tailles de particules favorisent-ils une fusion- agrégation plus facile lors du chauffage ? Ainsi parmi les phases stationnaires C18 étudiées, seule la Lichrosorb a permis de fabriquer des frittés perméables et résistants.

En ce qui concerne les phases Stability, l'optimum pour la résistance des frittés se trouve pour le programme 9, c'est-à-dire pour le plus long temps de chauffage, mais à une température intermédiaire. Les frittés réalisés directement dans la phase de séparation avec ce programme se sont avérés aussi solides que ceux réalisés dans la Lichrosorb. La Lichrosorb pourrait apporter une amélioration en matière de résistance du fritté. Mais les images MEB ont souligné son caractère extrêmement irrégulier, son emploi n'est donc pas forcément indiqué du point de vue de la dispersion des analytes. De plus la préparation directe d'un fritté au sein de la phase stationnaire de séparation évite une étape supplémentaire lors de la confection des colonnes et limite au maximum les discontinuités entre le fritté et le lit de la colonne. J'ai donc opté pour le reste de mes analyses pour des frittés réalisés directement dans les phases Stability BS-C23.

La possibilité de réaliser des frittés viables au sein des phases Stability C18 et BS-C23, m'a conduit à privilégier la formation de frittés par chauffage. D'autre part, les travaux de Piraino et Dorsey [103] publiés à peu près au même moment où cette étude était réalisée, ont

démontré que les frittés réalisés par chauffage de la phase stationnaire ont certes une reproductibilité assez faible comparée à d'autres méthodes, mais engendrent une beaucoup plus faible dispersion lors des analyses que les frittés réalisés par procédé sol-gel. Dans une étude que je décris en détail au chapitre VII, concernant l'influence du pH sur le FEO dans un capillaire ne comprenant que deux frittés réalisés par chauffage, on observe un flux anodique pour des conditions acides. Ce flux démontre que la phase stationnaire des frittés n'est pas totalement dégreffée et conserve une part de greffon ammonium quaternaire.

J'ai donc opté pour des frittés réalisés par chauffage (programme 9) des phases stationnaires Stability BS-C23, tandis que la phase était placée sous pression (400 bars) et débit d'eau. La résistance mécanique des frittés que je fabrique a été confirmée par la résistance des colonnes d'ECC aux multiples mises sous pression lors de pré-conditionnements de la colonne.

Mais au-delà de la résistance mécanique de la colonne d'ECC, je me suis aussi intéressé à la stabilité des colonnes dans les conditions réelles d'analyses. J'ai donc suivi l'évolution des FEO, de la rétention et de l'efficacité pour des composés standards sur des colonnes remplies de Stability BS-C23 end-cappée, placées sous tension et en présence de phases mobiles qui ont été employées ensuite lors de mes analyses.

V ETUDE DE LA STABILITE A MOYEN TERME DES COLONNES

Le problème de la stabilité se pose toujours avec acuité lors de l'introduction d'une nouvelle phase stationnaire, de surcroît en ECC. En effet la phase est soumise à divers pH, solvants, à certains composés, mais aussi à une mise sous tension.

L'ACN est le solvant très généralement employé en ECC, en particulier pour l'analyse de peptides. Je me suis concentré sur l'effet du pH sur la stabilité des colonnes. J'ai spécialement réalisé deux colonnes capillaires de Stability BS C23, end-cappée, 300 Å qui ont été exposées respectivement à des tampons phosphate pH 2,5 et Tris HCl pH 9,1 de force ionique de 10 mM, dans des phases mobiles comportant 60 % d'ACN.

Une étude d'une semaine a été réalisée : tous les soirs les capillaires, équilibrés avec l'une des phases mobiles citées précédemment, ont été placés sous une tension de 5kV, pour une durée de 8 heures minimum. Ce type d'étude est assez délicat à mettre en oeuvre, en effet l'ECC s'adapte mal à des mises sous tension de longue durée (évaporation des solvants dans les flacons d'analyses, échauffement, formation de bulles et coupure de courant). Pour limiter

l'évaporation de la phase mobile, j'ai travaillé avec des réservoirs de 30 ml. Chaque matin un marqueur du FEO, ainsi qu'un mélange de phénols ont été analysés cinq fois, avec une phase mobile neuve, similaire à celle employée pendant la nuit.

L'intensité du FEO sur cette période d'étude s'est révélée remarquablement stable aussi bien lors d'une même journée que sur une semaine et ceci dans des conditions acides ou basiques. Ces résultats sont détaillés dans le chapitre VII.

Pour mieux caractériser la stabilité de la colonne, j'ai également suivi, tout au long de cette étude, les facteurs de rétention (Fig. 68) et les efficacités (Fig. 69) obtenues pour le phénol et le 2,4-diméthyl phénol.

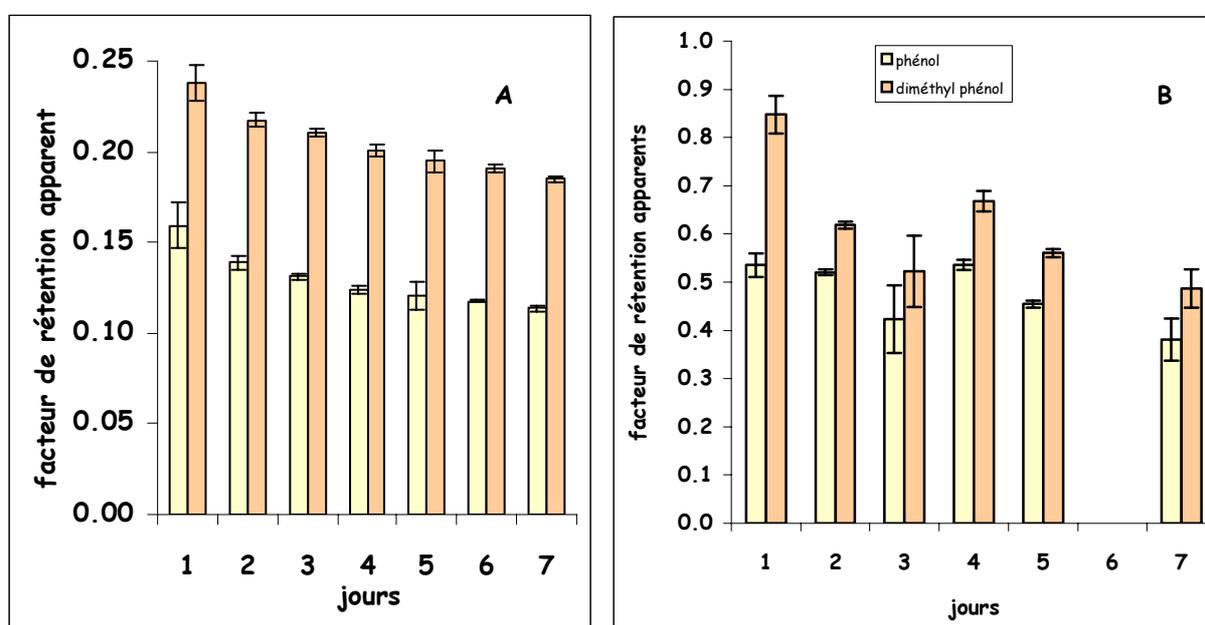


Figure 68 : évolution des facteurs de rétention de deux composés neutres en ECC sur une colonne exposée de manière prolongée à des milieux acide [A] et basique [B] les conditions opératoires sont détaillées dans le paragraphe "matériel et méthode"

En milieu acide, les coefficients de variation des facteurs de rétention restent inférieurs à 5%. Les efficacités mesurées pour ces deux composés montrent peu d'évolution des valeurs en conditions acides, même si la répétition (n=5) d'une même analyse conduit à des coefficients de variation assez élevés au cours d'une même journée. Une légère décroissance de la rétention a été notée, qui semble plutôt due à une évolution de l'arrangement des greffons de la phase stationnaire, qu'à un dégreffage de celle-ci (le FEO restant stable).

En revanche en milieu basique, si le FEO reste assez stable (coefficient de variation de moins de 4% sur 7 jours), il semble présenter une légère décroissance au fil des jours (cf chapitre

VII). Si nous considérons les facteurs de rétention et le nombre de plateaux théoriques pour le phénol et le diméthylphénol, nous observons une grande variabilité : des phénomènes d'adsorption sur les silanols résiduels (malgré les caractéristiques de la phase mixte) ou de possibles interactions ammonium-phénols (liaisons H) sont envisageables surtout à ces pH. De plus, les très importants coefficients de variation observés pour le nombre de plateaux théoriques pourraient aussi appuyer l'hypothèse d'une dissolution de la silice (Tableau IX).

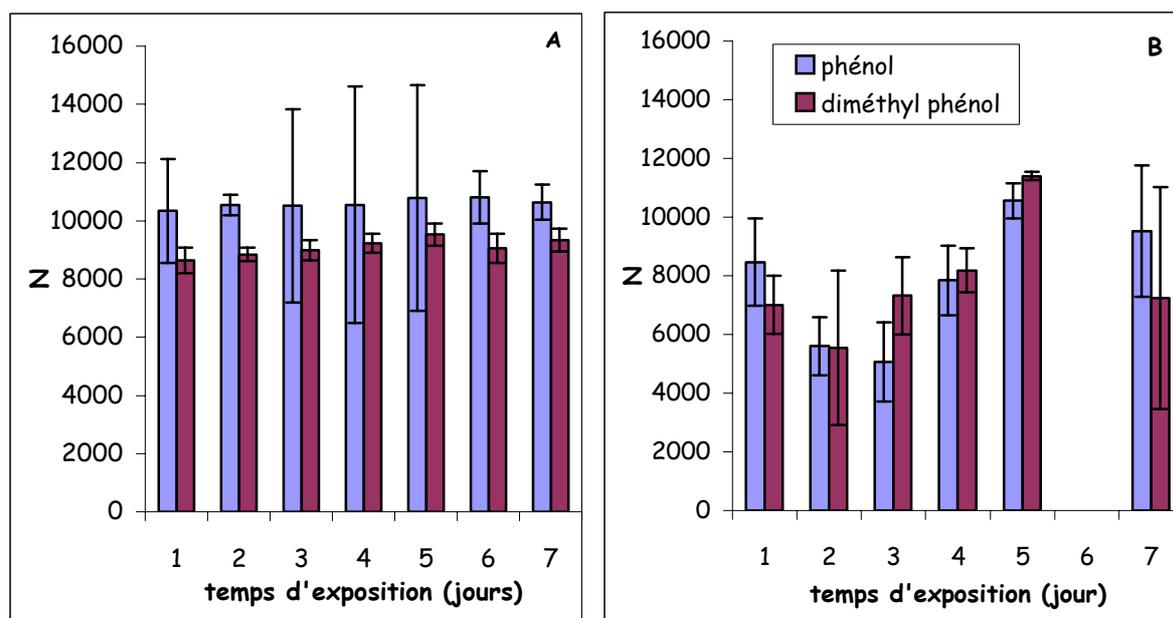


Figure 69 Evolution des nombres de plateaux théoriques calculés pour deux composés neutres, en milieu acide [A] et basique [B] phénol, 2,4-diméthyl phénol, les conditions opératoires sont détaillées dans le paragraphe "matériel et méthode".

Tableau IX : Coefficient de variation des facteurs de rétention et du nombre de plateaux théoriques calculés pour le phénol et le 2,4-diméthylphénol au cours d'une exposition de la colonne aux milieux acide et basique. (n=5)

	pH 2,5		pH 9,1	
	Facteur de rétention	Nombre de plateaux théoriques	Facteur de rétention	Nombre de plateaux théoriques
Phénol	4,5 %	1,4 %	9,6 %	28 %
2,4-diméthyl phénol	2,4 %	3,1 %	8,1 %	25%

En conclusion, j'ai considéré que les colonnes capillaires remplies de Stability BS-C23, 300 Å présentent une stabilité intermédiaire satisfaisante en milieu acide (pH 2,5). En revanche, une instabilité de la phase ne peut être exclue en conditions basiques (pH 9,1).

DISCUSSION

J'ai mis en place au laboratoire un protocole de fabrication de colonnes capillaires pour l'ECC, s'appliquant aussi bien aux phases stationnaires particulières de silice greffées octadécyle qu'à une phase stationnaire mixte cationique, la Stability BS-C23. Pour cette mise au point, j'ai dû m'intéresser plus particulièrement à deux étapes décisives : le choix d'un "bon solvant" de mise en suspension et de tassement de la phase stationnaire, le choix et l'optimisation du procédé d'immobilisation.

Plus difficile à remplir que les phases C18 testées, les phases Stability BS-C23 ont pu être mises en suspension, remplies et tassées au sein de capillaires de 75 µm de diamètre interne avec succès en employant l'ACN comme solvant. Le THF a déjà été reporté par Angus *et al.* [94], pour le remplissage d'une phase mixte de type I échangeuse de cations et octadécyle ainsi que pour une phase octadécyle riche en silanols résiduels, mais n'ayant aucune indication sur la compatibilité de ce solvant avec la phase que je testais, j'ai préféré l'éviter.

Pour les modes d'immobilisation, j'ai montré que l'étude par MEB des frittés permettait de visualiser la structure des frittés (notamment en ce qui concerne leur homogénéité, l'agglomération des particules ou leur perméabilité), mais aussi d'évaluer le potentiel des mélanges sols-gels à créer des "ponts" entre les particules. Cependant, cet outil ne peut pas être le seul mode d'évaluation de ces fixations, en effet, comme nous l'avons vu, les connexions entre particules sont parfois difficiles à discerner. Pour disposer d'un test simple, sans nécessiter la fabrication d'une colonne complète d'ECC, ni la réalisation de séparations pour évaluer des efficacités, j'ai proposé un test pour évaluer la résistance mécanique des frittés. Ce test fournit de surcroît quelques renseignements sur la perméabilité des frittés.

Du point de vue de l'immobilisation par des sol-gels, le mode d'introduction du mélange de gélification dans des capillaires déjà remplis de phase stationnaire est problématique si nous employons des méthodes simples sans avoir recours à un gaz supercritique. Peu d'auteurs traitent du problème et la plupart [113, 199] ont recours à une introduction simultanée de la phase stationnaire et du mélange de gélification. Ces méthodes impliquent l'introduction du

sol-gel dans tout le capillaire et/ou l'absence de tassement des particules de phase stationnaire. Malgré les bonnes efficacités reportées, les auteurs perdent probablement une partie des propriétés chromatographiques de la phase qui se trouve recouverte de sol-gel. J'ai testé la possibilité de fabriquer au moins un fritté sur les deux nécessaires à l'immobilisation par la voie sol-gel, mais les méthodes reportées dans la littérature qui introduisent un sol-gel sur toute la longueur de la colonne ne semblent pas transposables sur de faibles longueurs de capillaire, soit car la fixation s'est avérée trop fragile, soit parce que la solution de gélification était trop visqueuse pour permettre son introduction sur plusieurs millimètres de colonne remplie.

Les autres possibilités d'immobilisation, telles que les frittés réalisés par photopolymérisation nécessitent aussi d'enlever la gaine protectrice de poly-imide et ont été écartées pour la fragilité du capillaire qu'il occasionne.

J'ai donc finalement opté pour une immobilisation par chauffage et agglomération des particules qui est la plus largement employée dans la littérature et j'ai testé différentes phases stationnaires. Paradoxalement, les phases « anciennes » (qui présentent souvent des formes irrégulières, des distributions de granulométrie très larges) sont de très bons candidats pour réaliser les frittés, probablement du fait d'impuretés dans la silice, qui facilitent la fusion et l'agglomération des particules. Des phases stationnaires macroporeuses (taille des pores $\geq 1000 \text{ \AA}$) seraient aussi une possibilité, mais hélas je n'ai pu procéder que tardivement à des essais sur une phase Upti-prep (Interchim, Montluçon) de diamètre de pore 1000 \AA ; seule une observation par MEB a pu être réalisée sur cette phase et cette observation ne permet pas de statuer sur la qualité des frittés réalisés. Si j'ai montré que des phases de faible granulométrie ($1,5 \text{ \mu m}$ de diamètre par exemple) forment plus facilement un réseau après chauffage, la fusion complète des particules n'apparaît pas être favorable : les frittés ne sont pas plus résistants, mes essais de résistance à la pression les ont montrés moins perméables et l'observation par MEB montre des déchirures au niveau des frittés. Mais à l'issue de ces essais, j'ai montré que les frittés réalisés dans la phase de séparation (Stability BS-C23) étaient aussi résistants que ceux réalisés dans des phases C18 conventionnelles. Ceci est particulièrement intéressant dans la mesure où dans la littérature des auteurs ont décrit l'impossibilité de former des frittés convenables avec une phase stationnaire mixte [154,177], l'immobilisation nécessitant alors soit l'emploi de phase uniquement dévolue au fritté (ce qui complique notablement le remplissage) soit l'emploi de restriction du diamètre interne du capillaire.

J'ai donc fabriqué des colonnes capillaires de 9 à 20 cm ayant des frittés réalisés par chauffage de la phase de séparation, ce qui a le double avantage de limiter au maximum les discontinuités entre la phase stationnaire et les frittés (en terme de conductivité et de porosité) et surtout de simplifier le protocole de fabrication des colonnes. En effet, dans le cas où les frittés sont réalisés dans une phase autre que la phase de séparation, il est nécessaire de réaliser un premier remplissage de "phase à fritté", de réaliser le fritté, d'éliminer la phase excédentaire, de reprendre le remplissage avec la phase de séparation, puis de remplir à nouveau avec de la "phase à fritté" pour réaliser le second et dernier fritté.

Les colonnes que j'ai fabriquées ont, de plus, montré une remarquable stabilité à l'utilisation avec plus de 500 analyses possibles pour certaines, sans présenter de dégradation des analyses. De fait, la destruction d'une colonne a été plus souvent liée à la fragilité du capillaire de silice sans gaine de polyimide ou à la fragilité des frittés, qu'à une détérioration de la phase stationnaire et de ces greffons. Mais, outre la fragilité des frittés, la mise en place de la colonne dans les cartouches de type P/ACE MDQ spécialement conçues pour assurer un bon contrôle de la température en EC, s'est révélé être une étape particulièrement délicate. J'ai répertorié au cours de ma première année de thèse les causes de "mortalité" des colonnes capillaires que j'employais (Fig. 70). J'ai ainsi constaté que la destruction de la colonne capillaire était principalement liée aux manipulations des colonnes (montage dans la cartouche, pré-conditionnement avec une chaîne de CLHP, manipulation du capillaire) et non à la fragilité physique ou chimique des frittés.

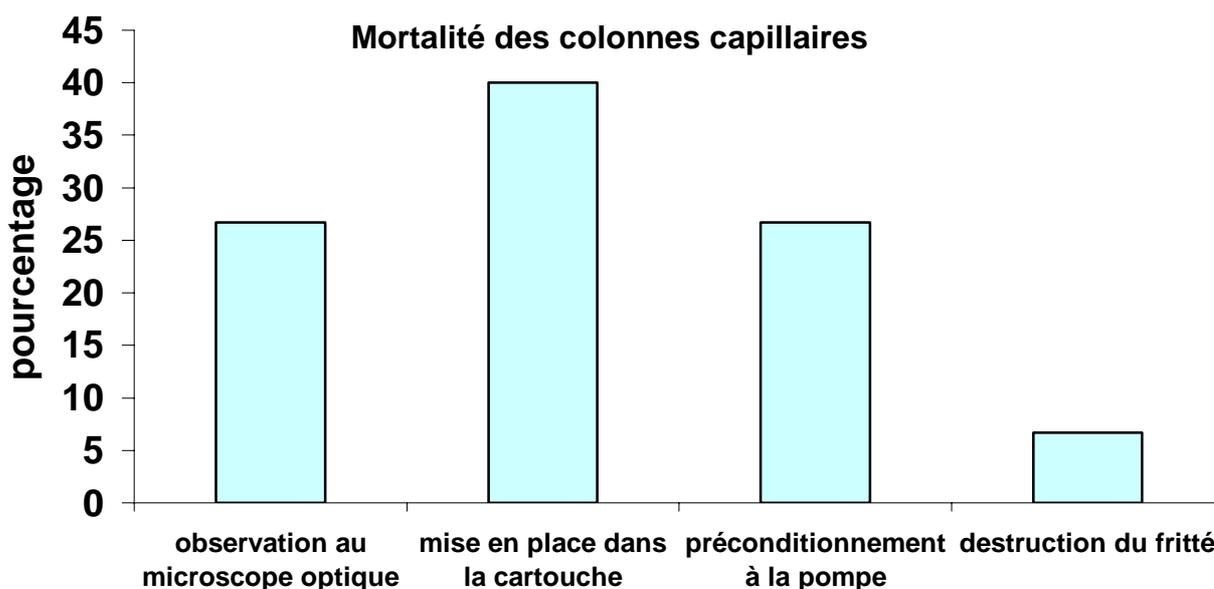


Figure 70 : Origine de la destruction des colonnes capillaires, fabriquées selon le mode opératoire retenu, employées lors de la première année de ma thèse (à partir de 54 colonnes).

Du point de vue de la stabilité physico-chimique des colonnes capillaires, j'observe une stabilité satisfaisante en condition acide (pH 2,5), en revanche j'observe des variations du FEO et des facteurs de rétention de phénols en conditions basiques (pH 9,1). Une légère décroissance du FEO pourrait être due aussi bien à un dégreffage progressif de la phase, à la perte des groupements ammonium qu'à un début de dissolution de la silice et une augmentation du nombre de silanols présents à la surface de la silice, mais aussi à des phénomènes d'adsorption des phénols sur la phase stationnaire. Sur une phase comportant un groupement urée inséré, étudiée à pH 7,0, Silva *et al.* [201] ont démontré que les greffons semblaient stables, tandis qu'un début de dissolution de la silice avait lieu. Ce phénomène serait d'autant plus amplifié avec les phases mixtes, que le groupement polaire pourrait entraîner la formation d'une couche d'eau au niveau de la surface des particules, ce qui pourrait faciliter l'hydrolyse et l'attaque par le tampon des ponts siloxane et la dissolution de la silice. Cette étude souligne l'impact important du choix du tampon d'analyse.

Les frittés sont connus pour engendrer des bulles [101], mais expérimentalement, les bulles sont souvent évitées en prenant quelques précautions. Ainsi, limiter au maximum le temps de séjour à l'air libre des capillaires, bien dégazer les phases mobiles, éviter des analyses inutilement longues ou une succession trop rapide d'analyses, ou des changements de phase mobile trop brusques et favoriser des mises sous tension progressives des colonnes, permettent une diminution, voire la disparition des phénomènes de bulles. Si j'ai réalisé toutes mes premières analyses avec des pressions de 100 psi (6,9 bars) appliquées sur les deux flacons de phase mobile, il s'est avéré que des pressions de 20 psi, voire sans pressurisation, étaient parfaitement réalisables, une fois ces précautions prises.

CHAPITRE VI

FLUX ELECTROOSMOTIQUE REEL ET POROSITE ELECTROCINETIQUE REELLE : DEUX OUTILS DE CARACTERISATION D'UNE COLONNE D'ECC

Article 1

Soumis Electrophoresis

Reliable parameters to evaluate impact of mobile phase composition on capillary electrochromatography performance with monolithic and particulate packed capillary columns.

F. PROGENT, V. AUGUSTIN, N. T. TRAN, S. DESCROIX, M. TAVERNA

INTRODUCTION

Bien qu'ayant démontré la stabilité de mes colonnes dans des conditions usuelles d'utilisation en milieu acide, les premières analyses furent particulièrement décevantes : courants instables, bruit de fond élevé, formation répétée de bulles et séchage partiel ou complet de la phase stationnaire. En particulier, le séchage de la phase nécessite un rééquilibrage de la colonne qui doit alors être connectée à une pompe de CLHP ce qui réduit drastiquement la durée de vie des colonnes. Même si les précautions d'emploi que j'ai évoquées dans le chapitre précédent réduisent considérablement ces problèmes, elles ne les font toutefois pas disparaître, de plus il est difficile d'expliquer les efficacités relativement faibles obtenues au début de ce travail.

Mieux cerner les phénomènes électrochromatographiques et l'influence des conditions opératoires est donc très rapidement devenu une obligation. Mais pour comprendre et exploiter les résultats d'analyse d'ECC, peu de paramètres propres à l'ECC existent. Diverses équipes ont tenté d'adapter le facteur de rétention chromatographique à l'ECC, comme je l'ai présenté au chapitre I. Les modèles de facteur de rétention, qui me semblent les plus pertinents, essaient de prendre en compte le FEO réellement engendré au niveau de la phase stationnaire et du chemin réellement parcouru par les analytes au sein de celle-ci. Mais l'évaluation de ces facteurs de rétention ne permet pas d'expliquer à elle seule les problèmes rencontrés et les efficacités obtenues. En particulier certains phénomènes propres à l'ECC, tels que l'existence d'un flux perfusif qui assure un transport des analytes dans la phase stationnaire, ou encore les phénomènes de séchage de la phase stationnaire doivent être considérés. Et plus généralement, il est éminemment souhaitable d'avoir des paramètres caractérisant les phénomènes qui peuvent entraîner des instabilités du courant et/ou de la ligne de base, ainsi que des pertes d'efficacité, en bref de définir des paramètres directement utilisables lors des analyses d'ECC pour déterminer les bonnes conditions d'analyse, ou pour le moins, les conditions rédhibitoires lors des analyses d'ECC sur une phase stationnaire donnée.

Je me suis particulièrement intéressé au FEO réellement engendré au sein de la phase stationnaire proposée par Rathore *et al.* [9, 47] et j'ai proposé un modèle de porosité électrocinétique des colonnes. J'emploie le terme de porosité électrocinétique car le recouvrement des doubles couches et la possibilité d'avoir un flux perfusif, modifient les domaines de phases stationnaire réellement accessibles par les analytes selon les conditions d'analyse. Jusqu'à présent, les travaux menés pour caractériser la porosité d'une colonne avaient principalement porté sur la caractérisation de phases stationnaires monolithiques [122,

125] et relativement peu sur l'effet des conditions opératoires sur le volume de la colonne offert à la séparation. J'ai étendu cette recherche à la fois à des phases monolithiques et à des phases stationnaires particulières pour m'assurer que les modèles mathématiques que je proposais ou que je développais pouvaient être employés sur une large gamme de colonnes capillaires d'ECC. J'ai pris soin de reconsidérer les différents traitements mathématiques du FEO et de la porosité et de les confronter avec mes résultats expérimentaux. Dans ce cadre j'ai choisi de travailler sur la Stability BS-C23 comme phase particulière et sur un monolithe à base d'acrylate anionique, synthétisé par M^{lle} Violaine Augustin au Laboratoire d'environnement et de chimie analytique de l'ESPCI. Après avoir déterminé le mode de calcul de la porosité qui me paraissait le plus pertinent, j'ai étudié les évolutions du FEO "réel" et de la porosité électrocinétique en rapport à des changements de composition de la phase mobile dans le cas de la Stability BS-C23 (force ionique, pourcentage en modificateur organique). J'ai par la suite tenté de relier les informations que m'ont procurées ces études aux efficacités générés lors de l'analyse de composés test neutres et de peptides, en conditions acides.

**ELECTROPHORESIS**

Reliable parameters to evaluate impact of mobile phase composition on capillary electrochromatography performance with monolithic and particulate packed capillary columns

Journal:	<i>Electrophoresis</i>
Manuscript ID:	draft
Wiley - Manuscript type:	Research Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Keywords:	Capillary electrochromatography , monolith, particulate packed capillary columns, electroosmotic flow, porosity, wettability

powered by ScholarOne
Manuscript Central™

Wiley-VCH

Reliable parameters to evaluate impact of mobile phase composition on capillary electrochromatography performance with monolithic and particulate packed capillary columns.

Frédéric Progent¹, Violaine Augustin², N. Thuy Tran¹, Stéphanie Descroix², Myriam Taverna^{1*}

¹ Groupe de Chimie Analytique de Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, rue J. B. Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France

² Laboratoire Environnement et Chimie Analytique, UMR CNRS 7121, ESPCI, 10 rue Vauquelin, 75231, Paris, France

Keywords : Capillary electrochromatography, electroosmotic flow, porosity, wettability, monolith, particulate packed capillary columns.

Abbreviations: AEP: “actual electrokinetic” porosity, PS-DVB: copolymer of styrene and divinylbenzene

Abstract

We have compared different models proposed in the literature to evaluate the porosity of CEC columns: gravimetric, flow as well as conductivity-based methods. Two kinds of CEC columns have been compared: two mixed-mode silica particulate stationary phases and different monolithic columns (acrylate or polystyrene divinylbenzene). The porosities measured from the conductivity-based methods were lower than the total column porosities obtained by gravimetric or flow methods for all the investigated columns while the wide distribution of values obtained showed that conductivity-based methods discriminate more efficiently columns with very different properties. We have proposed a new conductivity-based method employing the actual length proposed by Horváth, to evaluate an “actual electrokinetic” porosity (AEP). This parameter, easy to determine under experimental CEC conditions, afforded the most consistent evaluation of porosities for the packed and acrylated based monolithic columns and had the advantage to be based only on electrokinetic theory. To illustrate the potential of AEP and actual EOF to predict the performances of a CEC system (association of stationary and mobile phase) we have studied the influence of the mobile phase composition on these parameters with an ammonium embedded packed stationary phase.

Such parameters allowed to gain understanding on the perfusive EOF and stationary phase wettability. For neutral compounds (substituted phenols), AEP evaluation allowed to anticipate the mobile phase conditions able to enhance the efficiency while both AEP and actual EOF have to be considered in the case of peptide analysis.

INTRODUCTION

Capillary electrochromatography (CEC) has established itself as a promising high-performance analytical separation technique. Although CEC is often considered as a hybrid of capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography, evidences are accumulating that electrophoretic and chromatographic phenomena are not simply additive [1-6]. The interplay of both phenomena is still in discussion.

Initially, CEC, relying mostly on capillaries packed with silica based particles, has undergone a slow development mainly due to technical hindrances, but also to the lack of theoretical background on CEC phenomena. The difficulty to obtain a homogeneous and reproducible packing in capillaries from 50 to 100 μm internal diameters, the frit fragility, the low EOF generated by most commercial available bonded silica reversed phases and the bubble formation, soon appeared as great obstacles. Although not fully understood, it is believed that bubble formation is mainly associated to discontinuity of zeta potentials, of EOF and conductivities inside a packed column [7-8]. This feature has been shown to occur preferentially at the boundaries of open and packed segments, or of frits and stationary phase.

To overcome several of these problems, mixed mode stationary phases, with both charged function and reversed phase functionalities, have been introduced. These stationary phases are able not only to ensure a significant EOF under various mobile phase conditions, but also offer the possibility to reduce retention of basic compounds on silanols [9-14]. Moreover, packing procedures have been significantly improved [15-20] and one of the main advantages associated with particulate-packed stationary phases remains that most of them are already well characterized, at least from the chromatographic point of view and that a wide variety of stationary phases are commercially available. Besides these special designed stationary phases and to avoid problems arising from the presence of frits, laborious column fabrication or fragility of packed columns, CEC columns have also evolved towards monolithic columns.

Poor wettability [21-23] or drying out of the stationary phase during CEC process is also one issue associated with this technique. These features are dependent not only on mobile phase, but also on the properties of the stationary phase. In fact it appears that suitable systems should not be defined only by the choice of an adequate stationary phase, but rather by selecting mobile phase conditions that will enable an optimal use of the stationary phase properties (in terms of both efficiency and EOF). Ideally, a “good” mobile phase would be able to generate a sufficient EOF, but also to have access to all the internal volume of the stationary phase in order to favour high efficiencies.

Analytical conditions or tests have been proposed to characterize properties, chromatographically speaking, of CEC columns, but investigated parameters have been limited to an evaluation of chemical properties of the columns [13, 21, 24-31]. It is highly desirable to devise parameters for proper characterisation of the CEC columns. Very recently, Henry and Ratnayake have summarized some of the available parameters like resistivity, voltage and fields strength in CEC columns [32]. One of the challenges would be to define physico-chemical parameters especially dedicated to CEC, which give sufficient information on a CEC system (mobile and stationary phases) and that could be easily estimated under real CEC experimental conditions without columns damaging. Such parameters would allow to understand the unexpected retention behaviour: low or marginal efficiencies reported on specific conditions by several authors [33-36].

Among parameters especially dedicated to CEC, the concept of actual EOF introduced by Horváth *et al.* [37], would be an interesting parameter to characterize CEC columns and electrokinetic phenomena. Its intensity could give insight into flow paths and into the wettability of the stationary phase.

EOF generated by the silica capillary wall or stationary phases usually presents a flat flow profile. When present in the pores of silica-particles or in mesopores or micropores of monoliths, this flow is called perfusive flow. The possibility to generate a perfusive EOF appears to be one of the main advantages of CEC. Indeed, it ensures a good mobile phase distribution in all the pores and interstitial spaces of the stationary phase and eliminates stagnant pools of mobile phase into which analytes could diffuse. This flow improves the mass transfer and limits analytes diffusion. Stol and Kok [38, 39] have investigated the EOF characteristics and the advantages of this perfusive flow, on silica based particles. The authors underlined the possibility to obtain much higher flow homogeneity with perfusive flow, compared to that with pressure flow in HPLC or nonperfusive EOF in CEC, leading to a significant improvement of the separation efficiencies. The electrical double layer, from which the EOF takes place, is strongly linked to the particles diameter and ionic strength of the mobile phase. The double layer overlap can be responsible for the loss of plug flow profile and may occur in standard analytical conditions only in meso ($2 \text{ nm} < d_{\text{pore}} < 50\text{nm}$) and micropores ($< 2 \text{ nm}$).

Other reliable parameters are the porosity factor and the tortuosity, which provide information on the effective stationary phase network exploited under electrochromatographic conditions. Indeed, their accurate estimation could theoretically give a good idea of stationary phase wettability, and of the actual portion of stationary phase and pores that participate to the CEC separation. Gusev *et al.* [40] reviewed the different models proposed to estimate the total

porosity in CEC columns. Besides the basic gravimetric method based on weighting of capillary columns with and without mobile phase, and flow method based on CLHP studies, the conductivity-based methods are very attractive. Indeed, these latter methods developed for reservoir engineering and rocks studies rely on the measurement of current intensities produced by voltage application on both CEC column and open capillary.

In the present study, we have considered the different parameters available from simple measurements, performed either by CEC or CZE, of the commonly used duplex packed or monolithic column. These parameters are expected to give insights into a CEC column and also into the appropriate mobile phase conditions that should allow high efficiencies. The special case of mixed mode and charged stationary phases has been investigated.

The different models proposed, up to now in the literature, to estimate porosity have been compared and reconsidered for two types of CEC columns: packed and monolithic columns. With the aim to tackle a wide variety of CEC stationary phases (structure network, tortuosity, porosity, pore distribution, skeleton, chemical properties), we have investigated two different monolithic columns based on acrylate polymer and also two packed columns with mixed-mode stationary phases. Results reported by Gusev *et al.* [40] on poly-styrene divinyl benzene monoliths were also included to enlarge our study. Subsequently, we have proposed a model which, to our opinion, represents a good evaluation of the “actual electrokinetic“ porosity (AEP). This model and the actual electroosmotic mobility evaluation have been then applied to screen mobile phase conditions suitable for an embedded ammonium mixed mode stationary phase and to interpret the impact of the organic modifier content and of the buffer concentration in the mobile phase on the efficiencies obtained for peptide analysis.

MATERIAL AND METHODS

Reagents

Phenol, 3-methylphenol, 3,4 dimethylphenol, 3,4,5 trimethylphenol, Eledoisin, Epidermal Growth factor (EGf), arg-arg-gastrin fragment 22-30, valosin porcine, renin substrate tetradecapeptide, tetra and tri peptide Phe-Gly-Gly-Phe (FGGF) and Phe-Gly-Gly (FGG) were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). Acrylate monomers and other reagents were obtained from Acros Organics (Geel, Belgique). Butyl acrylate, 1,3-butanediol diacrylate, 3-(trimethoxysilyl)propyl methacrylate as adhesion promoter, 2-acrylamido-2-methylpropanesulfonic acid, 2,2'-azobis(2-methylpropionitrile) were purchased from Acros (Geel, Belgium). All chemicals have been used in the highest available purity grade, but without further purification.

Acetonitrile, ethanol analytical-grade were from Prolabo (Fontenay-sous-bois, France), DMSO, trizma-base and hydrochloric acid 1.0 M were from Sigma, sodium hydroxide 1.0 M was from VWR (Fontenay-sous-bois, France). Buffers and standard solutions were prepared with Milli-Q water (Millipore, Bedford, MA, USA) and were filtered through a 0.2 μm membrane (Millex, Millipore).

Apparatus

CEC experiments on packed capillary columns were carried out using a P/ACE MDQ Capillary Electrophoresis System equipped with a UV detector and a data handling system comprised of an IBM computer and Karat 32 software (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA).

CEC experiments on monolithic columns were performed using *Agilent^{3D} CE system* equipped with an DAD UV-detector and an external pressure device for CEC. Control of the chromatographic system and data acquisition were carried out by a Chemstation system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany).

Capillary columns

Particulate packed columns

Stationary phases: Stability BS-C23, end-capped, 5 μm , 300 and 100 \AA were provided by C.I.L. (Sainte-Foy-La-Grande, France). For capillary packed columns and associated CZE capillary, polyimide-clad fused silica capillaries with a 75 μm inner diameter (i.d.) and 375 μm outer diameter (o.d.) were purchased from Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA).

CEC columns containing bonded silica particles were packed in-house using a slurry packing technique as reported in the literature [20, 41]. Briefly, a stainless steel reservoir was constructed with an internal volume of approximately 70 μ l. One port of the reservoir was connected to an HPLC pump (Shimadzu LC 9 AD-VP); the other port allowed for the insertion of the fused-silica capillary for packing. Capillary stock was cut to lengths of 50 cm and fitted with a stainless steel mesh frit (2 μ m pores) in a removable inline mini micro filter (Upchurch, Oak Harbor, U.S.A.). Slurries were made at a concentration of 10 mg per 150 μ l of ACN. Columns were filled with ACN and packed with water. After packing, sintered frits of packed columns were subsequently fabricated with an ACF electrical burner (Innovatech, Stevenage, UK) while the capillary was still under pressure. The total length of the columns was 31.2 cm and the packed length was 9.8 cm.

Monolithic columns

For monolithic columns and associated CZE capillary, fused-silica capillaries with an internal diameter of 75 μ m and an outer diameter of 375 μ m, UV transparent, were purchased from Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA).

A silanisation procedure was carried out prior to *in situ* photopolymerization in order to ensure a covalent attachment of the polymer to the capillary wall.

The procedure for the production of these monolithic capillary columns was described previously [42]. Briefly, 2,2'-azobis(2-methylpropionitrile) was used as the radical photoinitiator (0.5% wt) and dissolved in the monomer mixture containing 69.2% of butyl acrylate (BA) or hexyl acrylate (HA), 30% of 1,3-butanediol diacrylate, 0.3% of the adhesion promoter: 3-trimethylsilyl propylmethacrylate and 0.5% of 2-acrylamido-2-methylpropanesulfonic acid in order to support the electroosmotic flow. The porogenic mixture was made up of 60% of ACN, 20% of 5 mM phosphate buffer at pH 7.1, 20% of ethanol. The ratio of monomer to porogenic solvent is 1:2. The mixture obtained is vortexed then deaerated by purging with nitrogen for about 10 minutes.

The detection window was made by hiding a part of the capillary to the UV light. The UV exposed part of the capillary forms the analytical column, followed by the unexposed part of the capillary comprising the detection window and the end of the capillary.

The filled capillary was subsequently placed in the UV cross-linker (Spectronics Corp, USA) for a total applied energy comprised between 6-8J/cm². After the polymerization has taken place, the capillary was installed on the ^{3D} CE instrument. A washing step using a mixture of ACN and 5 mM phosphate buffer pH= 7.1 (80:20 v/v) under pressure and voltage

(3-5 kV, 8×10^5 Pa for 30 min) then under pure voltage (15 kV for 60 min) was carried out in order to remove the remaining monolithic materials rapidly and to precondition the column.

CEC separation

CEC separations were performed on home-packed columns with Stability BS-C23 stationary phase (end-capped, 5 μm , 300 and 100 \AA).

The phosphate buffers at pH 2.5, with concentrations varying from 5 to 150 mM, were prepared by mixing appropriate volumes of stock solutions of phosphoric acid (1 M) and sodium hydroxide (1 M). pHs were measured in the aqueous phase before mixing with the specified ACN volume.

The working electrolytes were prepared by appropriate dilutions of ACN and buffer stock solutions. The organic solvent and the BGE were thoroughly degassed individually *via* ultrasonication for 15 min prior their use.

The samples were electrokinetically injected (5 kV, 10 s). All samples were detected at 200 nm. All experiments were carried out at 25°C and both column ends were pressurized during analyses at 2×10^5 Pa to prevent bubble formation. Unless indicated otherwise, total and effective capillary lengths were 31.2 cm and 9.8 cm, respectively; the internal diameter of the capillaries was 75 μm and analyses were made under 15 kV, with a voltage ramp of 0.5 min.

THEORETICAL BACKGROUND

EOF evaluation

The apparent electroosmotic mobility ($\mu_{eo\ app}$) was calculated as usual and as follows:

$$\mu_{eo\ app} = \frac{L_{packed} L_{tot}}{t_{eo\ packed} V} \quad (1)$$

where $t_{eo\ packed}$ is the migration time of the unretained and neutral tracer in the packed segment, V the applied voltage. L_{packed} and L_{tot} are the packed and total lengths of the capillary column, respectively.

This apparent electroosmotic mobility does not take into account the fact that the CEC columns are filled by the stationary phase. Rathore *et al.* [37,43] proposed the evaluation of an actual electroosmotic mobility generated in the interstices of the CEC columns. In this model, it is assumed that the resistances in packed and open segments of a duplex CEC column are different. Consequently, V is distributed across the packed and the open segments according to the relative magnitude of the resistance. The voltage across the packed segment of the column (V_{packed}) may be estimated by measuring i_{open} and i_{packed} , which are the current intensities through respectively, an open capillary and the CEC column and using the following equation:

$$V_{packed} = V \left(1 - \frac{i_{packed} L_{open}}{i_{open} L_{tot}} \right) \quad (2)$$

where L_{open} is length of the open segment of the CEC column.

Furthermore, the authors introduced the effective length of the flow path (L_e), which can be considered as higher than the value of L_{packed} owing to the tortuosity of the stationary phase. L_e can be deduced from the measured current intensities and calculated as follow:

$$L_e = L_{tot} \sqrt{\frac{i_{open}}{i_{packed}}} - L_{open} \quad (3)$$

The actual electroosmotic mobility ($\mu_{eo\ packed}$) which represents the real EOF mobility inside the packed section has been expressed in a similar manner to Eq. (1):

$$\mu_{eo\ packed} = \frac{L_e^2}{t_{eo\ packed} V_{packed}} \quad (4)$$

Tortuosity and porosity in capillary columns

Three main methods, used to estimate the porosity of the CEC columns, were reviewed by Gusev *et al.* [40]: the gravimetric method, the flow method and the conductivity-based methods.

Briefly, the gravimetric method is based on the weight difference between the dry and the solvent-filled packed column. The dead volume of the column can be deduced from this weight difference, providing that the density of the solvent is known.

In the flow method, analyses are made under pressure, using either CE apparatus running under the pressure mode or nano-HPLC apparatus. The volumetric-flow rate of the solvent, under a determined pressure, is estimated by measuring the elution time of an inert tracer in the open segment of the capillary column (injection by the open segment side). The obtained flow rate represents the flow rate through the packed segment. So the liquid volume in the packed segment can be deduced from the flow rate and the elution time of the inert marker, injected at the packed segment side, under otherwise identical separation conditions (mobile phase, pressure).

Electrical conductivity measurements in porous media have been used since a long time for the evaluation of the porosity and the permeability of different rock samples in geology [44-48]. These models are applicable as long as the porous stationary phase is non-conducting [40, 49]. It consists in filling the CEC column and an open tube of exactly the same dimension, with the mobile phase and in measuring the intensity of the currents generated in both capillaries, under the same applied voltage and otherwise identical conditions. The current values i_{open} and i_{packed} , obtained for CEC columns and open capillary in CZE respectively lead to the ratio of the conductivity (Φ) of the packed segment (σ_{packed}), and of the open capillary (σ_{open}).

This conductivity ratio can be estimated by the equation proposed by Chen *et al.* [50]:

$$\Phi = \frac{\frac{L_{packed}}{L_{tot}}}{\frac{i_{open}}{i_{packed}} - \left(1 - \frac{L_{packed}}{L_{tot}}\right)} \quad (5)$$

Table 1 lists the most common equations reported in the literature to determine the total porosity (ε_T) of a given CEC column and which derived from the conductivity ratio evaluation.

According to Chen *et al.* [50], the conductivity ratio represents the product of tortuosity (γ) and porosity factors:

$$\Phi = \gamma \varepsilon_T \quad (6)$$

In this study we have also proposed another equation that takes into account the actual tortuosity as introduced by Rathore *et al.* [51]. This parameter can be estimated from L_{packed}/L_e (Eq. (3)), and from the conductivity ratio estimated according to Eq. (5). This equation measures the “actual electrokinetic” porosity (AEP) of a given column under strictly experimental CEC conditions:

$$\Phi = \frac{L_{packed}}{L_e} \varepsilon_T \quad (7)$$

Equivalent pore size in the stationary phase

The equivalent pore size (d_{pore}) represents the mean pore diameter of flow path in packed or in monolithic columns and not that of particles. The estimation of equivalent pore size is based on permeability B° which could be calculated *via* Darcy’s law:

$$B^\circ = \frac{\eta L_{packed} u}{\Delta P} \quad (8)$$

where η is the viscosity of the mobile phase, u is the mobile phase velocity, ΔP is the applied pressure drop.

The Kozeny-Carman equation [52] (Eq. 9) links the pore diameter to the permeability B° and the porosity ε_T :

$$d_{pore} = 2 \sqrt{\frac{5 B^\circ}{\varepsilon_T}} \quad (9)$$

Mobile phase velocity was deduced from injection of acetone plug in CEC capillary at the outlet (open) capillary side. Then, a pressure of 7 bars was applied, to move the mobile phase containing the acetone plug, from the outlet side to the detection window of the capillary.

RESULTS AND DISCUSSION

Choice of porosity evaluation model

The porosity factor informs on effective portion of the stationary phase that really participates to the CEC separation. The estimation modes of the porosity are still in discussion and, based on the literature, many models and equations have been proposed to evaluate porosity in CEC columns.

We have compared the different models of porosity estimation on two types of CEC columns: (i) packed capillary columns with bonded silica particles of 5 μm , with pore diameters of 100 or 300 Å and (ii) two types of monolithic capillary columns based on butyl or hexyl acrylate polymer. To gain understanding, we have integrated and reexploited results published by Gusev *et al.* [40] on copolymers of styrene and divinylbenzene (PS-DVB) monolithic capillary columns. Fig. 1 displays a comparative plot of the total porosity values calculated by gravimetric, flow and conductivity-based methods. Among the 6 methods relying on conductivity ratio estimation, 5 are based on empirical laws (which equations are presented in Table 1). In addition, we have also introduced a new conductivity-based method that requires only electrokinetic parameters and actual flow path length for the estimation.

Porosity estimated by gravimetric method showed that values ranged from 0.67 to 0.85. For packed columns, porosities values are close to those generally reported for HPLC columns ($\cong 0,8$) [53]. In addition, we can note that four on the five CEC columns investigated exhibit very close porosity values, with difference of less than 6% for both monolithic and packed columns. This suggests that the gravimetric-based method is not able to discriminate columns.

If we consider the evaluation based on the flow porosity, a wide range of values from 0.41 to 0.75 is covered. In the case of monoliths, flow method, which derived from porosity factor employed in HPLC, leads to value in good agreement with gravimetric porosity. This indicates that mobile phase has a satisfactory accessibility under pressure to macro- and mesopores of the investigated monoliths. For packed columns, the difference is more pronounced probably due to limited diffusion of mobile phase in the pores under pressure.

We have then compared the porosity values obtained from the common equations based on the evaluation of the conductivity ratio. The porosities estimated from these methods are, globally, lower than the total porosities obtained by gravimetric and flow methods for our home-made packed and monolithic columns. The interstitial porosities of standard packed columns are generally around 0.4-0.45 [33, 53]. Thus, the calculated values of porosity lie therefore between the interstitial and the total porosities expected for one column. The

conductivity-based methods show quite different porosity values for four CEC columns which presented similar values from gravimetric evaluations. Those results suggest that conductivity-based methods should be able to discriminate more efficiently columns with very different properties (functionalities, charge density, pore structure). It must be highlighted that gravimetric and the flow methods cannot be employed under CEC operating conditions. Thus, it is not surprising that they cannot give an accurate estimation of porosity under experimental conditions. In addition these methods need delicate measurements (frits or wall anchorage may be deteriorate under pressure, need of dismantling operation to weight). During CEC experiments, the actual porosity lies probably between values obtained from the gravimetric and flow measurements. Indeed, the gravimetric method is expected to give the highest values of porosity, while in flow method, access of mobile phase to the micro and meso-pores under pressure could be limited due to slow diffusion kinetics and give thereby porosity values lower than actual porosities in CEC conditions.

The structure of stationary phase in CEC columns is perhaps too far from soil and rock ones, and this could explain discrepancy between conductivity-based and gravimetric- or flow-based porosity evaluation. In addition, empirical models based on conductivity measurements may be valid only for a given category of macroscopic structures of column. For example, the Archie model, that takes into account the tortuosity and interconnectivity of the pore network of a stationary phase, has been reported by Gusev *et al.* [40] as the most adapted model to estimate the porosity of several styrene based monolithic columns they investigated. However, these monoliths exhibited quite high mean pore diameters (around 5 μm). Thus, it is not surprising to find, in our case, unrealistic and too low porosity values for the investigated columns when this parameter was estimated from the Archie model. This latter model may become not valid when dealing with CEC columns with small d_{pore} , like acrylate based monoliths or packed capillary columns. Indeed, in the present study, the investigated columns presented a wide distribution of mean pore diameters from 0.5 to 5 μm (Table 2). The lowest d_{pore} (0.5 and 0.6) were obtained for acrylate-based monoliths, while values 10 fold higher were attained for the PS-DVB monoliths reported by Gusev *et al.* [40]. Packed columns exhibited intermediate values of d_{pore} (1.0 and 1.1).

As we discussed above, the gravimetric method is not able to discriminate different columns and some of conductivity-based methods are relevant to estimate porosities only for specific types of columns. However, we failed to define among these latter methods, one allowing a realistic estimation of porosity for all kind of columns. So, we have examined a new conductivity-based method that employs the actual length estimated by Horvath method to

evaluate an “actual electrokinetic” porosity (AEP). In this method, we assume, according to Chen *et al.* work [50], that conductivity ratio is the product of tortuosity and porosity factor, and we estimated also the tortuosity by L_{packed}/L_e . As shown in Fig. 1, this method offers the most consistent values (e.g. between flow and gravimetric estimation) for the packed capillary and acrylated based monolithic columns. The values of the total porosity obtained with gravimetric and flow are two opposite extremes in between which lies the “actual electrokinetic” one (within the experimental error). The total porosity estimated with actual length is very attractive since this method is totally free of engineering history and is based only on electrokinetic theory. In addition, it has the advantage to be easy to determine experimentally and to be suitable for the characterization of CEC packed columns, as well as monolithic ones.

Influence of analytical conditions

In view of the previous results, we have employed the AEP and actual electroosmotic mobility to estimate the effect of mobile phase composition on the performances of one mixed-mode stationary phase, Stability BS-C23 with pore diameter of 300 Å, for the analysis of both neutral and charged compounds, such as phenols and peptides.

First, we have investigated the effect of ACN content in the mobile phase on the actual electroosmotic mobility and AEP measured. ACN percentages from 20% to 80% were studied while keeping the ionic strength constant in the mobile phase. Inspection of the curve in Fig. 2 showed a slight decrease of AEP at high organic modifier levels. As a good correlation between the AEP and the theoretical viscosity of water/ACN mixtures ($R^2=0.993$), we considered the viscosity to be the key contributor to this trend. However, we cannot exclude that the presence of the quaternary ammonium embedded in the mixed-mode stationary phase, making the grafts poorly solvated at high ACN percentages, induce a decrease of the AEP. This hypothesis was also supported by a microscopy observation of the column after a long-period of CEC experiments (over 1h), performed using a 80% ACN containing mobile phase. Indeed, the capillary column exhibited often dark regions which revealed the presence of dry-out sections. Probably, both drying-out and viscosity effects explain the tendency of AEP to decrease at elevated ACN contents.

To ascertain that “porosity” could give insight into the wettability of a stationary phase under specific conditions, we attempted to introduce in the mobile phase amphiphilic species such as heptan sulfonic acid (HSA), that are prone to bind to octadecyl functionalities increasing thereby the BS-C23 wettability. AEP evaluated at 20, 40 and 60% of ACN in the mobile phase, without and with 1 mM HSA added in the mobile phase, are plotted in Fig. 3.

From 20 to 60% of ACN, the presence of HSA led to a slight increase of EAP. Although this was not statistically significant, this effect seems to be more pronounced at 60 % of ACN and supports the hypothesis of an improvement of the wettability of the stationary phase in the presence of HSA.

More surprisingly, the actual electroosmotic mobility exhibited only limited increase (< 8%) with the ACN content increases from 20 to 80 %. For CEC capillary systems packed with reversed phase particles electroosmotic mobility is expected to increase as the organic solvent content of the mobile phase increases [24, 54]. In our case, the mixed mode stationary phase ensures a nearly constant EOF.

To compare the effect of the organic modifier nature on the actual EOF, we have replaced in the mobile phase ACN by methanol keeping the same percentage (60%). In this case the two mobile phases present very close dielectric constants (52.7 and 53.7). Actual EOF undergoes the expected decrease of intensity with MeOH considering the associated decrease of dielectric constant viscosity ratio (ϵ/η). We obtained strictly identical AEP values and similar efficiencies for neutral phenols. Thus, the organic modifier change does not modify the mobile phase repartition nor improve the phase wettability but seems to influence the actual EOF as well.

We have then investigated the effect of the buffer concentrations at a fixed ACN percentage (30%) in the mobile phase. Fig. 4A highlights a strong dependence of AEP on the electrolyte concentration. AEP increases with the buffer concentration in the mobile phase until an asymptotic curve behaviour for concentrations above 17.5 mM. It is generally admitted that the effects of the double layer overlap are significant only when the ratio of the channel diameter to the double layer thickness is smaller than 10. Thus, dealing with a stationary phase with nominal pore diameter of 300 Å, the double layer overlap will take place, theoretically, as soon as the concentration reaches 10.2 mM. The curve inflexion in the range 7-17.5 mM and the asymptotic behaviour at higher buffer concentrations are in a good agreement with the assumption of a double layer overlap. It is well-known that interstitial porosity generally stands from 0.4 to 0.45 [53]. Thus, the AEP of 0.46 observed at the lowest buffer concentration is probably linked to the loss of perfusive flow, and means that penetration of compounds in the pore of the silica particles is restricted at low buffer concentration and may only occur through diffusion phenomenon like in HPLC process.

Attempts to detect the effect of buffer concentration on the apparent electroosmotic mobility demonstrated that this parameter is totally independent of the buffer concentrations (Fig. 4B). On the contrary, the actual electroosmotic mobility undergoes a strong intensity

decrease with the increase of ionic strength. This discrepancy between the two parameters may be explained by the fact that the apparent electroosmotic mobility is the superposition of two opposite phenomena that are both associated to a reduction of the double layer thickness (according to Smoluchowski model): (i) the reduction of the EOF mobility, and (ii) the establishment of a perfusive flow which decreases the tortuosity and increases thereby, the apparent EOF velocity. In contrast to apparent electroosmotic mobility, actual electroosmotic mobility measures properly the EOF in the packed section, taking into account the flow path.

We have investigated the impact of the variation of AEP on the efficiency to define if these parameters are relevant to predict which are the “optimal” mobile phase conditions for a given stationary phase. Buffer concentration increase (accompanied by an AEP increase) induces a favourable effect on the efficiencies obtained for a series of neutral substituted and non substituted phenols (Fig. 5). Plates per meter of 130,000 to 175,000 were attained for trimethylphenol and phenol respectively for a concentration of 52 mM of buffer in the mobile phase. The high buffer concentrations not only ensure a flat velocity profile for this EOF but also restore the transport of analytes through the pores, facilitated by the perfusive EOF. The existence of a perfusive EOF, that can be evidenced by high AEP values, decreases the compound dispersion and appears to be the determinant factor to achieve high efficiencies, in the case of neutral compounds.

For the charged compounds the situation is more complicated and analysis of five different peptides indicates that two categories of behaviour can be distinguished: (i) peptides which, similarly to the neutral compounds, undergo a continuous and slight increase of efficiency with the buffer concentration (like renin substrate), (ii) peptides exhibiting a maximum of efficiency for one given buffer concentration (Fig. 5B). For this latter category, probably more sensitive to electrokinetic phenomenon variation, a compromise has to be found. Although many other parameters should intervene, this compromise fell off between a high AEP (thus a high chromatographic surface, reduced diffusion and EOF with a flat flow profile) and a sufficient EOF intensity. Both AEP and actual electroosmotic mobility have to be considered for this kind of charged compounds. However the four peptides present an optimal efficiency for different buffer concentrations (from 35 to 70 mM). Thus the efficiency may not be predicted fully from a comprehensive study of AEP and actual electroosmotic mobility. The optimal concentration is rather peptide-dependent and probably strongly linked to the physico-chemical properties of each peptide.

CONCLUSION

The present approach to characterize the state of the stationary phase under specific conditions seems quite useful to predict CEC conditions allowing the best efficiency. As a first advantage, the evaluation of AEP and actual electroosmotic mobility can be performed under realistic CEC separation conditions. Second, this model may be applied to all kind of CEC column including monolithic with different kind of polymers and particulate mixed-mode packed one. The application of this approach to study the impact of the mobile phase condition on the efficiency attained with a mixed mode stationary phase Stability BS-C23 containing an embedded ammonium group showed that for neutral product and some peptides, monitoring of AEP allowed the determination of the suitable range of mobile phase conditions allowing to achieve the highest performances for a CEC separation (efficiency, sufficient wettability, flat flow profile, perfusive flow). However, in the case of charged peptides, both AEP and actual EOF have to be taken into account to estimate the optimal mobile phase conditions. Given their relevance to predict the suitability of mobile phase conditions, to understand the nature of the EOF involved, to give insight into analysis efficiency in porous structure, we see these parameters based on porosity and EOF studies as a rich area for exploration of the best CEC conditions.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Beckman-Coulter France for his support and Cluzeau Info Labo for the kind gift of the stationary phase materials

REFERENCES

- [1] Lelièvre, F., Yan, C., Zare, R. N., Gareil, P., *J. Chromatogr. A*, 1996, 723 145-156
- [2] Ståhlberg, J., *Anal. Chem.* 1997, 69, 3812-3821
- [3] Rathore, A. S., Horváth, Cs., *Electrophoresis* 2002, 23, 1211-1216
- [4] Rathore, A. S., *Electrophoresis* 2002, 23, 3827-3846
- [5] Dittmann, M. M., Masuch, K., Rozing, G. P., *J. Chromatogr. A*, 2000, 887, 209-221
- [6] Huber, M. I., Hennessy, T. P., Lubda, D., Unger, K. K., *J. Chromatogr. B* 2004, 803, 137-147
- [7] Piraino, S. M., Dorsey, J. G., *Anal. Chem.* 2003, 75, 4292-4296
- [8] Wang, G., Lowry, M., Zhong, Z., Geng, L., *J. Chromatogr. A* 2005, 1062, 275-283
- [9] Smith, N. W., Evans, M. B., *Chromatographia* 1995, 41, 197-203
- [10] Smith, N., Evans, M. B., *J. Chromatogr. A* 1999, 832, 41-54
- [11] Steiner, F., Lobert, T., *Chromatographia* 2003, 58, 207-212
- [12] Walhagen, K., Unger, K. K., *Anal. Chem.* 2001, 73, 4924-4936
- [13] Progent, F., Taverna, M., *J. Chromatogr. A*, 2004, 1052, 181-189
- [14] Yang, C., El Rassi, Z., *Electrophoresis* 2000, 21, 1977-1984
- [15] Colón, L. A., Reynolds, K. J., Alicea-Maldonado, R., Fermier, A. M., *Electrophoresis* 1997, 18, 2162-2174
- [16] Colón, L. A., Burgos, G., Maloney, T. D., Cintrón, J. M., Rodríguez, R. L., *Electrophoresis* 2000, 21, 3965-3993
- [17] Colón, L. A., Maloney, T. D., Fermier, A. M., *J. Chromatogr. A* 2000, 887, 43-53
- [18] Pyell, U., *J. Chromatogr. A* 2000, 887, 257-278
- [19] Angus, P. D. A., Demarest, C. W., Catalano, T., Stobaugh, J. F., *J. Chromatogr. A* 2000, 887 347-365
- [20] Boughtflower, R. J., Underwood, T., Paterson, C. J., *Chromatographia*, 1995, 40, 329-335
- [21] Mc Keown, A. P., Euerby, M., Lomax, H., *J. Sep. Sci.* 2002, 25, 1257-1268
- [22] Ping, G., Zhang, W., Zhang, L., Schmitt-Kopplin, P., Zhang, Y., Kettrup, A. *Chromatographia* 2003, 57, 629-633
- [23] Ping, G., Schmitt-Kopplin, P., Hertkorn, N., Zhang, W., Zhang, Y., Kettrup, A., *Electrophoresis* 2003, 24, 958-969
- [24] Walhagen, K., Huber, M. I., Hennessy, T. P., Hearn, M. T. W., *Biopolymers* 2003, 71, 429-453
- [25] Norton, D., Zheng, J., Shamsi, S. A., *J. Chromatogr. A* 2003, 1008, 205-215

- [26] Norton, D., Shamsi, S. A., *J. Chromatogr. A* 2003, 1008, 217-232
- [27] Jiskra, J., Jiang, T., Claessens, H. A., Cramers, C. A., *J. Microcol. Sep.* 2000, 12, 530-540
- [28] Kornyšova, O., Maruška, A., Owens, P. K., Erikson, M., *J. Chromatogr. A* 2005, 1071, 171-178
- [29] Orlandini, S., Furlanetto, S., Pinzauti, S., D'Orazio, G., Fanali, S., *J. Chromatogr. A* 2004, 1044, 295-303
- [30] Brunnkvist, H., Karlberg, B., Gunnarsson, L., Granelli, I., *J. Chromatogr. B* 2004, 813, 67-73
- [31] Zhang, Y., Shi, W., Zhang, L., Zou, H., *J. Chromatogr. A* 1998, 802, 59-71
- [32] Henry, M. P., Ratnayake, C. K., *J. Chromatogr. A*, in Press
- [33] Wan, Q.-H., *Anal. Chem.* 1997, 69, 361-363
- [34] Valette, J.C., Bizet, A.C., Demesmay, C., Rocca, J. L., Verdon, E., *J. Chromatogr. A* 2004, 1049, 171-181
- [35] Enlund, A. M., Hagman, G., Isaksson, R., Westerlund, D., *Trends in analytical chemistry* 2002, 21, 412-427
- [36] Pucci, V., Mandrioli, R., Raggi, M. A., Fanali, S., *Electrophoresis* 2004, 25, 615-621
- [37] Rathore, A. S., Horváth, Cs., *Anal. Chem.* 1998, 70, 3069-3077
- [38] Stol, R., Poppe, H., Kok, W. Th., *Anal. Chem.* 2001, 73, 3332-3339
- [39] Stol, R., Kok, W. Th., in: Rathore, A. S., Guttman, A. (Eds), *Electrokinetic Phenomena*, Marcel Dekker, New York, 2004, pp. 189-209
- [40] Gusev, I., Huang, X., Horváth, Cs., *J. Chromatogr. A* 1999, 855, 273-290
- [41] Frame, L. A., Robinson, M. L., Lough, W. J., *J. Chromatogr. A* 1998, 798, 243-249
- [42] N'gola, S., Fintschenko, Y., Choi, W.-Y., Shepodd, T. J., *Anal. Chem.* 2001, 73, 849-856
- [43] Rathore, A. S., McKeown, A. P., Euerby, M. R., *J. Chromatogr. A* 2003, 1010, 105-111
- [44] Slawinski, A., *J. Chim. Phys.*, 1926, 23, 710-727
- [45] Archie, G. E., *Trans. Am. Ind. Mining Met. Engrs.* 1942, 146, 54-62
- [46] Wyllie, M. R. J., Rose, W. D., *Nature*, 1950, 165, 972
- [47] W. O. Winsauer, H. M. Shearin, JR., P. H. Masson, M. Williams, *Bull. Am. Assoc. Petrol. Geologist*, 1952, 36, 253-277
- [48] De La Rue, R. E., Tobias, C. W., *J. Electrochem. Soc.* 1959, 106, 827-833
- [49] Bear, J., *Dynamics of fluids in porous media*, Dover publications, New York, 1988
- [50] Chen, L., Chen, L., Yan, X., Wan, Q.-H., *Anal. Chem.* 2001, 73, 987-996
- [51] Rathore, A. S., Wen, E., Horváth, Cs., *Anal. Chem.* 1999, 71, 2633-2641

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

[53] Unger, K. K., *Porous silica*, Journal of chromatography library, vol. 16, Elsevier, Amsterdam, 1979, pp. 169-186

[54] Dearie, H. S., Spikmans, V., Smith, N. W., Moffatt, F., Wren, S.A.C., Evans, K. P., *J. Chromatogr. A* 2001, 929, 123-131

Figure 1: Plots of the values of total porosity estimated according different models: gravimetric, flow and conductivity-based methods, for packed and monolithic CEC columns. Column $75\ \mu\text{m} \times 9.5 / 32.1\ \text{cm}$ (effective and total length) for packed columns and $75\ \mu\text{m} \times 8.5 / 34.9\ \text{cm}$ (effective and total length) for monolithic columns based on acrylate polymer. BGE: Phosphate buffer, pH 2.5, 50 mM / ACN, 70 / 30 (v / v), Voltage: 15 kV, Pressure: 20 psi, Temperature: 25°C.

Figure 2: Influence of the ACN percentages in the mobile phase on AEP. Capillary column: BS C23, 300Å, $5\ \mu\text{m}$, $75\ \mu\text{m} \times 9.5 / 32.1\ \text{cm}$ (effective and total length). BGE: Phosphate buffer, pH 2.5, 12.5 mM/ACN, from 20/80 to 80/20 (v / v). Values indicate mean of 3 analyses and bars the corresponding standard deviations. Other conditions are described in Fig.1.

Figure 3: Influence of the ACN content of the mobile phase on AEP, without any counter-ion, and with heptane sulfonic acid 1 mM added to the BGE. BGE: 37.5 mM phosphate pH 2.5/ ACN (from 80/20 to 40/60, v/v). EOF marker: dimethyl sulfoxide (DMSO) 3.3 mM-*M* dissolved in theBGE. Other experimental conditions are described in Fig. 2. Values indicate mean of 6 analyses and bars the corresponding standard deviations.

Figure 4: Influence of buffer concentrations on A) AEP, B) apparent (Δ) and actual (\diamond) electroosmotic mobility. 5 measurements were performed at each concentrations and values represent the mean (n=10) of data obtained on two capillaries. Phosphate buffer, pH 2.5, concentration from 5 to 150 mM/ ACN, 70 / 30 (v / v). Values indicate mean of 10 analyses and bars the corresponding standard deviations. Other experimental conditions are described in Fig. 1.

Figure 5: Influence of buffer concentrations on peak efficiencies obtained for: A) neutral compounds: phenol 0.07 mM (\blacklozenge), 3 methylphenol 0.09 mM (\blacksquare), 3,4 dimethylphenol 0.06 mM (\blacktriangle), 3,4,5 trimethylphenol 0.012 mM (\ast), B) Peptides: eledoisin 0.14 mM (\times), renin substrate porcine 0.1 mM (\blacktriangle), EGF 0.07 mM (\ast), FGG 0.018 mM (\blacklozenge), FGGF 0.012 mM (\blacksquare), with dimethyl sulfoxide (DMSO) 3.3 mM as the EOF marker. Samples were dissolved in the background electrolyte. Other experimental conditions are described in Fig. 4.

Table 1: Dependence of the conductivity ratio, Φ , on the total porosity, ε_T

Model	Equation	Reference
Wyllie	$\Phi = \varepsilon_T / \sqrt{2}$	46
Tobias	$\Phi = \varepsilon_T^{1.5}$	48
Archie	$\Phi = \varepsilon_T^{1.3}$	45
Winsauer/ Humble	$\Phi = 1.613 \varepsilon_T^{2.15}$	47
Slavinsky	$\Phi = \varepsilon_T / (1.3219 - 0.3219 \varepsilon_T)^2$	44

Table 2: Estimation of mean pore diameters of the different CEC columns investigated, according to Kozeny-Carman equation.

Columns	d_{pore} (μm)
packed column, Stability BS-C23, 300 Å	1.1
packed column, Stability BS-C23, 100 Å	1.0
monolithic column, BA	0.6
monolithic column, HA	0.5
monolithic column, PS-DVB, col. I	-
monolithic column, PS-DVB, col. III	4.7

Figures

Figure 1

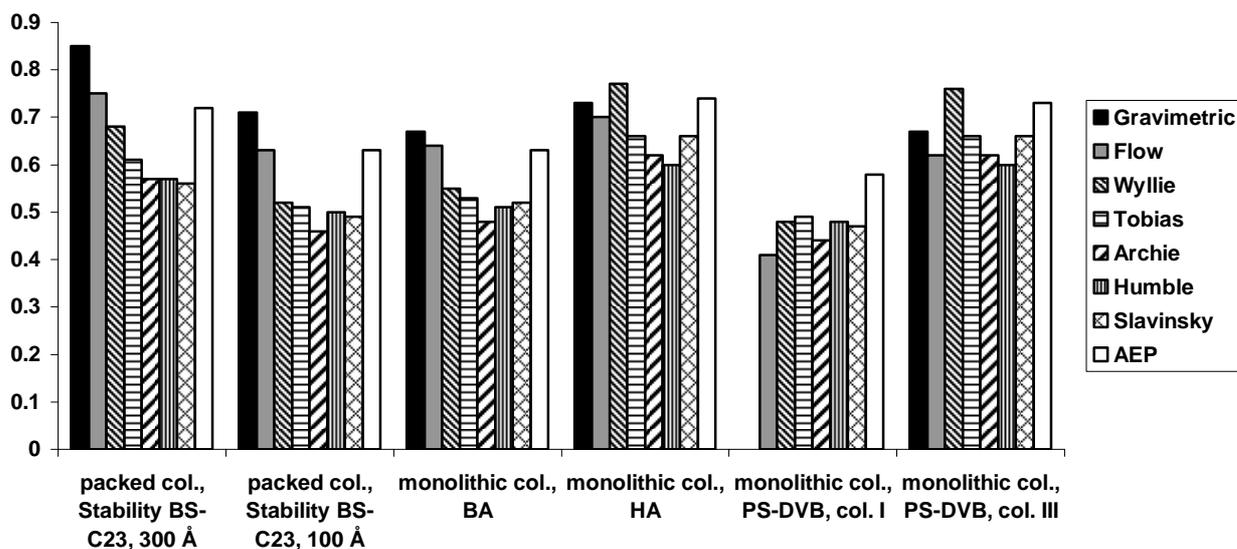


Figure 2

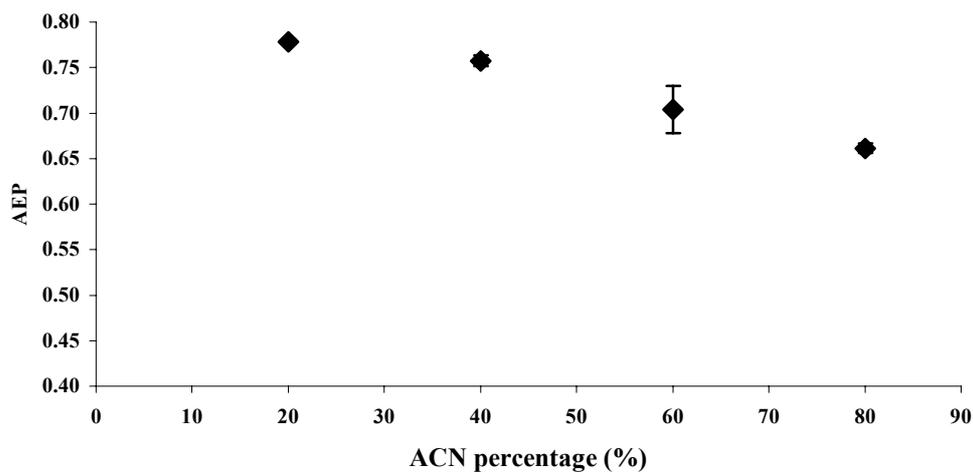


Figure 3

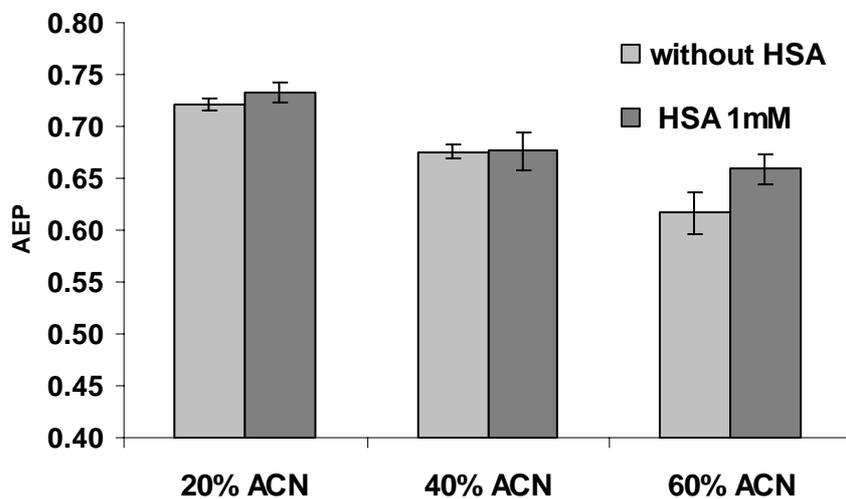
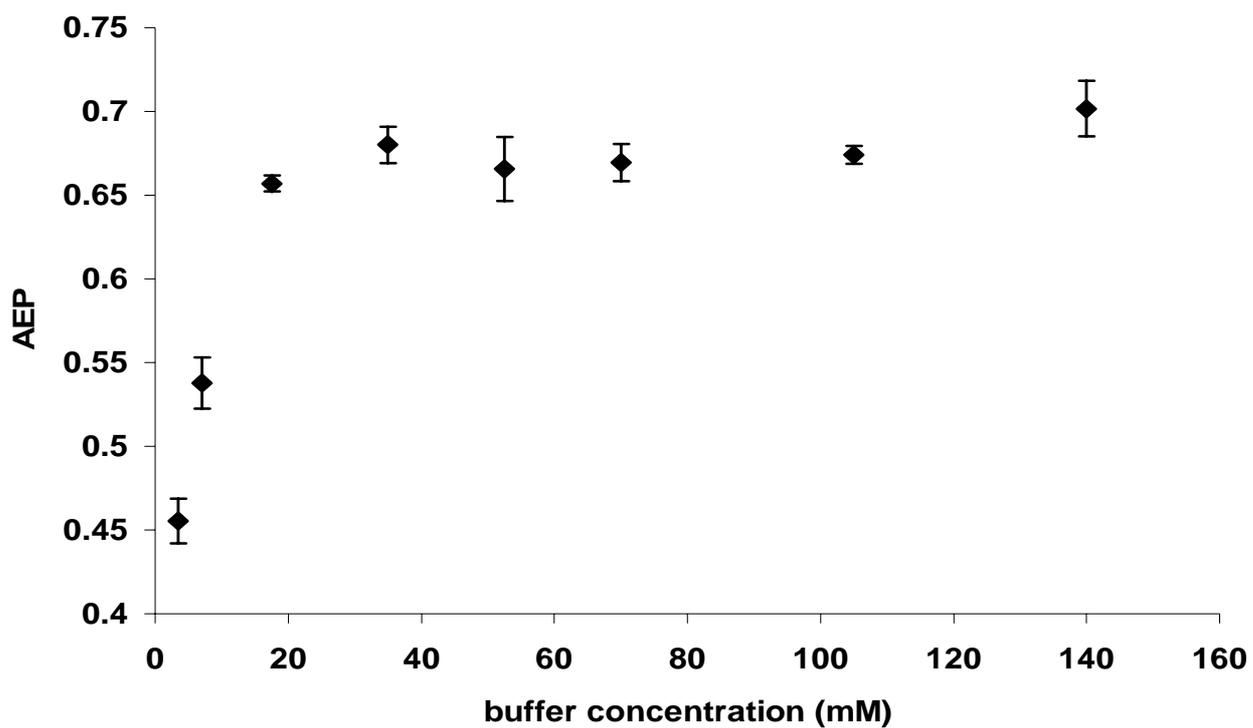


Figure 4

A)



B)

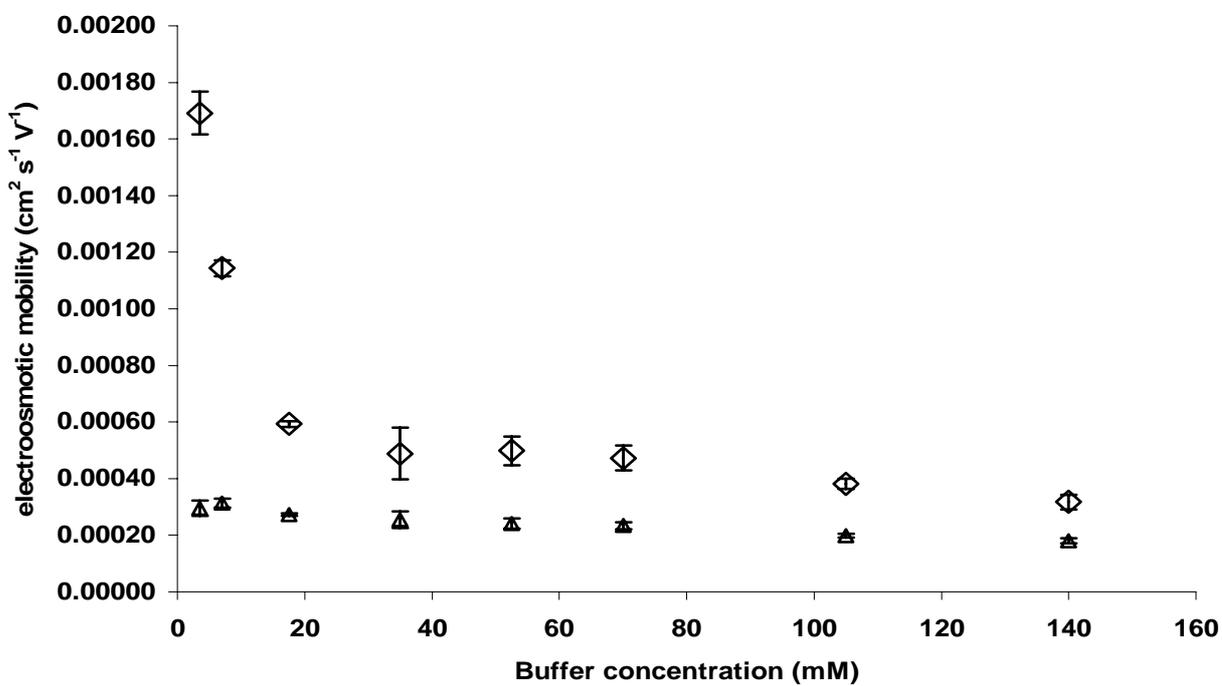
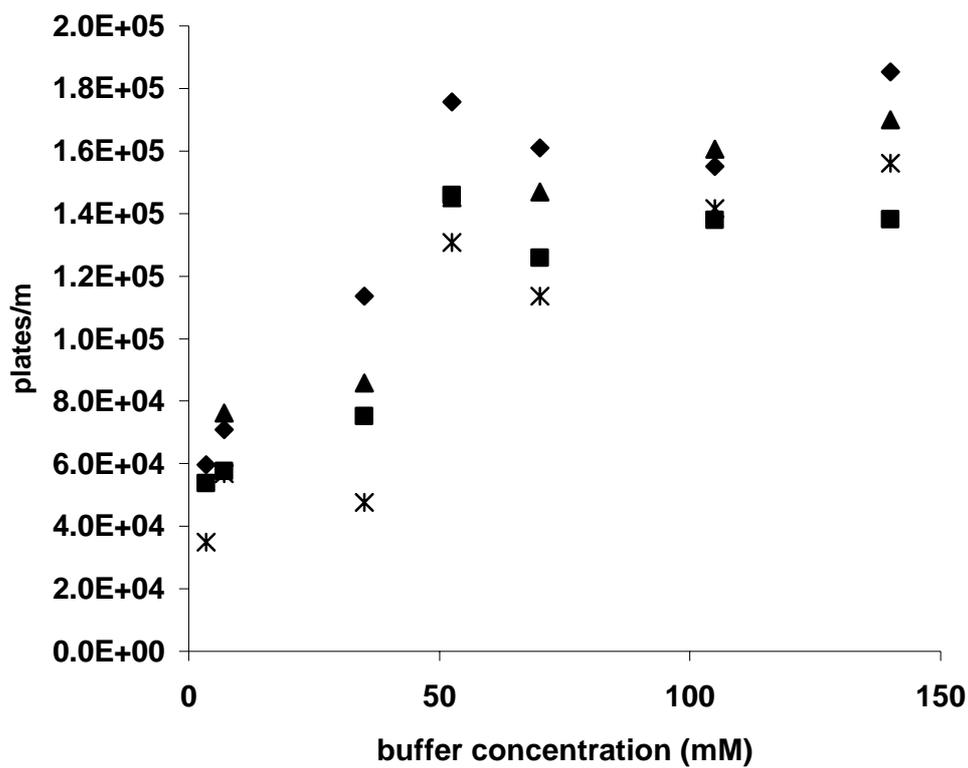
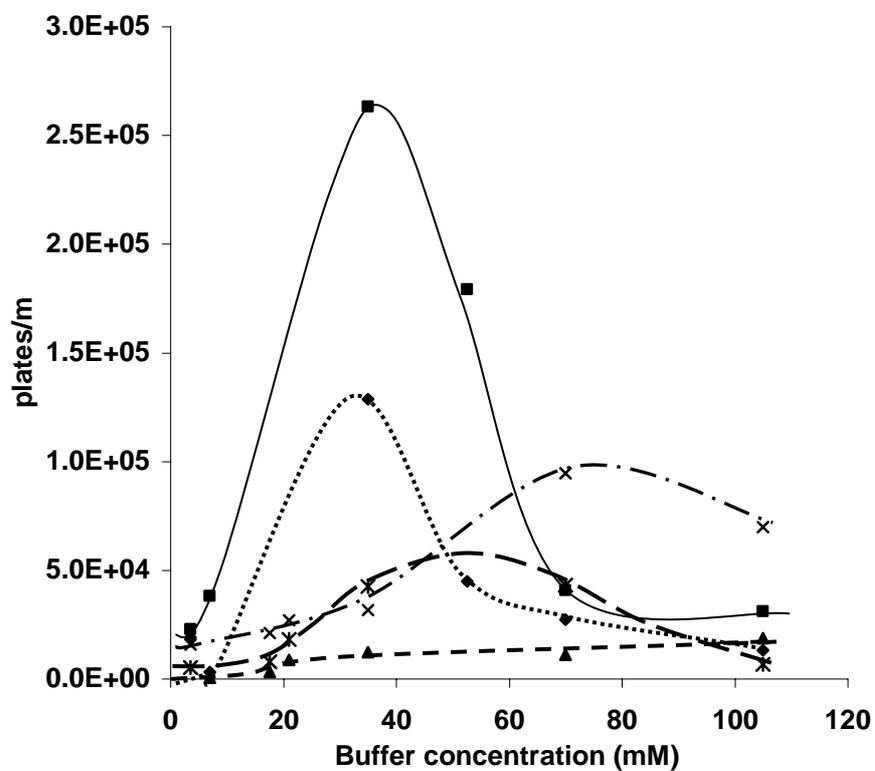


Figure 5

A)



B)



CHAPITRE VII

ECC DE PEPTIDES SUR LA PHASE

STABILITY BS-C23

ET

ETUDE DES MECANISMES DE RETENTION

Article 2

J. Chromatogr. A 1052, (2004), 181-189

Retention behaviour of peptides in capillary electrochromatography using an embedded ammonium in dodecacyl stationary phase

F. PROGENT, M. TAVERNA

Article 3

A soumettre

Chromatographic behaviour of peptides on a mixed mode stationary phase with an embedded polar and charged group by capillary electrochromatography and HPLC.

F. PROGENT, C. SMADJA, A. BANCO, A. TCHAPLA, M. TAVERNA

INTRODUCTION

Les peptides sont des composés particulièrement intéressants à analyser et ceci dans de nombreux domaines (analyses pharmaceutiques, agroalimentaires, biologiques...). C'est dans le cadre de mélanges peptidiques complexes que j'ai voulu explorer les capacités de l'ECC ainsi que celles d'une phase stationnaire mixte de nouvelle génération : la Stability BS-C23.

J'ai présenté au chapitre II l'intérêt de travailler, en ECC, sur une phase stationnaire mixte cationique à groupement inséré, et la Stability BS-C23 est l'une des très rares phases stationnaires de ce type disponible. Citée en 2001 par Stella *et al.* [206] parmi près de 100 phases stationnaires recensées et par Major *et al.* [207] en 2002, peu de travaux avaient été effectués au début de ma thèse sur cette phase et sur les phases stationnaires mixtes cationiques en général. En effet, en CLHP, exceptés les travaux d'Engelhardt *et al.* en 2001 [202] qui notent une réduction de l'élargissement des pics et des phénomènes de rétention chromatographique différents pour les phases comportant un groupement polaire inséré, aucune expérience n'a été reportée sur la Stability BS-C23 avant celles effectuées en 2004 par Stella *et al.* [208] évaluant le potentiel de phases stationnaires pour l'analyse de composés basiques. Du point de vue ECC, seuls Steiner *et al.* [177], en 2001, ont envisagé la Stability BS-C23. Exceptés ces articles, aucune publication internationale n'est parue, à ma connaissance, concernant cette phase.

Stella *et al.* [208] ont effectué une vaste étude comportant 11 phases stationnaires différentes en CLHP. A l'issue de leur étude, la Stability BS-C23 offrait la meilleure symétrie de pic lors d'analyse de composés basiques. Une analyse en composante principale mettait en lumière le comportement original de cette phase.

Pour Steiner et Scherer [177], la Stability BS-C23 a principalement servi à titre comparatif pour évaluer des phases stationnaires mixtes qu'ils ont synthétisées. La Stability BS-C23 se caractérise par un FEO anodique. En outre, ils indiquent que la Stability BS-C23 présente un nombre de sites d'échange d'ions assez faibles, compte tenu du nombre important de groupements ammoniums décelés par analyse élémentaire. Les auteurs incriminent une gêne stérique, de fait les groupements ammoniums de la Stability BS-C23 doivent être beaucoup moins accessibles que pour les phases synthétisées par les auteurs. Le court article de Maisch [209] peut aussi être cité, paru en allemand en 2001 dans un périodique germanique, il mentionne brièvement cette phase.

J'ai choisi de réaliser mes études en milieu acide pour limiter les phénomènes d'adsorption des peptides sur les silanols résiduels, mais également car jusqu'à présent la

plupart des séparations de peptides et les cartes peptidiques de protéines sont réalisées en CLHP à polarité de phases inversée, sur des colonnes greffées octadécyle, en milieu acide. Les études de stabilité que j'ai effectuées (chapitre V) sur cette phase stationnaire ont montré sa stabilité satisfaisante à des pH aussi bas que 2,5.

Ce chapitre de ma thèse est consacré à des études sur le comportement chromatographique et électrochromatographique de peptides sur cette phase stationnaire. Dans une première étude qui est présentée à l'article 2, j'ai déterminé les caractéristiques de la phase Stability BS-C23 en ECC, en particulier l'intensité et l'évolution du FEO en fonction du pH et du pourcentage en ACN dans la phase mobile. J'ai particulièrement étudié la rétention de peptides modèles sur cette phase en ECC pour tenter de déterminer la part des différents phénomènes séparatifs en jeu. Grâce à des modèles mathématiques, j'ai pu découpler les phénomènes chromatographiques de ceux relevant de l'électromigration, ainsi j'ai pu observer des rétentions inattendues et en particulier, de faibles rétentions chromatographiques en ECC. J'ai tenté de confirmer ou d'infirmer les différentes hypothèses que j'avais émises pour expliquer ce comportement : (i) un FEO trop intense, (ii) des phénomènes propres à l'analyse sous champ électrique ou (iii) des caractéristiques particulières de la phase stationnaire Stability BS-C23. La meilleure connaissance du comportement de cette phase en ECC m'a permis de réaliser une carte peptidique de la β -lactoglobuline et de l'hormone de croissance humaine recombinante dans des conditions isocratiques et en l'absence de toute pressurisation, ce qui n'avait jusqu'alors pas encore été possible.

Après avoir réfuté l'hypothèse selon laquelle, une répulsion électrostatique entre l'ammonium quaternaire et les peptides était responsable de la faible rétention, j'ai cherché à clarifier les phénomènes de rétention sur la Stability BS-C23 à l'aide d'une seconde étude fondée cette fois sur le comportement de peptides standards en CLHP, et qui fait l'objet de l'article 3. J'ai comparé cette rétention avec celle observée en ECC. Des différences fondamentales sont apparues entre les mécanismes de rétention chromatographique en ECC et en CLHP, comme l'avaient pressenties par le passé certains auteurs. Cette étude présente les différentes hypothèses pouvant être avancées pour expliquer cet écart.

Retention behaviour of peptides in capillary electrochromatography using an embedded ammonium in dodecacyl stationary phase

Frédéric Progent, Myriam Taverna*

Groupe de Chimie Analytique de Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, rue J.-B. Clément, 92290 Châtenay-Malabry, France

Received 20 January 2004; received in revised form 23 July 2004; accepted 20 August 2004

Abstract

The potential of a silica stationary phase bearing an embedded cationic quaternary amine in dodecacyl chain, to separate peptides by capillary electrochromatography (CEC) has been evaluated. The ability of this stationary phase, to generate a consistent anodic electroosmotic flow was first evaluated. This flow was found to be independent of pH over a wide range (2–12), of the acetonitrile percentage in the electrolyte. The stability of the stationary phase evaluated through the electroosmotic flow variations was demonstrated at extreme pH values (2.5 and 9.1). A careful examination of the influence of mobile phase conditions (acetonitrile percentage, salt concentration and nature of buffer) on the electrochromatographic retention and electrophoretic migration behaviour of different standard peptides was carried out. In acidic conditions, the electrokinetic contribution appears to be predominant compared to the chromatographic one. Several types of chromatographic interactions, reversed-phase partitioning and anion exchange, were involved in the CEC of peptides, whereas repulsive electrostatic interaction could be considered as negligible. This stationary phase affords different selectivity compared to that observed on a C₁₈ stationary phase. Finally, the method was applied to the peptide mapping of β -lactoglobulin and human growth hormone under unpressurized and isocratic elution.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Capillary electrochromatography; Peptide mapping; Electroosmotic flow; Stationary phase; Human growth hormone; β -Lactoglobulin; Mixed-mode stationary phase

1. Introduction

During the last few years, interest in capillary electrochromatography (CEC) for analytical applications has grown. One of the most important advantages of the CEC over HPLC is the flat profile of the electroosmotic flow (EOF) generated, which reduces the band broadening caused by transchannel and eddy diffusion. Thus, higher column efficiencies can generally be attained in CEC. Moreover, this microseparative technique can also reach relatively high separation speeds with the potential to simultaneously separate neutral and charged, hydrophilic and hydrophobic compounds in the same system. Thus, CEC represents an ideal technique to analyse complex mixture of peptides such as protein digests.

Protein mapping is now widely employed in protein characterization for proteomic applications as well as for routine control of recombinant proteins in the pharmaceutical industry. New techniques are sought which permit faster analysis of samples with high efficiency. Although HPLC is traditionally employed for peptide mapping, several authors have shown the potential of HPLC assisted by electrodriven, in other words pressurized CEC (pCEC) for the separation of protein digests [1–7]. Wu et al. [1] reported for the first time the analysis of two protein digests (bovine cytochrome *c* and chicken ovalbumine) by pCEC. This technique provides a means of tuning selectivity for the separation of charged analytes by varying the electric field. However, in most cases, an elution gradient is necessary requiring an instrument especially dedicated to CEC. pCEC methods reported for peptide mapping utilize mostly C₁₈ stationary phases [1–4,6], designed for HPLC, in combination with acidic mobile phases.

* Corresponding author. Tel.: +33 1 46 83 54 62; fax: +33 1 46 83 54 58.
E-mail address: myriam.taverna@cep.u-psud.fr (M. Taverna).

However, under these conditions, EOF is often too low and an external pressure is necessary to ensure a consistent flow.

While the residual silanol functions of C₁₈ stationary phases are not favourable for HPLC of peptides in acidic conditions due to the possible interaction between cationic peptides and anionic silanols, these functions generate the EOF in CEC. A major problem encountered in CEC with silica-based stationary phases is the inherent low EOF at low pH due to the neutralization of the silanol groups. The HPLC model quickly fails since the pH dependence of the flow rate, in capillaries packed with silica based particles, leads to separations of proteins and peptides at low pH, that are too slow.

The ideal columns for CEC have charge carrying groups that are compatible with a strong EOF at pH values over the range of ca. 2–9. One of the major obstacles to rapid growth of the CEC technique is the limited availability of specially designed stationary phases, which must exhibit strong EOF to speed up the analysis and must allow the separation of neutral and charged peptides.

Research have recently been directed towards the design of analytical capillary columns [8–14], with new chromatographic supports, e.g. polymeric monolith [11–14], as well as chromatographic functionalities, e.g. ions exchange packing or mixed mode packing. In this context, the use of silica-based mixed-mode stationary phases, i.e. phases combining both charge and hydrophobic groups, each fixed on the chromatographic support, is an attractive alternative. A specially designed anionic stationary phase for CEC has been developed by chemically bonding sulfonic acid and octadecyl groups onto silica [15–18]. Mixed-mode stationary phases with anion exchange groups have been also proposed for peptide mixture analysis, still via pressurized capillary electrochromatography [5,6].

Another type of mixed-mode stationary phase consists of charged and alkyl functionalities in the same coated-group. Within the context of monolithic column, fixed positive charges and alkyl moieties serving as hydrophobic binding sites were described but these new stationary phases were not employed for peptide separation [19,20]. Later Zhang et al. [21] reported the analysis of a protein digest (cytochrome c) on such a stationary phase by pure CEC on butyl-grafted monolithic columns.

Until now, no convincing results have been published on unpressurized CEC with a packed stationary phase for peptide mapping. In this paper, we have therefore tested the potential of a new stationary phase to perform peptide mapping without pressurisation or gradient elution. To generate a strong and stable EOF over a wide range of pH, a new stationary phase with a permanent positive charge Stability BS-C23 has been evaluated in this work. A quaternary ammonium group is covalently bonded via a spacer at the surface of silica support, forms a relatively hydrophilic and charged sublayer; while a non-polar upper layer of octadecyl functionalities plays the part of a hydrophobic binding layer (Fig. 1). In the present study, we have focused our investigation on acidic conditions, which are expected to reduce the severe peptide peak

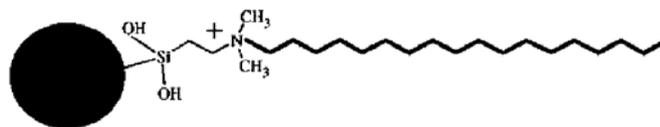


Fig. 1. Structure of the Stability BS-C23 stationary phase.

tailoring due to silanophilic interaction. Moreover, the ammonium functionality was expected to shield the silanols while permitting a large EOF.

A particular attention has been devoted to EOF studies on this ammonium embedded stationary phase. The potential of this stationary phase for the separation of peptides by CEC has been then evaluated and the influence of several parameters of the mobile phase, such as acetonitrile (ACN) percentages, salt concentrations in the buffer have been studied for different standard peptides. A careful examination of the chromatographic retention and electrophoretic migration behaviour of different standard peptides was carried out. Thus, we have, attempted to determine and distinguish the influence of experimental conditions on the contribution of each mechanism chromatographic versus migration. Stability of this stationary phase under extreme pH was addressed by a monitoring of the EOF evolution over 1 week. Finally, a tentative peptide mapping of β -lactoglobulin and human growth hormone (hGH) with isocratic elution was performed.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Eledoisin, eledoisin RP, epidermal growth factor (EGF), thyrotropin releasing hormone (TRH) precursor peptide, Arg-Arg gastrin fragment 22–30, valosin porcine, renin substrate tetradecapeptide, angiotensin I and [Gln¹¹]-amyloid β protein fragments 1–16 were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Analytical concentrations were: Arg-Arg gastrin 0.24 mM, valosine porcine 0.01 mM, eledoisin 0.14 mM, renin substrate porcine 0.1 mM, EGF 0.07 mM, angiotensin I 0.25 mM, eledoisin RP 0.38 mM, protein amyloïde 0.17 mM, TRH precursor peptide 0.33 mM with EOF marker dimethyl sulfoxide (DMSO) 3.3 mM in water. HPLC-grade ACN was from Prolabo (Fontenay-sous-bois, France), DMSO and hydrochloric acid 1.0 M from Sigma and sodium hydroxyde 1.0 M was from VWR (Fontenay-sous-bois, France).

The hGH, somatotropin SCR was a standard obtained from the European Pharmacopoeia (Strasbourg, France). β -Lactoglobulin 18 400 subunits and trypsin treated with *N*-*p*-Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK-trypsin) were from Sigma.

2.1.1. Apparatus

All CEC experiments were carried out using a P/ACE MDQ Capillary Electrophoresis System (Beckman Coulter,

Fullerton, CA, USA) equipped with an UV detector and a data handling system comprised of an IBM computer and Karat 32 software.

2.1.2. Protein digestion

The β -lactoglobulin was digested at 37 °C with TPCK-trypsin in 50 mM Tris-HCl buffer pH 8.0 containing 1 mM calcium chloride as described previously [22]. The enzyme was added to the incubation medium at an enzyme: substrate weight ratio of 1:100 at time 0, followed by a second addition after 1 h (ratio of 2:100 w:w). The digestion process was stopped after 3 h by addition of trifluoroacetic acid to a final concentration of 5% (v/v). The digest was desalted on octadecyl cartridge (J.T. Backer, Noisy le sec, France) with 0.1% TFA in ACN-water elution.

The hGH was digested at 37 °C according to the procedure described in European Pharmacopoeia, with a solution of 1 mg/ml of TPCK-trypsin, in 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.5. The enzyme was added to the incubation medium: substrate weight ratio of 1:100. The digestion process was stopped after 4 h by addition of trifluoroacetic acid to a final concentration of 5% (v/v). The digest was then stored at -20 °C.

2.1.3. Stationary phases and columns

Stationary phases: Stability BS-C23, endcapped and non-endcapped, 5 μ m, 300 and 100 Å, and Stability octadecyl were provided by C.I.L. (Sainte-Foy-La-Grande, France).

Fused-silica capillaries with an internal diameter of 75 μ m and an outer diameter of 375 μ m were purchased from Beckman Coulter.

All CEC columns used in this report were packed in-house using a slurry packing technique as reported in the literature [23,24]. Briefly, a stainless steel reservoir was constructed with an internal volume of approximately 70 μ l. One port of the reservoir was connected to an HPLC pump (Shimadzu LC 9 AD-VP); the other port allowed for the insertion of the fused-silica capillary for packing. Capillary stock was cut to lengths of 50 cm and fitted with a stainless steel mesh frit (2 μ m pores) in a removable inline mini micro filter (Upchurch, Oak Harbor, USA). Slurries were made at a concentration of 10 mg per 150 μ l of acetonitrile. Columns were filled with acetonitrile and packed with water. After packing, sintered frits of packed columns were subsequently fabricated with an ACF electrical burner (Innovatech, Stevenage, UK) while the capillary was still under pressure. The total length of the columns was 312 mm and the packed length was 98 or 203 mm.

To estimate the stability of the stationary phase under extreme pH values, two independent capillary columns were exposed to either an acidic buffer (phosphate buffer, ionic strength 10 mM, pH 2.5-ACN, 40:60, v/v) or alkaline buffer (Tris-HCl, ionic strength 10 mM, pH 9.1-ACN, 40:60, v/v) under an applied voltage of -5 kV and during a period of 7 days. The EOF was measured everyday, six times by injecting a DMSO solution (4 mM in water, for 10 s at -5 kV).

2.1.4. CEC separation

Buffers used in this study, were prepared using Milli-Q water (Millipore, Molsheim, France) filtered through a 0.2 μ m membrane (Millex, Millipore). Tris-HCl and phosphoric acid (reagent grade), used in the preparation of background electrolyte solutions, were purchased from Sigma. Adjustments of pH of the electrolyte solutions were achieved through the addition of hydrochloric acid 1.0 M or sodium hydroxyde 1.0 M. pHs were measured in the aqueous phase before mixing with the specified ACN volume. The organic solvent and the background electrolyte were thoroughly degassed individually via ultrasonication for 15 min prior their use.

The samples were injected hydrodynamically under 1.7×10^5 Pa for 100 s. All samples were detected at 200 nm. All experiments were carried out at 25 °C and both column ends were pressurized at 6.9×10^5 Pa to prevent bubble formation. Except as otherwise specified, columns packed with end-packed Stability BS-C23, 300 Å, 5 μ m, 31.2 cm (effective length 9.8 cm) \times 75 μ m were employed and analyses were made under -15 kV, with a voltage ramp of 0.5 min.

2.2. Capillary zone electrophoresis (CZE) separation

To study the different mechanisms (chromatographic versus electro-migration) involved in CEC, the electrophoretic mobilities of peptides were estimated by CZE using the same buffer conditions. The CZE capillary was a fused silica capillary, 32.1 cm (21 cm effective length) \times 75 μ m. In between runs, the capillary was rinsed step-wise by water (1 min), 0.1 M NaOH (3 min), water (1 min) and the running buffer (5 min). The samples were introduced into the capillary by applying a pressure of 6.9×10^2 Pa for 5 s. Other separation conditions were as in CEC analyses.

2.3. Retention factor

All CEC analyses included a ramp time in voltage. The elution times were therefore corrected, using the following equation [25] (Eq. (1)):

$$t_i = t_{i \text{ measured}} - \frac{1}{2} t_{\text{ramp}} \quad (1)$$

where t_i is the corrected elution time, $t_{i \text{ measured}}$ the elution time obtained experimentally and t_{ramp} is the duration of voltage ramp.

The CEC retention factor (k_{CEC}), calculated in this study is analogous to the retention factor employed in HPLC, excepted that it represents the contribution of both electrochromatographic retention and electrophoretic migration. The value of k_{CEC} can then be calculated according to Eq. (2):

$$k_{\text{CEC}} = \frac{t_i - t_{\text{eof}}}{t_{\text{eof}}} \quad (2)$$

where t_i is the corrected elution time of the analyte and t_{eof} is the corrected elution time of the neutral and unretained component DMSO. However, the CEC system can be defined by a combination of a "retention factor" (k_c) that estimates

the electrochromatographic retention in CEC and a velocity factor (κ_e) that characterizes the electrophoretic migration.

The parameter k_c can be estimated by Eq. (3), where the product $t_i(1 + \kappa_e)$ represents the retention time of the peptide in the absence of electrophoretic migration.

$$k_c = \frac{t_i(1 + \kappa_e) - t_{\text{eof}}}{t_{\text{eof}}} \quad (3)$$

According to Rathore et al. [26], κ_e can be estimated by the following ratio (Eq. (4)):

$$\kappa_e = \frac{\mu_{\text{cp}}}{\mu_{\text{eo packed}}} \quad (4)$$

where the electrophoretic mobility μ_{cp} is obtained from separated CZE measurements for each peptide, using the same buffer conditions. $\mu_{\text{eo packed}}$ represents the electroosmotic mobility in the packed portion of the capillary and is calculated from the migration time of an EOF marker (Eq. (5)).

$$\mu_{\text{eo packed}} = \frac{L_c^2}{t_{\text{eof}} V_{\text{packed}}} \quad (5)$$

where V_{packed} and L_c are an estimation of, respectively, the potential drop across the packed segment of the column and the length of the actual flow path followed by the marker traversing the packed segment. These parameters can be calculated from the values of current generated in fused silica capillary and packed columns [27]. To this purpose, capillaries having different portions of packed sections of BS-C23 ($L_{\text{packed}} = 9.5$ and 20 cm, for a total length of 31.2 cm) were employed.

3. Results and discussion

3.1. Electroosmotic flow

Following column fabrication, the dependence of the reduced plate height (h) on the migration velocity for naphthalene through the BS-C23 packed capillary was studied by varying the applied voltage to evaluate the packing quality and column performances. As shown in Fig. 2, the Van Deemter curves recorded for a retained but non-charged tracer (naphthalene) showed the expected shape generally observed in CEC, i.e. a low C-term and hence a plot largely dominated by the A- and B-terms. Mass transfer contribution to the plate height is small, even at higher velocity. Reduced plate height ($h = 1.4$, $N = 160\,000$ plates/m) becomes almost independent of mobile phase velocity, for velocities higher than 0.05 cm/s indicating that high velocity and also high speed of analysis could be attained without a loss in efficiency. No significant differences were observed with the 300 and 100 Å pore size stationary phases except at low velocities where 300 Å pore size stationary phase affords a slightly higher efficiency.

On the other hand, several experiments were conducted to estimate the magnitude of the EOF in this capillary as a

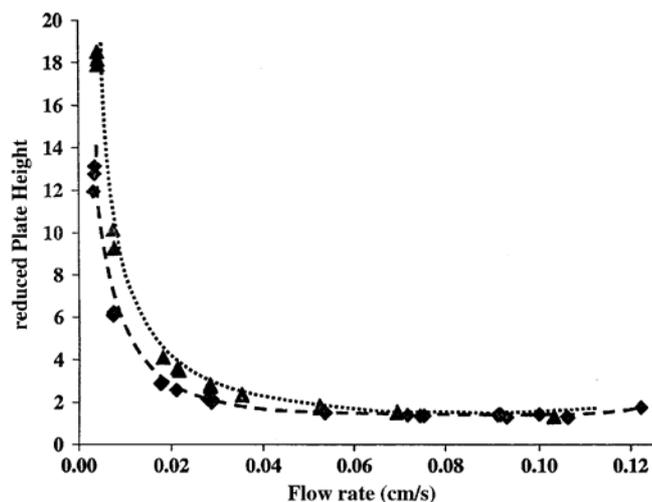


Fig. 2. Plot of the reduced plate heights calculated from naphthalene peak vs. flow rate. Plot of the reduced plate heights calculated from naphthalene peak vs. flow rate obtained for an end-capped BS-C23, 9.8 cm effective length, with a pore size of (▲) 100 Å or (◆) 300 Å. Conditions: injection 15 s under 1.75 bar of DMSO (100 mM) and naphthalene (6 mM), BGE: Tris-HCl pH 2.7, 150 mM-ACN (40:60, v/v), applied voltage from -0.5 to -20 kV.

function of the electrolyte buffer pH, for columns packed with end-capped and non end-capped BS-C23. A similar study was conducted with a fused silica capillary and also with a capillary containing only two frits formed by sintering end-capped BS-C23 phase (without stationary phase in-between). Fig. 3 shows the electroosmotic flow velocity measured at different pH from 2 to 9, using a mobile phase containing 60% of ACN and 40% (v/v) of buffer. DMSO was used as

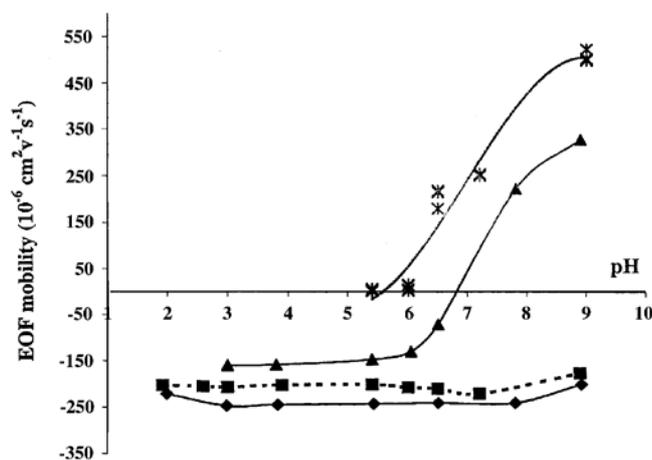


Fig. 3. Plot of the EOF mobility measured with DMSO as the unretained neutral marker vs. pH of BGE. BGE: Tris-HCl, 50 mM, pH from 2 to 9-ACN (40:60, v/v). Analyte: DMSO 100 mM, in H₂O/ACN, 40/60 (v/v). Injection for fused silica capillary: 5 s under 7 mbar, injection for other columns: 5 s under 0.7 bar. (X) Fused silica capillary, 31.2 cm (effective length 21 cm) × 75 μm, (▲) capillary with only two frits, 9.4 cm in between the two frits, 31.2 cm (effective length 9.8 cm) × 75 μm, (■) column packed with non end-capped BS-C23 300 Å 5 μm, 31.2 cm (effective length 9.8 cm) × 75 μm, (◆) column packed with end-capped BS-C23 300 Å 5 μm, 31.2 cm (effective length 9.8 cm) × 75 μm. Other conditions of separation as described in Section 2.

the dead time marker. As expected in our conditions, the EOF decreases with the pH and was negligible below pH 5.5 in a bare fused silica capillary. This absence of EOF at pH below 5.5 probably reflects the effective silanol pK_a , which would be higher in hydro-organic buffer than in aqueous buffer.

In contrast, under the same experimental conditions, a strong EOF, with a magnitude of $2.4 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$, was observed in the reversed direction (from cathode to anode) with our phase. Obviously, the opposite flow due to silanols from silica wall or to residual silanols from stationary phase particles is totally counteracted by the quaternary ammonium groups. A similar conclusion was drawn by Smith and Evans [15] who studied the contribution of charges of stationary phases to the EOF and found that in a CEC column, the EOF is predominantly generated by the charge of the silica particles rather than by those of the capillary wall. Similar flow magnitudes were previously observed with embedded ammonium groups either with monoliths, or with polymethacrylate microspheres or with open-coated capillaries [19,21,28]. In addition, no significant difference was obtained between the EOF values obtained with end-capped and non end-capped BS-C23 stationary phases. In both cases, the EOF was found to be independent of the pH of the mobile phase.

To evaluate the influence of the column frits on the EOF, a bare silica capillary containing only two sintered frits of 4 mm length was prepared. In this case, the sign of the EOF was pH-dependent. Below pH 6.5 an anodic flow was observed and was stable below pH 6. Its magnitude is however weaker than that of BS-C23 end-capped column ($1.5 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} \text{ V}^{-1}$ against 2.4). Thus, we deduced that the ammonium groups were still present in formed frits and are responsible for weak anodic EOF in acidic conditions. Under alkaline conditions the cathodic flow, stemming from the silanols of capillary walls, largely compensated for the inversed EOF generated by the frits.

An evaluation of the effect of the ACN percentage in the mobile phase, was performed, keeping the same proportion of phosphate buffer (concentration 50 mM, pH 2.5) in the mobile phases. The electroosmotic mobility was measured according to the percentage of ACN. The EOF was found nearly constant over a wide range of organic modifier content (from 0 to 80%). The increase of ACN proportion in the electrolyte has two consequences: a decrease of the ionic strength and a variation of ϵ_r/η ratio (ϵ_r and η being the permittivity and the viscosity of the mobile phase, respectively). The ionic strength and the ϵ_r/η ratio of the mobile phase have an opposite influence on the magnitude of the EOF in the range of ACN percentages investigated (0–80%). This explains the apparent constancy of the EOF in the investigated conditions. Furthermore, any link between the buffer nature and the EOF magnitude has been underlined when phosphate, Tris–HCl, citrate or ammonium formate buffers have been employed.

Finally, the strong anodic EOF generated by the Stability BS-C23 was found to be independent on the pH, a feature that is explained by the presence of a strong cation exchange group

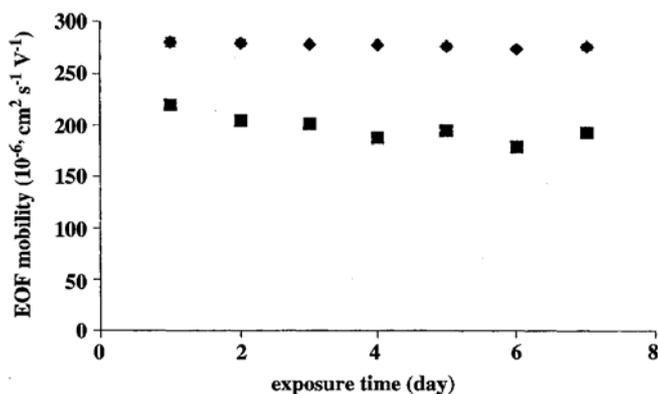


Fig. 4. Stability test of packed columns submitted to acidic or alkaline conditions over a period of 7 days, under voltage. BGE: (■) Tris–HCl ionic strength 10 mM, pH 9–ACN (40/60% (v/v)), (◆) phosphate, ionic strength 10 mM, pH 2.5–ACN (40/60, v/v), injection: DMSO 4 mM in water, 10 s, -5 kV , $n = 6$. Analytical voltage: -15 kV with a ramp of 0.5 min, both column ends were pressurized at $6.9 \times 10^5 \text{ Pa}$. Temperature: 25°C , detection: 200 nm. Column packed with end-capped BS-C23 300 \AA $5 \mu\text{m}$, 31.2 cm (effective length 9.8 cm) \times $75 \mu\text{m}$.

(ammonium) in the stationary phase. In addition, the EOF was stable with variation on the percentage of organic modifier in the mobile phase in our conditions. Thus, the selectivity can be tuned by varying different parameters without affecting the EOF velocity.

3.2. Column stability

The stability of the stationary phase under extreme pHs conditions (pH 2.5 and 9.1) was studied by monitoring the EOF over 1 week. To this purpose two capillaries were exposed to acidic and alkaline conditions respectively, under an applied voltage of -5 kV , as described in Section 2. As shown in Fig. 4, in both conditions the average intra-day EOF mobility was nearly constant with R.S.D. less than 1.4 and 2.7%, for acidic and alkaline conditions, respectively. In addition, the average day-to-day mobility for each condition did not vary by more than 1.1%, 3.4% for acidic and alkaline conditions, respectively. The stability of EOF observed in both conditions, demonstrate the good middle-term stability of the capillary packed with Stability BS-C23 under extreme pH values. The slight difference observed between the magnitude in the EOF mobility in the two conditions (acidic and basic) tested may be attributed to some contribution of the silanols for the silica capillary with the alkaline buffer and also to the fact that two different columns were employed.

3.3. Analyses of standard peptides

Because of the multiplicity of separation processes that can be involved in CEC separation of charged peptides, mobile phase composition is expected to play a major role in the separation of peptides by tuning the extent of each mechanism.

Table 1
Physico-chemical characteristics of investigated peptides

Peptides	Molecular mass (g mol ⁻¹)	pI ^a	Frictional ratio ^b $\zeta_{\text{fric}} \times 100$ at pH 2.5	Hydrophobicity ^c
Eledoisin RP	707	10.1	1.8	1.45
TRH precursor peptide	1006	12.4	5.4	-3.19
Eledoisin	1207	4.1	1.2	0.10
Angiotensin I	1296	7.9	2.8	-0.20
Arg-Arg gastrin	1380	4.1	1.9	-2.10
Renin substrate	1759	7.8	2.3	0.28
[Gln ¹¹] amyloid β protein	1954	6.3	3.4	-1.82
EGF	2319	7.2	1.9	-0.67
Valosin porcine	2918	9.4	2.1	-0.18

^a The emb1-heidelberg.de: EMBL WWW Gateway to Isoelectric Point Service was employed for calculating the isoelectric points (pI values) as well as the net-charge values of peptides at different pH values.

^b $\zeta_{\text{fric}} = q/M^{2/3}$, with q net-charge value and M the molecular mass.

^c Hydrophobicity was estimated on <http://www.expasy.org> with ProtScale, using parameter of Kyte and Doolittle [31].

Initially, we have investigated the effect of the organic modifier and the buffer concentrations in the electrolyte on the migration behaviour of standard peptides. These peptides were chosen with different isoelectric points, molecular masses and hydrophobicities in order to reflect as much as possible the diversity of peptide structures that can be found in a protein digest (Table 1). The influence of ACN content in the mobile phase on the retention factor of peptide was evaluated. The CEC retention factors of these peptides were estimated as the apparent retention factors k_{CEC} at different percentages of ACN in the mobile phase, which consisted of 50 mM phosphate buffer, pH 2.5. With reversed stationary phases, a low content of organic solvent in the mobile phase is expected to favour hydrophobic interactions but also to decrease possible electrostatic or hydrogen-bond interactions. As shown in Fig. 5A, relatively low retention factors (less than 2), for percentages of ACN from 20 to 60% are observed for most of the investigated peptides, although they possess quite different hydrophobic properties. Under 10% ACN, all retention factors increase significantly. Interestingly, the eledoisin exhibits the highest retention factor at a low percentage of ACN, although it is quite hydrophilic. This indicates that reversed-phase retention is probably not the predominant mechanism in this separation. Generally, electrochromatographic behaviour of peptides based on the organic solvent composition of the mobile phase is quite a complex phenomenon. The concentration of the organic modifier may influence three main factors involved in retention/migration behaviour of analytes: (1) the magnitude of EOF in the capillary, (2) the electrophoretic mobility of the peptides and (3) the chromatographic retention based on solute-bonded phase interactions and/or ionic interaction with a charged stationary phase. However, as discussed previously, with the Stability BS-C23, EOF is not affected by variation in ACN concentrations.

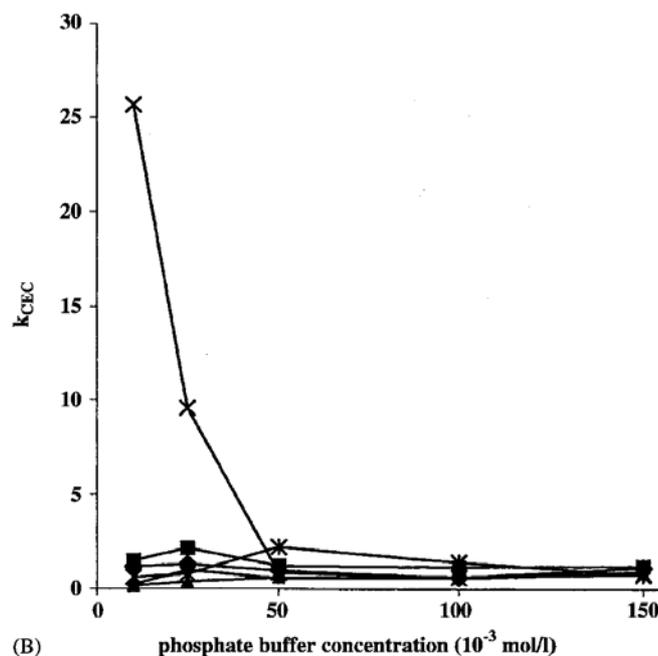
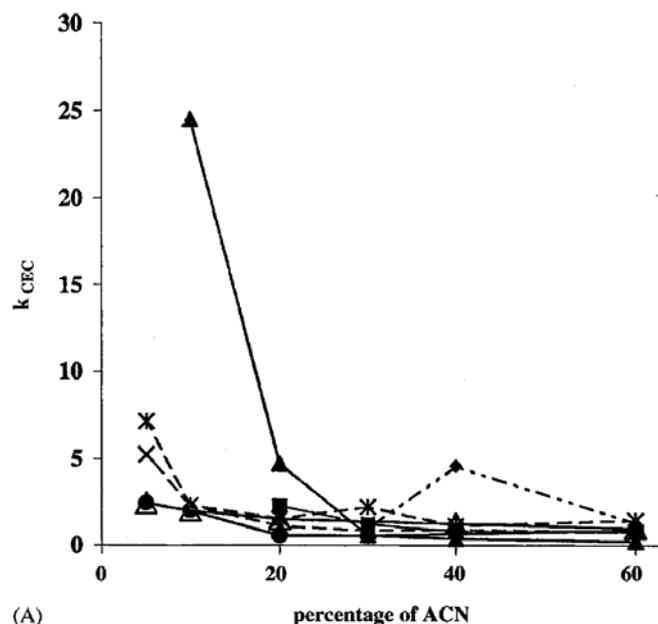


Fig. 5. Effect of (A) ACN percentages and (B) buffer concentrations in the mobile phase on peptide retention in CEC (k_{CEC}). (×) Arg-Arg gastrin, (◆) valosine porcine, (▲) eledoisin, (△) eledoisin RP, (■) renin substrate porcine, (●) EGF, (✱) angiotensin I, DMSO. (A) BGE: phosphate, 50 mM, pH 2.5-ACN, from 95:5 to 40:60 (v/v). (B) BGE: phosphate, concentration from 10 to 150 mM, pH 2.5-ACN (70:30, v/v), hydrodynamical injection: 100 s under 1.7×10^5 Pa; analytical voltage: -15 kV with a ramp of 0.5 min, both column ends were pressurized at 6.9×10^5 Pa. Temperature: 25 °C, detection: 200 nm. Column packed with end-capped BS-C23 300 Å 5 μm , 31.2 cm (effective length 9.8 cm) \times 75 μm .

Rathore and Horváth [29] pointed out that k_{CEC} , unlike its equivalent in HPLC, does not yield any thermodynamic or mechanistic information. Thus, to draw conclusions about the degree of charged peptides-stationary phase interaction, a k_c , which is an indication of contribution of the chromatographic

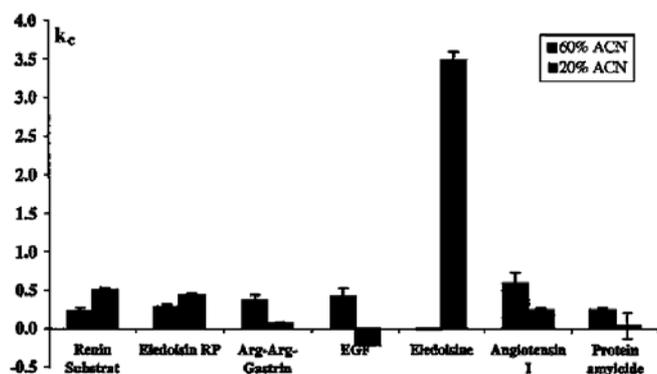


Fig. 6. Chromatographic retention factors (k_c) of different peptides at 20 and 60% of ACN in the BGE. BGE: phosphate, 50 mM, pH 2.5–ACN, 40:60 and 80:20 (v/v). Other conditions as described in Fig. 4. Bars indicate the standard deviation of each point.

retention in a CEC separation, was estimated for these peptides (under two conditions of low and high ACN percentages in the mobile phase). This estimation requires electrophoretic measurements of peptides by CZE and an estimation of the “actual” EOF in the packed section of the capillary. This value is obtained by measuring values of the current generated in capillaries having different packed lengths and in an empty fused silica capillary. Fig. 6 compares the electrochromatographic retention factor k_c of several peptides (Eq. (3)) at low and high ACN percentages in the mobile phase (20 and 60%).

Firstly, k_c values are very low and reflect peptide electrochromatographic behaviours dominated by their relatively strong electrophoretic migration with marginal electrochromatographic retention. Indeed, in acidic conditions, peptides are overall positively charged, and their electrophoretic mobility is in the opposite direction of the anodic EOF. The velocity factor κ_e (Eq. (2)) is therefore negative and the electrochromatographic factor k_c is always lower than k_{CEC} .

Secondly, we observed that k_c of the most hydrophobic peptides (eledoisin RP, eledoisin, renin substrate) increases with the percentage of aqueous portion in the mobile phase. That is the expected trend in RP chromatography partitioning. This increase is particularly important for eledoisin, which possesses the weakest frictional ratio and thereby the weakest electrophoretic mobility. This demonstrates that hydrophobic peptides can exhibit relatively high retention factors when a limited electrophoretic migration is involved.

On the other hand, the most hydrophilic peptides (Arg–Arg gastrin, [Gln¹¹] amyloid β peptide and EGF) have a k_c at 60% of ACN lower than that at 20%. Modification of peptide configuration, with increasing percentages of ACN could explain this phenomenon. However, repulsive phenomena between the quaternary ammonium groups of the stationary phase and positively charged peptides are another possibility.

Finally, several hypotheses can be drawn up to explain the marginal electrochromatographic retention globally low and the unexpected electrochromatographic behaviour observed for several peptides (Arg–Arg gastrin, [Gln¹¹] amyloid β peptide and EGF) at acidic pH: (1) the positive charges of the am-

monium functionalities of the stationary phase could induce a repulsive electrostatic interaction with the overall positively charged peptides, (2) the EOF is too intense, and the electrokinetic contributions in the CEC separation is probably dominant with regard to the electrochromatographic retention. In addition, we cannot exclude that peptides, under an electric field or according to the percentage of ACN in the electrolyte, adopt conformations that preclude hydrophobic interaction with the chromatographic support.

To test the first hypothesis, the CEC apparent retentions of standard peptides were monitored using buffers composed from 5 to 150 mM phosphate pH 2.5 in water–ACN (70:30, v/v). Indeed, the potential repulsive electrostatic interaction should readily decrease by using a higher concentration of phosphate buffer pH 2.5 in the mobile phase. Fig. 5B shows the influence of phosphate concentration in the mobile phase on the k_{CEC} of several peptides. As a general trend, the phosphate concentration has low influence on k_{CEC} , except for Arg–Arg gastrin. The absence of migration time increase at high buffer concentrations indicates that repulsive electrostatic interactions are not responsible for the weak retention of peptides observed in our conditions. However, at low buffer concentrations, the less positively charged Arg–Arg gastrin within the hydrophilic peptide group, has a high retention factor (>20). This retention at weak ionic strength may be attributed only to electrostatic interaction with the stationary phase, which arises from an ion-exchange chromatographic mechanism between the fixed cationic charges of the stationary phase and some anionic charges of the glutamic acid-rich Arg–Arg gastrin. These results highlight that anion-exchange is a possible interaction mechanism of retention, whereas repulsive electrostatic interaction is probably not involved in CEC of peptides at acidic conditions.

An excessively strong EOF could also explain the low retention factor k_c observed. The impact of this electrokinetic phenomenon can be ascertained by a study of the influence of the applied voltage on the retention. Fig. 7 represents a plot

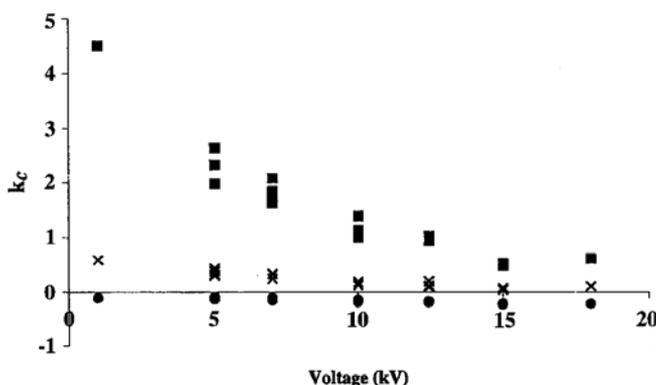


Fig. 7. Effect of the applied voltage on the retention factor k_c of three peptides. BGE: phosphate, 50 mM, pH 2.5–ACN (80:20, v/v). Analyte mixture of (●) EGF 0.3 mM, (■) renin substrate porcine 0.75 mM, (×) Arg–Arg gastrin 1 mM, DMSO 3.3 mM in water. Voltage from –1 to –18 kV. Other conditions as described in Fig. 4.

of k_c of three peptides versus the applied voltage under 20% of ACN in the BGE. Except for EGF, which exhibits no retention ($k_c \approx 0$), an increase in k_c is observed for the two other peptides with a decrease in the applied voltage. In fact, the possibility of chromatographic interactions is probably enhanced with longer analysis times. When ion-exchange CEC is performed, Ye et al. [30] have demonstrated that the retention of acidic components increased when the applied voltage increased. The opposite tendency observed here, supports the hypothesis that ion exchange mechanism is not the predominant retention mechanism in our conditions. It appears that the electrokinetic contribution is probably much more important than the electrochromatographic retention and may be reduced by a decrease in the applied voltage. An alternative, to exploit the favourable anodic EOF while permitting a larger extent role for the chromatographic process, would be to fine-tune the EOF through the choice of a suitable counter ion.

The overall results proved that the retention of peptides at acidic conditions could be tuned by changing either electric field strength and/or the BGE ionic strength.

A comparison was made between BS-C23 and octadecyl columns on the CEC of a synthetic peptide mixture (Fig. 8). The electropherograms showed that higher efficiencies and improved peak symmetries are attained with the Stability BS-C23 stationary phase for most of the investigated peptides, feature is also combined with a lower analysis time. The elution orders observed with the two stationary phases clearly demonstrate that BS-C23 affords a different selectivity compared to that obtained with a C_{18} stationary phase. Indeed, with the inverted EOF generated in a BS-C23 CEC column, the peptide eluting order was also expected to be also inverted in the case of a pure RP chromatography mechanism.

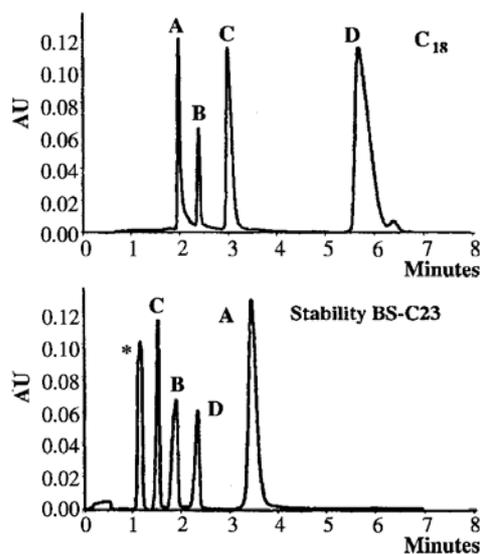


Fig. 8. Comparison of CEC profiles obtained with a peptide mixture on BS-C23 and C_{18} stationary phase. BGE: Tris-HCl 50 mM, pH 3-ACN (40:60, v/v), (*) DMSO 8 mM, (A) TRH precursor peptide, (B) EGF, (C) eleodoisin, (D) eleodoisin RP in H_2O/ACN : 20/80% (v/v). Other conditions as described in Fig. 4.

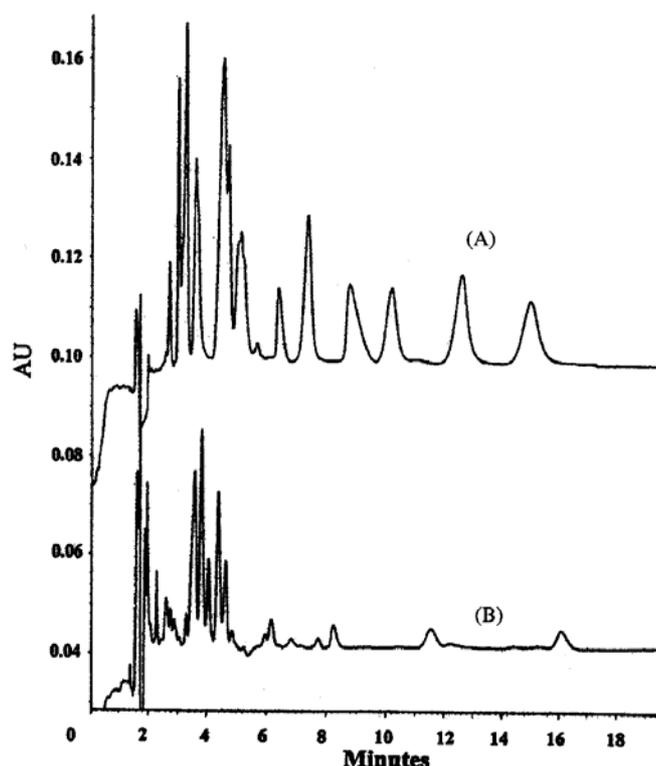


Fig. 9. Peptide mapping of (A) β -lactoglobulin and (B) hGH by CEC on a BS-C23 column. BGE: Tris-HCl 75 mM, pH 2.6-ACN (80:20, v/v). β -Lactoglobulin 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, hGH 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Other conditions of separation as described in Fig. 4.

3.4. Applications

In view of the retention behaviour of peptides with this new stationary phase, we have performed the analysis of a β -lactoglobulin and hGH digest at acidic pH (2.6), with a relatively low level of acetonitrile (20%) in the buffer. Even if separations of the 20 and 18 tryptic peptides, expected for hGH and for β -lactoglobulin digest, respectively, are not complete (Fig. 9), the profile obtained under unpressurized CEC and without eluting gradient is quite encouraging. In addition we observed that the separation performances were clearly improved when a Tris-HCl buffer was employed instead of a standard phosphate buffer.

4. Conclusion

Among the different packing materials that are used in CEC, Stability BS-C23, which incorporates a permanent charge and RP properties, provides several advantages. First, an accelerated anodic EOF as compared to RP columns was evidenced. Second, a nearly independent EOF over a wide range of pH (2–9), acetonitrile percentages in BGE and buffer concentrations was observed. Moreover, slight differences in selectivity between BS-C23 and a common octadecyl stationary phase were demonstrated. Furthermore the stability

of this stationary phase under alkaline and acidic conditions was demonstrated.

The study performed on standard peptides underlined that the electrochromatographic behaviour is a complex phenomenon that superimposed a predominant electrophoretic migration process, an interplay of hydrophobic as well as electrostatic interactions (between the stationary phase and peptides). This extensive study pointed out the low electrochromatographic retention of peptides in CEC, in our conditions, which could not be explained by a charge repulsive phenomenon, but probably by a too intense EOF. Ion-exchange was possible in some seldom cases; however the benefit of several separation mechanisms in CEC cannot yet be used in a controlled manner in our conditions.

This stationary phase permitted the peptide mapping under unpressurized CEC and without eluting gradient. Further development will be devoted toward the investigation of other mobile phase conditions permitting a higher contribution of the chromatographic process in the CEC.

Acknowledgments

The authors thank Beckman-Coulter France for their support and Cluzeau Info Labo for the kind donation of the stationary phase materials and contribution towards equipment. We are grateful to Dr. Claire Demesmay for fruitful discussion.

References

- [1] J.-T. Wu, P. Huang, M.X. Li, D.M. Lubman, *Anal. Chem.* 69 (1997) 2908.
- [2] P. Huang, J.-T. Wu, D.M. Lubman, *Anal. Chem.* 70 (1998) 3003.
- [3] A. Apffel, H. Yin, W.S. Hancock, D. McManigill, J. Frenz, S.-L. Wu, *J. Chromatogr. A* 832 (1999) 149.
- [4] B. Behnke, J.W. Metzger, *Electrophoresis* 20 (1999) 80.
- [5] P. Huang, X. Jin, Y. Chen, J.R. Srinivasan, D. Lubman, *Anal. Chem.* 71 (1999) 1786.
- [6] T. Adam, K.K. Unger, *J. Chromatogr. A* 894 (2000) 241.
- [7] A.R. Ivanov, Cs. Horváth, B.L. Karger, *Electrophoresis* 24 (2003) 3663.
- [8] M. Pursch, L.C. Sander, *J. Chromatogr. A* 887 (2000) 313.
- [9] C.-Y. Liu, *Electrophoresis* 22 (2000) 612.
- [10] J. Jiskra, H.A. Claessens, C.A. Cramers, *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 1305.
- [11] C. Legido-Quigley, N.D. Marlin, V. Melin, A. Manz, N.W. Smith, *Electrophoresis* 24 (2003) 917.
- [12] H. Zou, X. Huang, M. Ye, Q. Luo, *J. Chromatogr. A* 954 (2002) 5.
- [13] E.F. Hilder, F. Svec, J.M.J. Fréchet, *Electrophoresis* 23 (2002) 3934.
- [14] D. Allen, Z. El Rassi, *Electrophoresis* 24 (2003) 3962.
- [15] N. Smith, M.B. Evans, *J. Chromatogr. A* 832 (1999) 41.
- [16] K. Walhagen, K.K. Unger, A.M. Olsson, M.T.W. Hearn, *J. Chromatogr. A* 853 (1999) 263.
- [17] K. Walhagen, K.K. Unger, *Anal. Chem.* 73 (2001) 4924.
- [18] D. Hoegger, R. Freitag, *J. Chromatogr. A* 1004 (2003) 195.
- [19] J.D. Hayes, A. Malik, *Anal. Chem.* 72 (2000) 4090.
- [20] J.D. Hayes, A. Malik, *Anal. Chem.* 73 (2001) 987.
- [21] S. Zhang, J. Zhang, Cs. Horváth, *J. Chromatogr. A* 914 (2001) 189.
- [22] I. Le Potier, M. Taverna, E. Fattal, J. Benzaki, M. Chevalier, D. Ferrier, *Chromatographia* 53 (2001) 563.
- [23] R.J. Boughtflower, T. Underwood, C.J. Paterson, *Chromatographia* 40 (1995) 329.
- [24] L.A. Frame, M.L. Robinson, W.J. Lough, *J. Chromatogr. A* 798 (1998) 243.
- [25] B.A. Williams, Gy. Vigh, *Anal. Chem.* 67 (1995) 3079.
- [26] A.S. Rathore, A.P. Mc Keown, M.R. Euerby, *J. Chromatogr. A* 1010 (2003) 105.
- [27] A.S. Rathore, E. Wen, Cs. Horváth, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2633.
- [28] S. Zhang, X. Huang, N. Yao, Cs. Horváth, *J. Chromatogr. A* 948 (2002) 193.
- [29] A.S. Rathore, Cs. Horváth, *Electrophoresis* 23 (2002) 1211.
- [30] M. Ye, H. Zou, Z. Liu, J. Ni, *J. Chromatogr. A* 887 (2000) 223.
- [31] J. Kyte, R.F. Doolittle, *J. Mol. Biol.* 157 (1982) 105.

Article 3

A soumettre

Chromatographic behaviour of peptides on a mixed mode stationary phase with an embedded polar and charged group by capillary electrochromatography and HPLC.

F. PROGENT, C. SMADJA, A. BANCO, A. TCHAPLA, M. TAVERNA

**CHROMATOGRAPHIC BEHAVIOUR OF PEPTIDES ON A MIXED MODE
STATIONNARY PHASE WITH AN EMBEDDED CHARGED GROUP BY
CAPILLARY ELECTROCHROMATOGRAPHY AND HPLC**

F. Progent¹, C. Smadja¹, A. Banco², A. Tchaplal², M. Taverna¹

¹ Groupe de Chimie Analytique de Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, rue J. B. Clément,
92290 Châtenay-Malabry, France

² Groupe de Chimie Analytique de Paris-Sud, LETIAM, IUT de Chimie, Plateau du
Moulon, 91400 Orsay, France

Abstract

Retention behaviour of model peptides was investigated on a stationary phase bearing an embedded quaternary ammonium group in a C21 alkyl chain, in both HPLC and capillary electrochromatography (CEC). A careful examination of the influence of acetonitrile percentages in the mobile phase on peptide retention showed that these compounds are mainly separated by RP partitioning in HPLC, but demonstrated also a poor retention of these compounds compared to that expected with common C18 silica stationary phases. Negative retention factors obtained in certain condition strongly suggested the contribution of electrostatic repulsion (exclusion) between peptides and the stationary phase at acidic pHs. The overall results suggest an intricate relation between retention by partitioning, electrostatic repulsion or ion exchange and steric hindrance.

Chromatographic retentions were also deduced from CEC experiments, under the same conditions than HPLC. The comparison of the "chromatographic" retention factors obtained with the two separation modes indicated that (i) exclusion phenomenon is much more pronounced in HPLC, (ii) increase of acetonitrile percentages in the mobile phase can induce for some peptides an increase of retention in CEC but never in HPLC, pointing out the existence of other mechanisms of separation than partitioning involved in "chromatographic" process in CEC.

This comparative study between CEC and HPLC mode demonstrated the critical role of the electric field on the retention mechanism of the peptides on this stationary phase and supports the solvation model of hydrolytic pillow proposed by Szumski and Buszewski in the case of mixed mode stationary phases in CEC.

Keywords : Capillary electrochromatography, mixed-mode stationary phase, peptides, chromatographic retention.

1. INTRODUCTION

Efficient and rapid separation of complex mixtures of peptides is one of the main issues in proteomic to afford the identification of proteins separated by 2D gel electrophoresis. This is accomplished *via* their proteolytic digestion which is often combined to one separation step, using techniques such as HPLC or capillary electrophoresis, and to the structural characterization of the separated fragments by mass spectrometry. The peptide mapping of recombinant and therapeutic proteins is also one of the most relevant tools in the quality control context.

Peptides which are mostly analysed by HPLC under acidic conditions and using C8 or C18 bonded silica stationary phases can exhibit severe peak tailing due to silanophilic interactions. In HPLC, this can be overcome by the use of end capped alkyl bonded silica stationary phases or by the introduction of additives (ion pairing or competing agents) into the mobile phase. HILIC has also been proposed as an alternative mode to separate peptides by liquid chromatography but is restricted to rather polar peptides [1]. The recent introduction of stationary phases bearing two types of functionalities has opened a new area of research and new possibilities in this field. Although mixed-mode stationary phase is often employed to refer to phases bearing side-by-side different functionalities [2], we employed also this term to describe stationary phases with polar embedded group. Because these ones present also two type of functionalities. These stationary phases present generally embedded polar group [3-9] such as amide, urea, carbamate, acrylated, sulfonamide or ether or an end capping with polar groups. According to Wilson *et al* [10], polar groups could have less effect on selectivity when used to end-cap the column in comparison to the case of embedded polar groups. Generally, the shielding effect of the polar group in such stationary phase are clearly observed by an improvement of peak shapes for basic compounds [3, 6, 8, 11].

CEC combining the selectivity potential of HPLC and the efficiency and speed of CE is an attractive mode of separation of complex mixtures. However, alternative stationary phases with designed properties for CEC are required since the role of the stationary phase in this technique is not limited to retention but also to the EOF generation. The silica based strong anion (SAX) or cation (SCX) exchangers meet the requirement of sufficient EOF during CEC [12]. Strong exchangers such as those bearing acidic SO₃H groups attached to silica particles are ionised even in acidic conditions and exhibit an EOF virtually important and unaltered

across the whole pH range [13]. However, the major drawback of these packing is their inability to separate neutral or hydrophobic compounds.

To circumvent this limitation, mixed mode stationary phase combining strong ion exchange functionalities to generate EOF and alkyl chains to achieve hydrophobic selectivity have gain much interest. The great majority of such phases reported in the literature possess both functionalities attached side by side to silica particles. Mixed stationary phases with charged polar groups have demonstrated good capabilities to afford efficient separation of peptides especially through a good shielding of the silanols which in turn reduces drastically the peak tailing. In a previous work, we have evaluated the beneficial effect of an ammonium embedded stationary phase on the peak asymmetries obtained for CEC analysis of peptides in comparison to an end capped ODS C18 stationary phase. The embedded mixed stationary phase led clearly to enhance peak symmetries [14]. But, except this later publication, no comprehensive work on peptide retention on an embedded and cationic stationary phase has been published until now. Adam and Unger [15] indicated that a SCX/C6 and SCX/C18 stationary phase are more suitable than octadecyl stationary phase for the separation of standard peptides, but an elution gradient was necessary to achieve the separation of a complex mixture of peptides. In 1999, Walhagen *et al.* [16], compared two mixed mode stationary phases octadecyl/ SCX and reported different elution order of standards peptides on these two packing materials, that they attributed to different of charge density. In 2001, the same group [17] reported the separation of cyclic peptides by CEC using a mixed stationary phase. They demonstrated that the dominating separation mechanism depends mostly on the pH and composition of the eluent for charged peptides and concluded that with such phases peptides are retained by both hydrophobic and electrostatic surface interaction. Later, Steiner *et al* reported very recently a mixed stationary phase SCX/ODS for the separation of small peptides by CEC [18]. The elution behaviour of the peptides as a function of the acetonitrile content of the mobile phase presented a U-shape which was ascribed to predominant hydrophobic interactions at low organic contents and to polar one at higher solvent percentages.

Although an accumulating quantity of investigations has focused on the theoretical concept of this technique, the chromatographic behaviour of charged compounds still remains difficult to understand and to predict in CEC. Particular behaviours arise from the CEC itself. As an example, Kitagawa *et al.* [19] reported a surprising effect of the applied voltage on the intensity and direction of EOF in pCEC for ODS/SAX mixed stationary phase. The marginal behaviour of the EOF was attributed to accelerated protonation of the quaternary ammonium group and dissociation of silanol groups under negative voltages.

In fact, a complex interplay occurs in CEC on mixed and charged stationary phase EOF is a mandatory feature is able to affect not only efficiencies and performance of a system [20], but retention mechanisms can also be affected and this *via* several ways (modification of ionization properties of charged groups of the stationary phase, modulation grafted group repartition, or migration of analytes under electrical fields including during interaction with the stationary phase). Several models allowing an estimation of retention in CEC have been proposed in the literature [21, 22] and the corresponding equations are particularly useful to assist researchers willing to gain understanding on the mechanisms of migration/retention on this quite novel generation of phases. In particular the possibility to decouple the contribution of chromatographic retention from the electromigration one in CEC is a crucial point.

As mixed mode stationary phase exhibits different properties in term of retention compared to the traditional alkyl-silica ones, the purpose of this study is two fold. In a first part we have attempted to characterise and gain understanding on the chromatographic behaviour of peptides on an embedded polar and charged stationary phase by chromatographic studies. In particular, we intended to elucidate the effect of organic modifier in the mobile phase on the retention mechanisms involved in peptide analyses. In the second part of this study we have compared the mechanism and chromatographic retention properties of peptides in HPLC and CEC.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Reagents and chemicals

Acetonitrile (ACN) HPLC grade and Phosphoric acid (85 %) were from Prolabo (Fontenay-sous-bois, France), DMSO and hydrochloric acid 1.0 M from Sigma and sodium hydroxyde 1.0 M was from VWR (Fontenay-sous-bois, France). Eledoisin, eledoisin RP, epidermal growth factor (EGF), Arg-Arg-gastrine fragment 22-30, renin substrate porcine, [Ile⁷] angiotensin III, FGGF were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA). Analytical concentrations for HPLC experiments were 0.1 mg/ml of each peptide and 10 mM DMSO diluted in water. For CEC analyses, concentrations of peptides solution are between 0.07 mM to 0.38 mM.

2.2 Instrumentation

All chromatographic experiments were performed with a varian 2510 HPLC pump equipped with Stability BS-C23 (250 mm x 2.2 mm ID), a waters 486 UV detector (Waters, Milford, MA, USA), a Rheodyne 7725i injector (Cotati, USA) with a 20 μ l loop. Data acquisition and evaluation were performed by the jasco borwin HPLC software.

All CEC experiments were carried out using a P/ACE MDQ Capillary Electrophoresis System (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) equipped with an UV detector and a data handling system comprised of an IBM computer and Karat 32 software.

2.3 Methods

2.3.1 Column packing for CEC

Stability endcapped BS-C23, 5 μ m, 300 Å was provided by C.I.L. (Sainte-Foy-La-Grande, France). Fused-silica capillaries with an internal diameter of 75 μ m and an outer diameter of 375 μ m were purchased from Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA).

All CEC columns used in this report were packed in-house by the BS-C23 using a slurry packing technique as reported in the literature [23, 24]. Capillary stock was cut to lengths of 50 cm and fitted with a stainless steel mesh frit (2 μ m pores) in a removable inline mini micro filter (Upchurch, Oak Harbor, U.S.A.). Slurries were made at a concentration of 10 mg per 150 μ l of acetonitrile. Columns were filled with acetonitrile and packed with water. After packing, sintered frits of packed columns were subsequently fabricated with an ACF electrical burner (Innovatech, Stevenage, UK) while the capillary was still under pressure. The total length of the columns was 312 mm and the packed length was 98 mm.

2.3.2 Separations conditions

All Buffers were prepared with de-ionized water from a MILLI-Q purification system (Millipore, Milford, MA, USA) and were filtered through a 0.22 μ m filter before use.

For HPLC experiments, the mobile phase was a 50 mM aqueous sodium phosphate buffer, pH 2.5 containing indicated amount of ACN. All solvents were degassed before used. Experiments in HPLC were performed with a 0.2 ml/min flow rate and were carried out at 214 nm. Samples analysed contain peptides and DMSO. The peaks of peptides were assigned by spiking the sample with the compound of interest.

For CEC experiments, the samples were injected hydrodynamically under $1.7 \cdot 10^5$ Pa for 100 s. All samples were detected at 200 nm. All experiments were carried out at 25°C and both column ends were pressurized at $6,9 \cdot 10^5$ Pa to prevent bubble formation. Columns packed with

end-capped STABILITY BS-C23, 300 Å, 5 µm, 31.2 cm (effective length 9.8 cm) × 75 µm were employed and analyses were made under 15 kV, with a voltage ramp of 0.5 min. DMSO (3.3 mM) was used as EOF marker.

2.3.3 Calculation

2.3.3.1 Retention factor and eluent strength in HPLC

The chromatographic retention coefficient was calculated as indicated in Eq (1):

$$k = \frac{t_i - t_0}{t_0} \quad (1)$$

Where t_i is the retention time of the analyte i and t_0 the column void volume retention time measured with DMSO.

Estimation of the change in retention with solvent strength for a binary mobile phase in RP-LC can be described by Eq. (2) [25].

$$\log k = \log k_w - S_i \phi \quad (2)$$

where k is the retention factor, k_w the retention factor for water as the mobile phase, ϕ the volume fraction of the organic modifier, S_i the slope of the experimental data after fitting to a linear regression model.

2.3.3.2 Retention factor in CEC

When CEC is apply to charge analytes superposition of both chromatographic retention and electromigration is expected.

To estimate the chromatographic retention alone k_c Rathore *et al.* [22] proposed the following equation (Eq. 3).

$$k_c = \frac{t_i (1 + \kappa_e) - t_{eof}}{t_{eof}} \quad (3)$$

κ_e was estimated from the values of current generated in fused silica capillary and in packed columns as already reported [14, 20, 21], t_i is the retention time of the analyte i and t_0 the retention time of the EOF marker (DMSO).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Chromatographic study

In the first part of this work, we have investigated the retention behaviour of model peptides, by HPLC using a column packed with a quaternary ammonium group incorporated in the alkyl C18 phase (Stability BS-C23). All the experiments were carried out in acidic conditions. The investigated peptides were chosen with different isoelectric points, molecular masses and hydrophobicities in order to reflect as much as possible the diversity of peptide structures that can be found in a protein digest (Table I).

In order to investigate the mechanisms involved in the peptide retention on this mixed-mode stationary phase, retention factors of model peptides have been determined at various ACN percentages in the mobile phase keeping constant the phosphate buffer concentration (50 mM, pH 2.5). For all the peptides studied, as shown in figure 1 when the content of ACN decreased, the retention of the peptides was increased. Interestingly, with this stationary phase, retention of the peptides occurs only at extremely low levels of ACN in the mobile phase (from 0 to 30 %) as compared to traditional C18 silica stationary phases [26]. The incorporation of a quaternary ammonium positively charged in an alkyl chain weakens undoubtedly the hydrophobicity of the sorbent. However, to explain this phenomenon several other hypotheses could be proposed. Thus, the relatively low level of carbon content, which reflected a quite low graft density of this stationary phase (11%) [27] could lead to a reduction of the overall hydrophobicity of the Stability BS C23 sorbent. Another explanation could be that at pH 2.5 all the peptides studied are positively charged (table I), then electrostatic repulsions between peptides and the quaternary embedded ammonium could prevent the retention of peptides.

We attempted to interpret the elution order of the peptides on this stationary phase with regard to their intrinsic properties. Interestingly, the most retained peptide (Eledoisin) was not the most hydrophobic. In a similar way, the less retained peptide [Ile⁷] angiotensin III, is not the most positively charged, nor the heaviest, and is not the less hydrophobic. These results suggest an intricate relation between retention by partitioning, electrostatic repulsion or ion exchange and steric hindrance.

We observed, that retention factors of the peptide exhibit negative value (e.g. $k' = -0.22$ for eledoisin RP at 60 % ACN) at high ACN percentages. These negative values could be related to the neutral marker employed (DMSO) which may undergo some retention. However, Wilson *et al* [10] also reported negative values of retention factors on mixed phases for cationic solutes although employing thiourea as neutral marker. Thus, we speculated that the negative values of the retention factor were due to electrostatic repulsions between the quaternary

ammonium and peptides leading to an elution of the peptides earlier than the neutral marker. This phenomenon becomes more pronounced at high ACN % due to the low counterbalancing partitioning retention in these conditions.

Another observation that can be made is that the most hydrophobic peptides are also the less retained ([Ile⁷] Angiotensin III, eledoisin RP, FGGF). In addition, the smallest peptides are less retained than the larger ones. Although that is expected in reversed phase partitioning, small peptides could also be more prone to exclusion than large ones because no folding can take place in their cases preventing the possibility to hinder their positive charges.

In order to clarify the respective contributions of all the mechanisms previously mentioned in the peptide retention, the elution strength of the mobile phase has been evaluated for all the model peptides. This parameter has been determined from the slopes of the plots of $\log(k)$ versus ACN percentages according to the equation (2) as described in the materials and methods. Figure 2 displays this plot, for all the peptides, in the range of ACN percentage where each peptide is retained. Straight lines are observed demonstrating that reversed phase partitioning is the predominant mechanism involved in the retention of peptides. However slopes are quite different for the 6 investigated peptides indicating that increase of ACN in the mobile phase affected differently the compounds. To further understand the relationship between the physico-chemical parameters of the peptides and the eluent strength of the mobile phase, S_i values were plotted against the hydrophobicity and the molecular mass of the peptides. As shown in figure 3, a good correlation is observed between S_i and peptide masses, whereas no correlation was evidenced with the hydrophobicity (estimated using Kyle and Doolittle parameter [28]).

Surprisingly the hydrophobicity is not a critical parameter for the retention although reversed phase partitioning was demonstrated to be the dominant mechanism of chromatographic retention. Furthermore these data suggest that larger peptides exhibit a higher reactivity to the elution strength of the mobile phase, in other words, a slight variation of ACN content in the mobile phase induced a high modification of the retention of these peptides.

3.2 Comparison between chromatographic retention in CEC and in HPLC

In a previous work, we evaluated the k_C of different peptides on this stationary phase and at two percentages of ACN in the mobile phase [14]. This parameter k_C estimated according to Horváth group model [20, 21], reflects the contribution of the chromatographic retention in CEC through a decoupling of the chromatographic and electromigration processes.

In the present study, we have therefore compared the chromatographic retention of the investigated peptides in CEC and in conventional HPLC.

Table II displays the corresponding values and shows that at 60% of ACN most of the retention factors are negative in HPLC while some low but positive values are observed in CEC. These negative values combined to the lack of retention in HPLC arise probably from an exclusion phenomenon between the peptides and the ammonium moiety of the alkyl chain, but it must be emphasized that this exclusion phenomenon is much more pronounced in the case of HPLC. Our recent results demonstrated indeed that concentrations of the buffer did not alter CEC chromatographic retention, and no exclusion was evidenced during the CEC of peptides on this stationary phase [14]. Moreover, these results also support the idea evoked by several authors that retention in HPLC and in CEC may not be considered as identical.

This different chromatographic behaviour between the two modes may be attributed to the spatial configuration that the quaternary ammonium-C18 chains adopt under an electrical field. It is probable that in CEC the driving force generated by the EOF through the internalized ammonium, induces some stretching out of the grafts. In contrast, the hydrophobic layer composed by the C18 moiety of the graft could be more compact and entangled in HPLC leading to closer vicinity between peptides and the ammonium group, vicinity that could amplify the exclusion phenomenon.

We have then compared the retention variations associated with a decrease of the elution strength in the two modes. In the case of HPLC and whatever the peptide, the decrease of the organic modifier content of the mobile phase is accompanied by an increase of the retention factor, as expected for a reverse phase partitioning. Moreover, as shown on figure 4 the situation is more complex for CEC, two groups of peptides are distinguished: those which behaviour is similar to the one described for HPLC (Eledoisin RP, eledoisin and renin substrat) and those which retention decrease with the ACN content decrease of the mobile phase (EGF, Arg-arg-gastrin). As the latter peptides are among the largest ones, they could undergo folding and rearrangements according to the extent of exposure to solvent in the mobile phase. However, it may be anticipated that such conformational transitions are altered under an electric field, leading to unexpected retention behaviour of the high molecular weight peptides in CEC. But more probably, the marginal retention behaviour of these two peptides at 20% of ACN arises from their hydrophilic property, indeed they exhibit the lowest hydrophobicity factor. This feature could be explained by the presence of a hydrolytic pillow, which are

induced by ammonium functionalities, mostly composed of water and present at the silica surface of the stationary phase. This solvation model was previously suggested by Buszewski group [29] for a mixed stationary phase which included residual amine or amide groups. In such a model, we could assume that the increase of ACN levels in the mobile phase favour the attraction by the pillow of the most hydrophilic peptides which undergo, in turn, retention increase.

4. CONCLUSION

This comparative study performed between CEC and HPLC mode demonstrated the critical role of the electric field on the retention mechanisms of peptides on the mixed-mode stationary phase investigated. The different retentions observed in CEC and HPLC, the enhanced exclusion phenomenon in HPLC with regard to CEC and the variation of retention of the peptides associated with the decrease of the eluent strength support the hypothesis of the hydrophilic pillow model in the case of CEC, and of a fully different spatial configuration of the grafts of this mixed stationary phase in the two separation modes. The overall observations demonstrated that the electromigration process and probably the EOF is responsible for a major modification of the configuration and properties of the stationary phase. This clearly proves that chromatographic retention in CEC cannot be predicted from retention observed, even under identical experimental conditions, in HPLC.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Cluzeau Info Labo for the kind donation of the stationary phase material.

REFERENCES

- [1] T. Yoshida, *J. Biochem. Biophys. Methods* 60 (2004) 265.
- [2] C. Stella, S. Rudaz, J.-L. Veuthey, A. Tchaplal, *Chromatographia*, suppl. 53 (2001), S-113
- [3] L. Lyane, *J. Chromatogr. A* 957 (2002) 149.
- [4] D.V. McCalley, *J. Chromatogr. A* 844 (1999) 23.
- [5] H. Engelhardt, R. Grüner, M. Scherer, *Chromatographia* 53 Suppl. (2001) S-154.
- [6] C.R. Silva, S. Bachmann, R.R. Schefer, K. Albert, I.C.S.F. Jardim, C. Airoidi, *J. Chromatogr. A* 948 (2002) 85.
- [7] J.E. O’Gara, B.A. Alden, T.H. Walter, J.S. Petersen, C.L. Niederländer, U.D. Neue, *Anal. Chem.* 67 (1995) 3809.
- [8] J.E. O’Gara, D.P. Walsh, B.A. Alden, P. Casellini, T.H. Walter, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2992.
- [9] Y. Goto, K. Nakashima, K. Mitsuishi, M. Takafuji, S. Sakaki, H. Ihara, *Chromatographia* 56 J. (2002) 19.
- [10] N. S. Wilson, J. Gilroy, J. W. Dolan, L. R. Snyder, *J. Chromatogr. A* 1026, (2004), 91
- [11] C. Stella, S. Rudaz, M. Mottaz, P.-A. Carrupt, J.-L. Veuthey, *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 284
- [12] J. Jiskra, H. A. Claessens, C. A. Cramers, *J. Sep. Sci.* 26 (2003), 1305
- [13] L. Xu, Y.-Q. Feng, Z.-G. Shi, S.-L. Da, *J. Chromatogr. A* 1033 (2004) 161.
- [14] F. Progent, M. Taverna, *J. Chromatogr. A* 1052, (2004), 181
- [15] T. Adam, K.K. Unger, *J. Chromatogr. A* 894 (2000) 241.
- [16] K. Walhagen, K.K. Unger, A. M. Olsson, M. T. W. Hearn, *J. Chromatogr. A* 853 (1999) 263
- [17] K. Walhagen, K. K. Unger, *Anal. Chem.* 73, (2001), 4924
- [18] F. Steiner, B. Scherer, *Electrophoresis* 2005, 26, 1996
- [19] S. Kitagawa, T. Tsuda, *J. Chromatogr. A*, 995 (2003) 209
- [20] F. Progent, V. Augustin, N. T. Tran, S. Descroix, M. Taverna, *Electrophoresis*, *submitted*

- [21] A. S. Rathore, C. Horváth, *Anal. Chem.* 70 (1998), 3069
- [22] A. S. Rathore, Cs. Horváth, *Electrophoresis* 23, (2002) 1211
- [23] R. J. Boughtflower, T. Underwood, C. J. Paterson, *Chromatographia* 40 (1995) 329
- [24] L.A. Frame, M. L. Robinson, W. J. Lough, *J. Chromatogr. A*, 798 (1998) 243
- [25] L. R. Snyder, J. W. Dolan, J. R. Grant, *J. Chromatogr.* , 165 (1979) 3
- [26] N. Marchetti, G. Guiochon, *Anal. Chem.*, 77 (2005), 3425
- [27] B. Scherer, F. Steiner, *J. Chromatogr. A* 924, (2001) 197]
- [28] J. Kyte, R. F. Doolittle, *J. Mol. Biol.* 157 (1982) 105
- [29] M. Szumski, B. Buszewski, *J. Chromatogr. A* 1032 (2004) 141

LEGENDS

Figure n°1: Plot of the retention factor k of peptides versus ACN percentage in the mobile phase in HPLC.

Column: Stability BS-C23, 300 Å, $d_p = 5 \mu\text{m}$, 250 mm \times 2.2 mm. Mobile phase: phosphate buffer, pH 2.5/ACN, from 40/60 to 100/ 0 (v/v). Buffer concentration in mobile phase: 50 mM. Analytes: eledoisin (\square), renin substrat (\blacklozenge), FGGF (\times), eledoisin RP (\bullet), Arg-Arg-gastrin (\ast). EGF (\triangle), [Ile⁷]Angiotensin III (\blacklozenge).

Figure n°2: Plot of the $\log(k)$ versus ACN percentage in the mobile phase

Column: Stability BS-C23, 300 Å, $d_p = 5 \mu\text{m}$, 250 mm \times 2.2 mm, Mobile phase: phosphate buffer, pH 2.5/ACN, from 40/60 to 100/ 0 (v/v). Buffer concentration in mobile phase: 50 mM. Analytes: eledoisin (\square), renin substrat (\blacklozenge), FGGF (\times), eledoisin RP (\bullet), Arg-Arg-gastrin (\ast), EGF (\triangle).

Figure n°3: relationship between the S_i and physico-chemical characteristics of the investigated peptides (A) peptide mass and (B) hydrophobicity.

Column: Stability BS-C23, 250 mm \times 2.2 mm, 300 Å, $d_p = 5 \mu\text{m}$. Mobile phase: phosphate buffer, pH 2.5/ACN, from 40/60 to 100/ 0 (v/v). Buffer concentration in mobile phase: 50 mM.

Figure n°4: Variation of the “chromatographic” retention factor of peptides with the percentage of ACN decreasing from 60% to 20% in the case of HPLC and CEC.

TABLES

Table I: Physico-chemical characteristics of investigated peptides

Peptides	Molecular mass (g .mol ⁻¹)	pI ^a	charge at pH 2.5	Hydrophobicity ^b
FGGF	426	6	0.41	1.20
eledoisin RP	707	10.1	1.41	1.45
[Ile ⁷]Angiotensin III	897	8.75	2.41	0.37
eledoisin	1207	4.1	1.35	0.10
Arg-Arg-Gastrin	1380	4.1	2.32	-2.10
renin substrate	1759	7.8	3.37	0.28
EGF	2319	7.2	3.35	-0.67

^a the embl-heidelberg.de: EMBL WWW Gateway to Isoelectric Point Service was employed for calculating the pI values as well as the net-charge values of peptides at different pHs.

^b hydrophobicity was estimated on www.expasy.org with ProtScale, using parameter of Kyte and Doolittle [28].

Table II: Chromatographic retention factor in HPLC and in CEC at 60 and 20% of ACN in the mobile phase

peptide	60% ACN		20% ACN	
	HPLC	CEC with actual EOF	HPLC	CEC with actual EOF
Eledoisin RP	-0.22	0.28	-0.20	0.44
Eledoisin	-0.15	-0.01	2.82	3.49
Arg-Arg-Gastrin	-0.24	0.37	≈ 0	0.06
Renin substrat	-	0.23	0.83	0.51
EGF	-0.29	0.41	≈ 0	-0.22

FIGURES

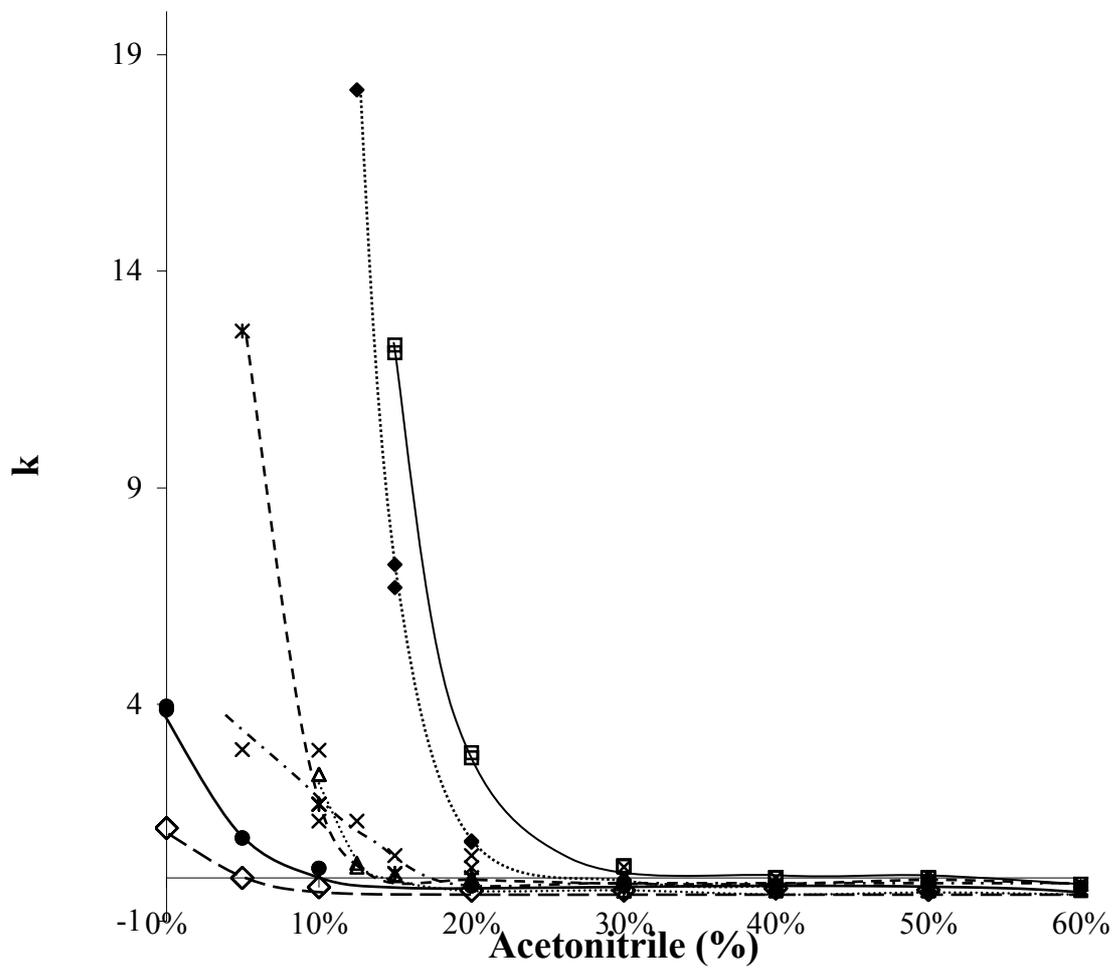


Fig. n°1

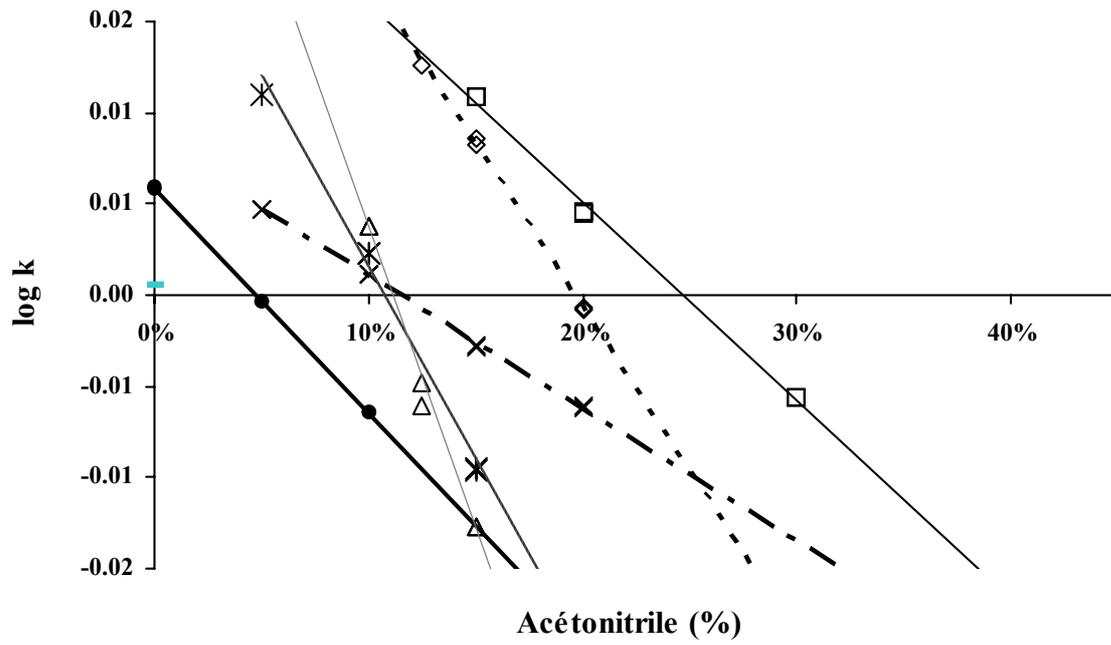


Fig. n°2

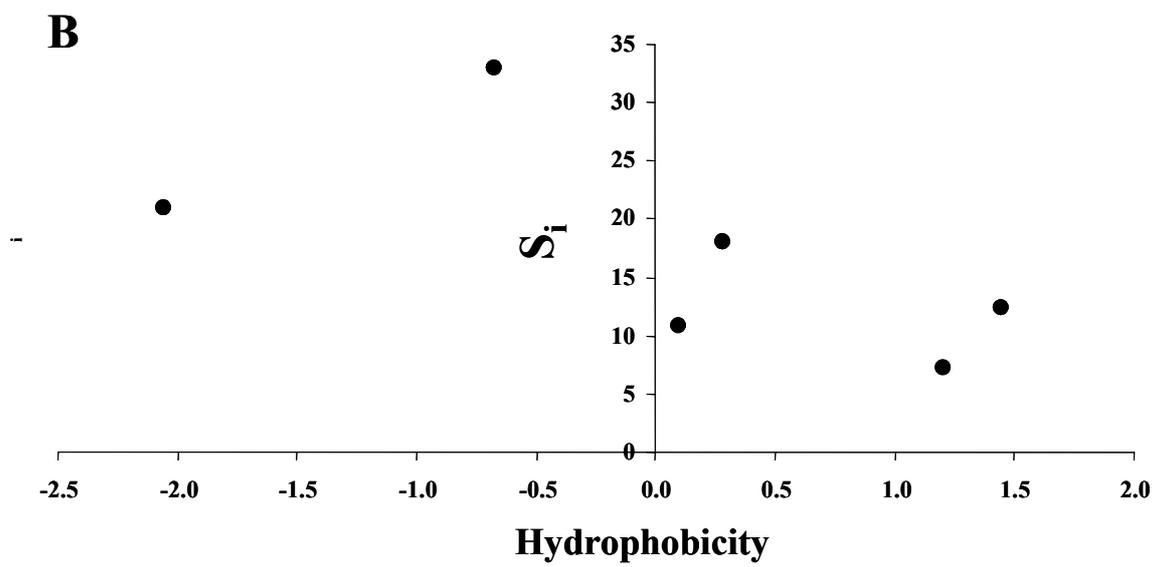
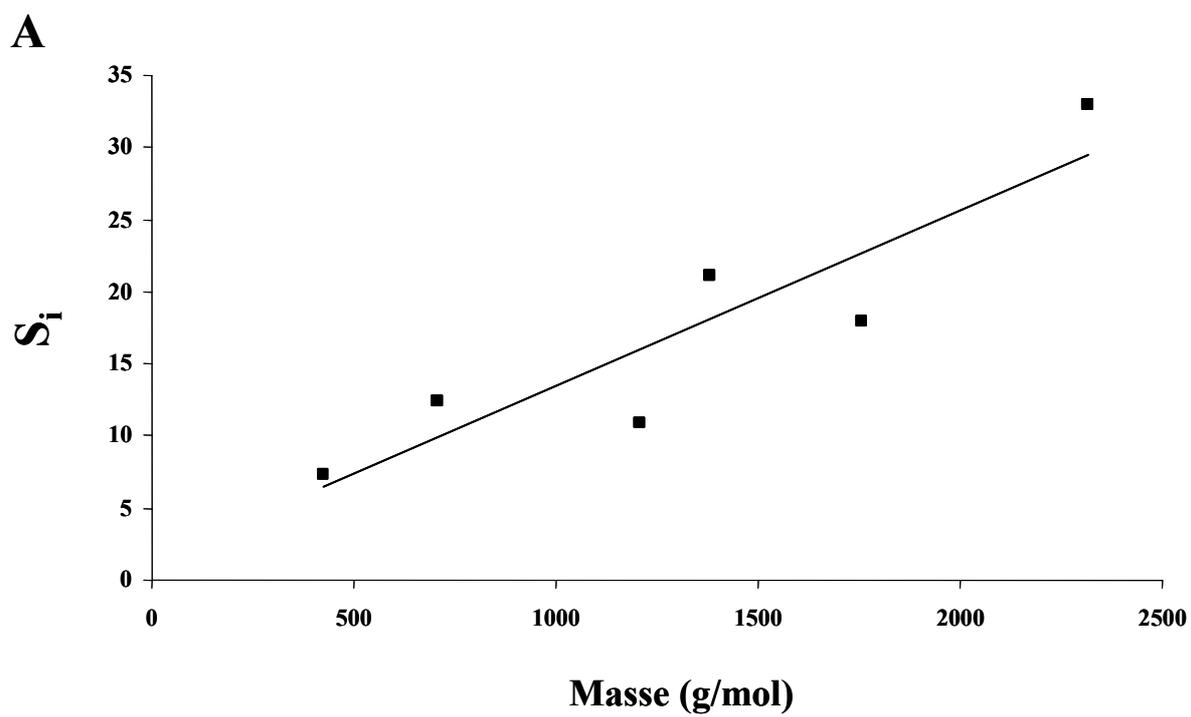


Figure n°3

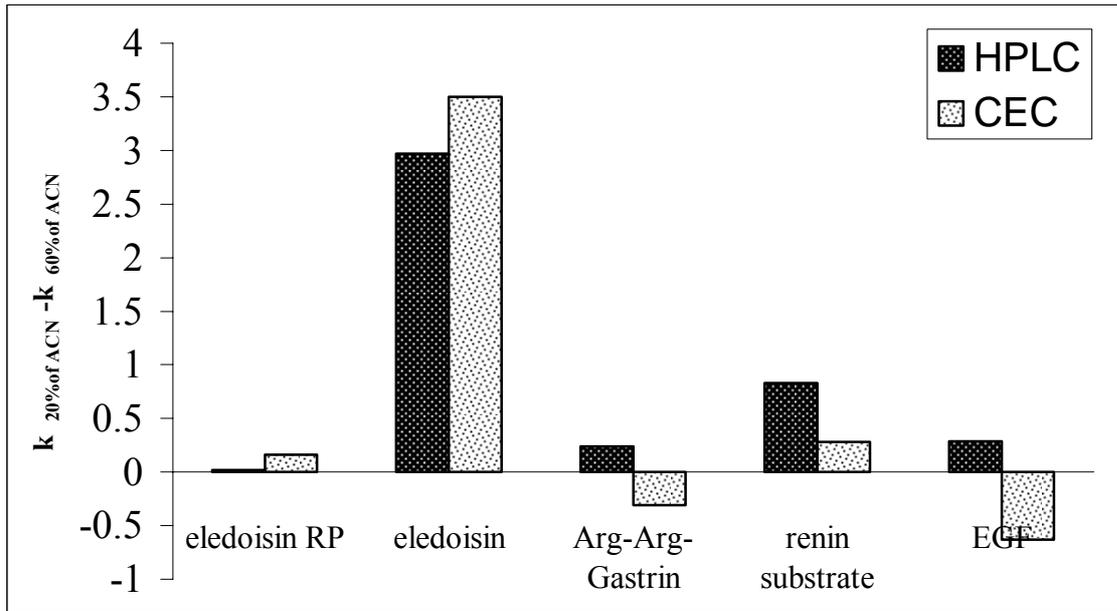


Fig. n°4

CHAPITRE VIII

DISCUSSION GENERALE

ET

CONCLUSION

A l'issue de l'ensemble du travail réalisé dans le cadre de ma thèse nous pouvons retirer que, outre les développements techniques liés à la fabrication de colonnes capillaires, j'ai été confronté à la nécessité de trouver des paramètres permettant l'exploitation des analyses d'ECC et la compréhension des phénomènes séparatifs mis en jeu pour l'analyse de peptides sur une phase stationnaire mixte, en ECC et en CLHP.

Dans cette discussion, j'ai choisi dans un premier temps de répertorier les résultats majeurs obtenus au cours de ma thèse, notamment en ce qui concerne les mécanismes de rétention observés sur cette phase. Puis, j'ai discuté de l'apport de la Stability BS-C23 en terme de chromatographie et d'électrochromatographie pour l'analyse de peptides. J'ai ensuite présenté mon opinion sur l'avenir de l'ECC.

En ce qui concerne le traitement des données d'ECC et la compréhension des phénomènes électrochromatographiques, j'ai testé les modèles de rétention qui me paraissent les plus pertinents. A l'issue de cette recherche, j'ai retenu 3 paramètres particulièrement utiles pour l'exploitation des données en ECC : le FEO réel et la rétention chromatographique en ECC proposés par l'équipe d'Horváth [9,47] et la porosité électrocinétique réelle que j'ai moi-même proposée.

J'ai validé l'emploi de ce dernier paramètre pour l'évaluation de mes colonnes particulières ainsi que pour des colonnes monolithiques à base d'acrylate. Ce paramètre doit, entre autres, mettre en évidence, lors d'analyses en ECC, la présence d'un FEO perfusif. Par ailleurs, il permet aussi d'étudier un certain nombre de données physiques de la phase : la taille des pores et le séchage éventuel de la phase stationnaire. C'est un paramètre purement électrochromatographique, exploitable en conditions réelles, qui peut servir dans la recherche de conditions optimales d'analyse, par exemple en terme de concentration du tampon de la phase mobile, de pourcentage et de nature de modificateur organique. En particulier, chaque composé chargé semble nécessiter des conditions d'analyse optimales qui lui sont propres.

J'ai étudié les possibilités offertes par la Stability BS-C23 pour l'analyse de peptides aussi bien en CLHP qu'en ECC. La Stability BS-C23 est stable en milieu acide avec divers tampons (pH 2,5) et d'un point de vue purement électrochromatographique, elle est intéressante en terme d'intensité et de stabilité du FEO anodique généré. En revanche, je n'ai constaté à aucun moment de FEO de second type sur cette phase mixte, qui comporte pourtant des charges. Cette observation pourrait prouver l'importance très limitée du FEO de second type dans des conditions usuelles d'utilisation (force ionique > 2 mM) et rejoindrait l'hypothèse de Rathore [15] et de Nischang et Tallarek [35] pour lesquels ce FEO reste marginal en conditions usuelles. Cette phase, par ailleurs, a permis une nette amélioration des asymétries des pics au

niveau des peptides et présente une sélectivité originale par rapport aux phases stationnaires ODS pour l'analyse de peptides par ECC en conditions acides. Mais cette phase et les phases mixtes en général sont beaucoup moins rétentes que les phases inverses traditionnelles [156, 202].

De nombreux auteurs observent en ECC des sélectivités originales, des efficacités ou des ordres d'élution inattendus, qu'il est difficile d'interpréter. Le plus souvent, leur conclusion se limite à les attribuer à une action concomitante, voire une interaction entre les phénomènes électrophorétiques et chromatographiques [184].

Nous pouvons tenter de définir une ébauche des mécanismes rétents impliqués sur une phase mixte en ECC. Le mécanisme de partage à polarité de phases inversée, qui est escompté, existe, mais la rétention chromatographique est globalement faible. Les greffons avec leur groupement polaire, ici chargé, sont bien entendu, nettement moins apolaires qu'une chaîne alkyle [156, 202], mais une baisse aussi marquée de la rétention en présence de chaînes octadécyle, paraît quand même surprenante. Un phénomène de répulsion électrostatique, très marqué en CLHP, permet d'expliquer cette faible rétention. Cependant en ECC, et dans les mêmes conditions, j'ai démontré que ce phénomène était négligeable.

Les interactions des peptides avec la phase stationnaire chargée peuvent par ailleurs relever des mécanismes d'échange d'ions. Même si je l'observe dans le cas d'un peptide analysé, ce phénomène s'est révélé peu important, probablement du fait de la charge globalement positive des peptides en milieu acide. Nous pouvons aussi envisager une chromatographie de type HILIC qui interviendrait en ECC par l'intermédiaire de la couche d'eau accumulée à proximité de l'ammonium quaternaire.

En ECC cette baisse de rétention est beaucoup moins gênante qu'en CLHP, étant donné que les phénomènes électrophorétiques assurent en partie la séparation. De plus, la rétention chromatographique paraît étonnement plus élevée en ECC qu'en CLHP. Mais nous avons vu combien la présence d'un champ électrique pouvait modifier la rétention chromatographique. Ainsi, mon travail a permis d'avancer certaines hypothèses pour expliquer les résultats obtenus en ECC sur la phase stationnaire mixte :

- ▶ Modification de la conformation des greffons en présence d'un champ électrique et/ou sous l'action d'une force générée par le FEO.
- ▶ Création d'une couche d'eau qui pourrait permettre la rétention des espèces les plus hydrophiles et qui expliquerait l'augmentation de la rétention chromatographique des

peptides les plus hydrophiles lors de la diminution du pourcentage d'eau dans la phase mobile.

- Variation de l'ionisation des charges présentes au niveau de la phase stationnaire sous l'influence du champ électrique

L'impact du champ électrique est donc prédominant, et j'ai montré qu'une tension plus élevée entraîne une diminution de la rétention chromatographique de certains peptides. Enfin, une dernière hypothèse, avancée par Xiang et Horváth [17], envisage que les analytes chargés puissent migrer sous l'action d'un champ électrique intense alors même qu'ils sont adsorbés sur la phase stationnaire (Fig. 71).

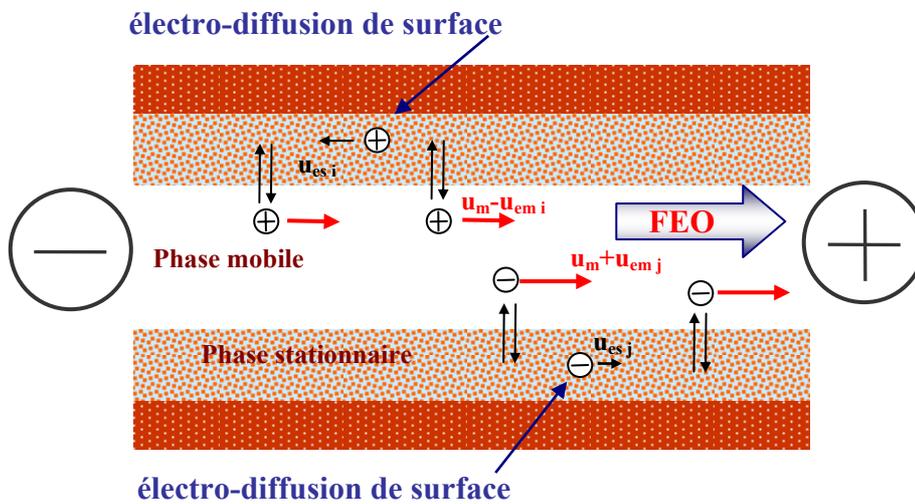


Figure 71 : Représentation schématique des phénomènes d'électrophorèse, de "rétention" et d'électro-diffusion à la surface de la phase stationnaire en ECC, u_m , vitesse de la phase mobile, $u_{me,i}$, vitesse électrophorétique du composé i, $u_{se,i}$ vitesse électrophorétique du composé i dans la phase stationnaire d'après [17]

Cette hypothèse laisserait entrevoir un resserrement des temps de sortie des analytes dans certains cas, mais surtout remet en cause de manière fondamentale l'acceptation classique de la rétention sur une phase stationnaire, puisque l'analyte retenu au niveau de la phase stationnaire serait sensible au champ électrique et pourrait migrer. Jusqu'à présent, cette hypothèse n'a pas pu être démontrée.

Pour Walhagen *et al.* [52], entre autres, cette multiplicité des phénomènes séparatifs observés en ECC est extrêmement favorable, car elle signifie qu'en ajustant précisément les conditions expérimentales il est possible de jouer finement sur les différents mécanismes séparatifs et de moduler ainsi de manière presque infinie la sélectivité. Mais, à l'heure actuelle, cette variété des mécanismes m'apparaît plutôt comme une source majeure de dispersion des analytes qui explique probablement les efficacités obtenues (50 000 à 150 000 p/m) qui se

révèlent pas aussi prometteuses que le laissait prédire la théorie et les concepts fondamentaux de l'ECC.

J'ai présenté au cours de ce mémoire les différents atouts de la Stability BS-C23 en ECC en terme de FEO, de symétrie des pics pour les peptides, y compris basiques, et de sélectivité. Grâce à cette phase il a été possible de réaliser pour la première fois en mode isocratique, sans pression auxiliaire des cartes peptidiques.

D'un point de vue technique, elle facilite grandement la fabrication de colonnes en permettant la fabrication de frittés dans la même phase que celle de séparation. De plus, la capacité des phases mixtes à supporter de très faibles quantités de solvant organique dans la phase mobile est souvent présentée comme un avantage et, de fait, la Stability BS-C23 présente une très bonne mouillabilité avec des phases mobiles relativement hydrophiles, y compris pour des analyses par CLHP avec une phase mobile 100% aqueuse.

En revanche des problèmes de mouillabilité inattendus pour une phase à greffon C18 pourraient se poser en milieu riche en solvant organique (à partir de 60% d'ACN dans nos conditions) avec cette phase mixte. De plus, la phase Stability BS-C23, possédant un groupement chargé (cationique) inséré, engendre des interactions soluté-phase stationnaire très variées. Ces différents phénomènes compliquent beaucoup la compréhension des phénomènes de rétention chromatographique, mais pourraient à l'inverse ouvrir la voie à des séparations à deux dimensions sur une seule et même phase en modulant les phénomènes de rétention à l'aide des conditions opératoires. Par exemple, l'existence d'un phénomène d'échange d'ions, pourtant très défavorisé en milieu acide, laisse augurer de la possibilité de jouer de l'échange d'ions et du partage à polarité de phases inversée selon le pH ou la force ionique. De plus, jouer sur le pourcentage de solvant organique ou sur la tension, peut donner la primauté à une séparation électrophorétique plutôt qu'électrochromatographique. Ces possibilités d'analyse à deux dimensions restent tout à fait virtuelles pour l'instant, en effet rien ne prouve qu'après une étude très fine des phénomènes séparatifs, nous serons en mesure d'expliquer et de maîtriser les différents processus séparatifs. Par exemple, quelques essais que j'ai effectués, mais pour lesquels je n'ai pas pu interpréter les résultats, m'ont montré que des ajouts infimes de NaCl (1 mM) dans la phase mobile conduisait à une très grande instabilité du courant en ECC. Quel rôle joue le NaCl ici ?

Plus d'un million de plateaux théoriques, une sélectivité nouvelle et inégalée, alliés avec la rapidité de l'EC, sa miniaturisation et son automatisation, le premier contact avec l'ECC fut

plus qu'enthousiasmant...700 capillaires et 8000 analyses plus tard, la situation est nettement plus nuancée.

Il ressort de mon expérience sur cette technique, que l'ECC se développera peut être plus en terme de sélectivité qu'en terme d'efficacité pour les mélanges de peptides et qu'elle nécessite encore des améliorations techniques, notamment au niveau de l'appareillage et des colonnes capillaires, mais aussi un travail approfondi sur la compréhension des phénomènes. Mes études ont révélé qu'il était utopique de s'appuyer sur les connaissances acquises en CLHP sur les phases stationnaires pour comprendre les mécanismes de rétention en ECC.

Une source d'amélioration majeure pour cette technique reste le matériel qui n'est pas réellement conçu pour l'ECC. Une bonne régulation de la température est primordiale, encore plus qu'en EC, du fait de la plus grande résistance des colonnes remplies par comparaison aux capillaires creux. Les appareils Beckman Coulter type P/ACE MDQ équipés d'un liquide de refroidissement peuvent mieux répondre à cette attente que les appareils Agilent, mais c'est au prix d'un nombre élevé de manipulations "risquées" pour introduire la colonne capillaire dans la cartouche de thermorégulation. De plus, le liquide caloporteur n'est pas compatible avec tous les capillaires. De façon générale, les équipements disponibles ne proposent que des pressions auxiliaires encore faibles (n'excédant pas 10 bars), et souvent aucune possibilité de réaliser un gradient d'élution (avec et sans pression) et, dans tous les cas, il n'existe pas de colonnes amovibles comme c'est le cas en CLHP. Ces évolutions sont envisageables mais au moyen de montage plus compliqués [150, 190] et elles seules permettraient la fabrication d'un vrai système intégré nano-CLHP, EC, ECC. Les travaux réalisés jusqu'à présent par la communauté scientifique ont montré qu'il était possible de se passer de ces options. J'ai réussi à établir les cartes peptidiques de la β -lactoglobuline et de l'hormone de croissance humaine recombinante par ECC, en mode isocratique et sans pression auxiliaire grâce à la Stability BS-C23, toutefois des gradients seront peut-être nécessaires pour l'analyse de mélanges particulièrement complexes de peptides [139].

Dans le domaine des colonnes capillaires d'ECC, la tendance actuelle est d'aller vers la synthèse de monolithes, avec deux grandes voies attrayantes : la synthèse par photopolymérisation, avec les monolithes à base d'acrylate et de méthacrylate et la synthèse à base de sol-gel. J'ai évoqué les difficultés à bien connaître la surface chromatographique de ces nouvelles colonnes et même si il reste quelques problèmes à résoudre, entre autres des difficultés à optimiser le mélange de synthèse, des problèmes de reproductibilité et des surfaces d'échange parfois trop faibles, les monolithes semblent être une solution pour éviter l'écueil des frittés et de leur fragilité.

En ce qui concerne le champ d'application, l'ECC s'est beaucoup développée pour les analyses de composés biologiques, mais est-il pertinent de continuer à optimiser des séparations, à l'heure où la SM fait des progrès importants et permet, entre autre, l'analyse directe de protéines ? Le faible coût de l'ECC par rapport à la SM et les possibilités de miniaturisation sont en faveur de l'ECC. Mais dans quelle mesure la miniaturisation n'est elle pas un leurre ? Miniaturiser les méthodes de séparation pose le problème de la détection de très faibles quantités d'analytes et de la non miniaturisation de ces méthodes de détection. Après une décennie d'intenses recherches en ECC, la pérennité de cette méthode et son épanouissement hors des laboratoires universitaires, passe par un usage plus aisé, c'est-à-dire par des colonnes beaucoup moins fragiles et un matériel adapté. L'ECC pourrait alors s'imposer pour sa souplesse, la rapidité des analyses, sa sélectivité et peut être aussi comme une étape de séparation préliminaire à la SM.

Il faut noter que parmi les modèles physiques et mathématiques appliqués à l'ECC, beaucoup sont utilisés par défaut. Transfuge de la CLHP, les courbes de Van Deemter sont-elles, par exemple, totalement adaptées à l'ECC ? Peut être ces modèles mathématiques ne nécessitent-ils que quelques réajustements, par exemple en ce qui concerne la résistance au transfert de masse lorsque le flux est perfusif. D'autre part, la question de la hauteur réduite n'est pas tranchée pour les phases monolithiques qui n'ont pas réellement de diamètre des particules. L'hypothèse de Xiang et Horváth [17] concernant l'électro-diffusion des analytes chargés reste à démontrer et les modèles mathématiques associés à développer. Affiner les outils propres à l'ECC est donc tout à fait d'actualité et nous avons d'ailleurs essayé d'œuvrer dans ce sens. J'ai proposé la porosité électrocinétique réelle, mais des études complémentaires sont à prévoir pour établir la validité de ce modèle et de cette estimation dans le cas où d'autres phases stationnaires, d'autres solvants et des tampons différents sont employés.

Une meilleure définition de la phase stationnaire, de sa structure, des greffons présents, la possibilité de bien connaître son comportement chromatographique m'ont conduit à privilégier une phase stationnaire particulière pour réaliser mes études en ECC. Mais il ressort de mes analyses, que l'ECC sur une phase stationnaire mixte chargée est très éloignée de la CLHP et qu'il est en réalité impossible de s'appuyer sur les connaissances en CLHP d'une phase stationnaire pour prédire et même expliquer les phénomènes chromatographiques en ECC.

Les tests chromatographiques sont largement développés et étudiés en CLHP, mais rien de similaire ne s'est encore développé en ECC. Les composés employés dans les tests

classiques de CLHP sont rarement étudiés en ECC [27,153, 203, 204] et aucun test de colonne propre à l'ECC, qui tiendrait compte des mobilités électrophorétiques des composés, n'a été envisagé. De ce point de vue l'ECC reste une "jeune" méthode qui a été testée tout azimut sur des échantillons et des colonnes originales, sans avoir encore le recul suffisant pour tenter une classification rationnelle des matériaux disponibles. Pourtant, étant donné l'effervescence qui règne actuellement dans le domaine de la synthèse de colonne, un test qui caractériserait la colonne autant en terme de charges, d'acidité, d'hydrophobie, d'activité silanophile, de sélectivité méthylène... tout en tenant compte de la mobilité électrophorétique des composés serait particulièrement instructif. La différence entre les phases mixtes de type I et II est aussi très instructive mais rarement testée, probablement car il est difficile de trouver des phases comparables (même support, même groupement).

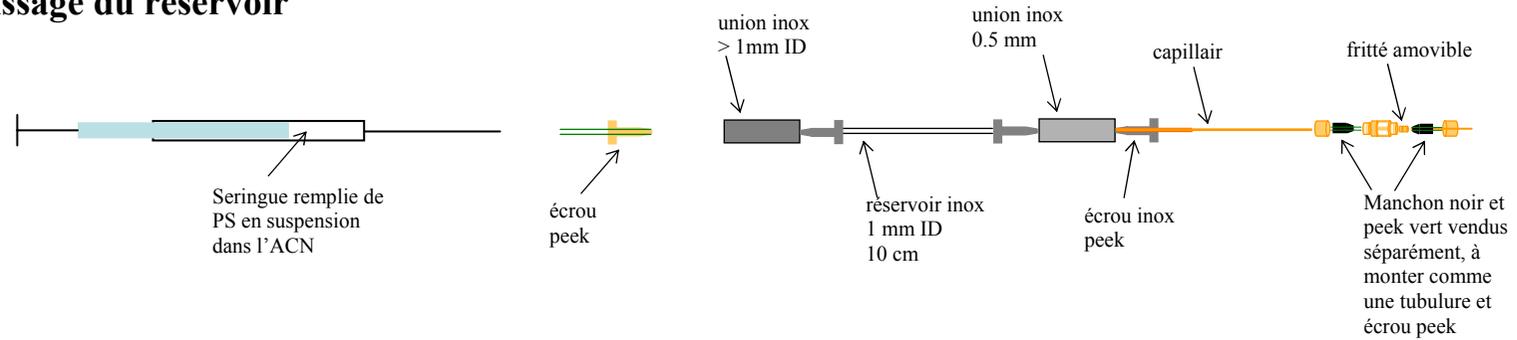
L'idéal serait un test fondé sur des composés simples, indicateurs d'un phénomène. Ces tests permettraient d'étudier l'impact souvent inattendu des tampons [177], du pH, mais aussi de la présence de sels.

A l'issue de ces tests de caractérisation de systèmes électrochromatographiques, une meilleure compréhension des phénomènes séparatifs en ECC ouvre plusieurs voies : (i) la maîtrise des compressions de pic et des conditions optimales d'analyses et la possibilité d'accéder à des efficacités accrues, (ii) le contrôle de la sélectivité en ECC, voire la possibilité de réaliser des analyses multi-dimensionnelles, en particulier sur les phases stationnaires mixtes. Alors, peut-être, l'ECC qui a connu un intense développement dans les laboratoires de recherche universitaires pourra jouer un rôle dans tous les laboratoires pharmaceutiques, agroalimentaires et plus généralement d'analyses chimiques.

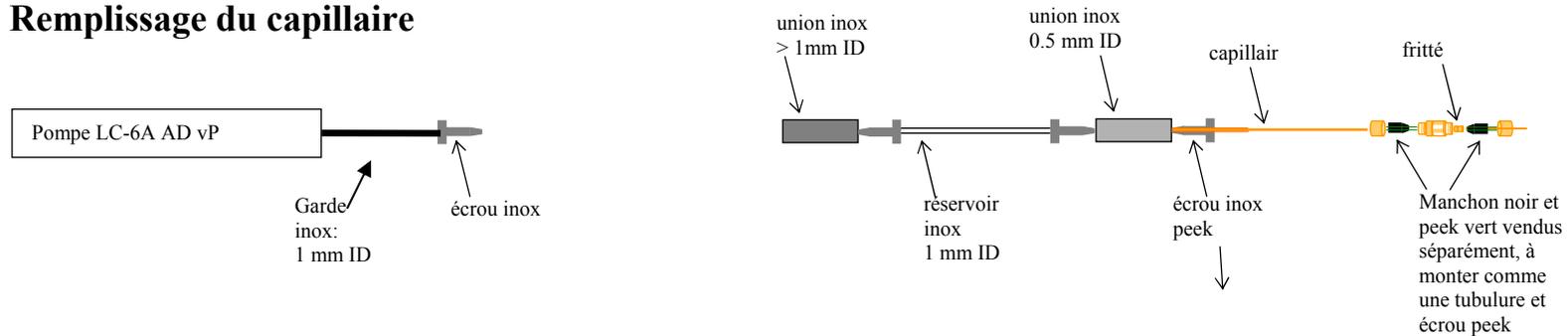
ANNEXES

ANNEXE I :
MONTAGES DE REMPLISSAGE

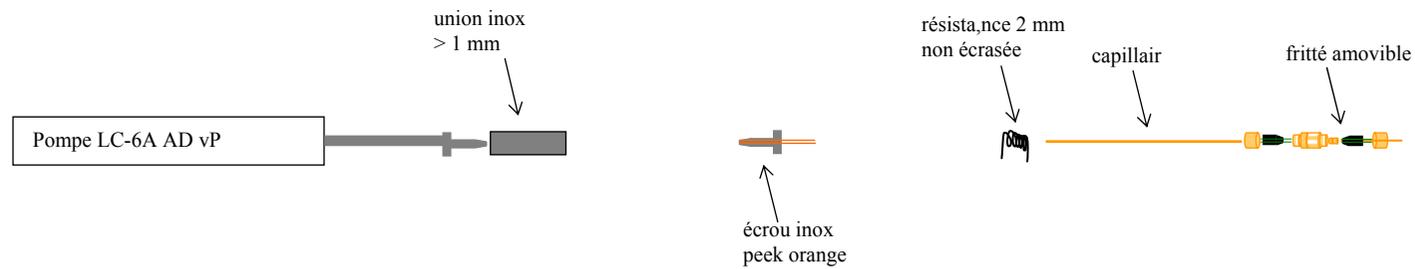
Remplissage du réservoir



Remplissage du capillaire



Tassement de la phase Stationnaire



ANNEXE II :

DESSALAGE DES DIGESTIONS DE PROTEINE

Dessalage sur cartouche octadécyle SPE 7020-03

Préconditionnement :

1. lavage 5 ml de méthanol
2. lavage 20 ml d'eau
3. lavage 10 ml de méthanol
4. lavage 10 ml d'ACN
5. lavage 10 ml d'eau acidifié (0,1 % de TFA)

Dépôt

Dépôt de 60 µl de protéine digérée à 2 mg/ml en protéine initiale et remplissage de la colonne avec un volume d'eau-0,1 % TFA.

Lavage

Élimination des sels par 4 ml d'eau+ TFA 0,1 %

Élution des peptides

Deux rinçages :

1. rinçage 4 ml eau/ACN, 33/67 %, (v/v), (0,1 % TFA)
2. rinçage 4 ml ACN (0,1 % TFA)

Évaporation et mise en solution

Évaporation des deux dernières fractions, rassemblées, avec un évaporateur- lyophilisateur (Maxi Dry Lyo, Heto Lab equipment, I.D. 872158)

Mise en solution dans l'eau à 5 µg/ ml

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] V. Kašička, *Electrophoresis* 2001, 22, 4139-4162
Recent advances in capillary electrophoresis of peptides
- [2] J. W. Jorgenson, K. D. A. Lukacs, , *J. Chromatogr.* 1981, 218, 209-216
High-resolution separations based on electrophoresis and electroosmosis.
- [3] N. W. Smith, M. B. Evans, *Chromatographia* 1995, 41, 197-203
The efficient analysis of neutral and highly polar pharmaceutical compounds using reversed-phase and ion-exchange electrochromatography
- [4] J. Pesek, *J. Sep. Sci.* 2001, 24, 435-443
Whatever happened to capillary electrochromatography ?
- [5] P. Gareil, *Analisis* 1990, 18, 221-241
L'électrophorèse de zone et la chromatographie électrocinétique capillaire, I.- Principes et notions fondamentales
- [6] P. Gareil, *Analisis* 1990, 18, 447-468
L'électrophorèse de zone et la chromatographie électrocinétique capillaire, II.- Mise en oeuvre expérimentale et applications
- [7] A. S. Rathore, Cs. Horváth, *J. Chromatogr. A*, 781 (1997) 185-195
Capillary electrochromatography; theories on electroosmotic flow in porous media,
- [8] K. D. Altria, N. W. Smith, C. H. Turnbull, *Chromatographia* 1997, 46, 664-674
A review of the current status of capillary electrochromatography technology and applications
- [9] A. S. Rathore, C. Horváth, *Anal. Chem.* 1998, 70, 3069-3077
Axial nonuniformities and flow in columns for capillary electrochromatography
- [10] N. Smith, M. B. Evans, *J. Chromatogr. A* 1999, 832, 41-54
Comparison of the electroosmotic flow profiles and selectivity of stationary phases used in capillary electrochromatography
- [11] M. Ye, H. Zou, Z. Liu, J. Zhu, J. Ni, Y. Zhang,, *Science in China, Series B*, 1999, 42, 639-648
Theoretical study of the separation mechanism of ionizable compounds in capillary electrochromatography
- [12] N. W. Smith, A. S. Carter-Finch, *J. Chromatogr. A* 2000, 892 219-255
Electrochromatography

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

Theory of capillary electrochromatography,

[14] Frantisek Svec, in Modern advances in chromatography, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology Vol.76, T. Scheper and R. Freitag ed., 2002, Springerlag Amsterdam

Capillary electrochromatography: a rapidly emerging separation method

[15] A. S. Rathore, *Electrophoresis* 2002, 23, 3827-3846

Theory of electroosmotic flow, retention and separation efficiency in capillary electrochromatography

[16] Eds : A. S. Rathore, A. Guttman, Marcel Dekker, New York- Basel, 2004

Electrokinetic phenomena, Principles and applications in analytical chemistry and microchip technology

[17] Xiang, R., Horváth, Cs., *Anal. Chem.* 2002, 74, 762-770

Fundamentals of capillary electrochromatography: migration behaviour

[18] B. J. Kirby, E. F. Hasselbrink Jr., *Electrophoresis* 2004, 25, 187-202

Zeta potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques, and effects on separations

[19] J. T. G. Overbeek, Chap. V, in Colloid Science, H. R. Kruyt (Ed.) Elsevier, New York, 1952, 194-203

Electrokinetic phenomena

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

Miniaturisation in pressure and electroosmotically driven liquid chromatography: some theoretical considerations

[21] U. Tallarek, E. Rapp, A. Seidel-Morgenstern, H. Van As, *J. Phys. Chem. B* 2001, 106, 12709-12721

Electroosmotic flow phenomena in packed capillaries: from the interstitial velocities to intraparticle and boundary layer mass transfer

[22] E. Venema, J. C. Kraak, H. Poppe, R. Tijssen, *J. Chromatogr. A* 1999, 837, 3-15

Pore flow effects in electrically driven size-exclusion chromatography

[23] R. Stol, W. T. Kok, H. Poppe, *J. Chromatogr. A* 1999, 853, 45-54

Capillary electrochromatography with macroporous particles

[24] R. Stol, H. Poppe, W. T. Kok, *J. Chromatogr. A* 2000, 887, 199-208

Modelling of pore flow in capillary electrochromatography

- [25] R. Stol, H. Poppe, W. T. Kok, *Anal. Chem.* 2001, 73, 3332-3339
Effect of pore flow on the separation efficiency in capillary electrochromatography with porous particles
- [26] C. Legido-Quigley, N. Marlin, N. W. Smith, *J. Chromatogr. A* 2004, 1030, 195-200
Comparison of styrene-divinylbenzene-based monoliths and Vydac nano-liquid chromatography columns for protein analysis
- [27] R. Stol, W. T. Kok, in *Electrokinetic Phenomena*, Ed. Anurag S. Rathore, András Guttman, Marcel Dekker, Inc. New York, 2004, pg 189-209,
Effects of pore flow on separation efficiency in capillary electrochromatography with porous particles
- [28] H. S. Dearie, V. Spikmans, N. W. Smith, F. Moffatt, S.A.C. Wren, K. P. Evans, *J. Chromatogr. A* 2001, 929, 123-131
Characterisation of electroosmotic flow in capillary electrochromatography columns
- [29] S. S. Dukhin, *Advances in colloid and interface science* 1991, 35, 173-196
Electrokinetic phenomena of the second kind and their applications
- [30] A. A. Baran, Y. A. Babich, A. A. Tarovsky, N. A. Mischuk, *Colloids and surfaces* 1992, 68, 141-151
Superfast electrophoresis of ion-exchanger particules
- [31] S. S. Dukhin, N. A. Mishchuk, *J. Membrane Sci.* 1993, 79, 199-210
Intensification of electro dialysis based on electroosmosis of the second kind
- [32] N. A. Mishchuk, P.V. Takhistov, *Colloids and surfaces A/ Physicochemical and engineering aspects* 95 (1995) 119-131
electroosmosis of the second kind
- [33] G. Chen, U. Tallarek, *Langmuir* 2003, 19, 10901-10908
Effect of intraparticle porosity and double layer overlap on electrokinetic mobility in multiparticle systems
- [34] U. Tallarek, F. C. Leinweber, I. Nischang, *Electrophoresis* 2005, 26, 391-404
Perspective on concentration polarization effects in electrochromatographic separations
- [35] I. Nischang, U. Tallarek, *Electrophoresis* 2004, 25, 2935-2945
Nonlinear electroosmosis in hierarchical monolithic structures
- [36] U. Tallarek, M. Pačes, E. Rapp, *Electrophoresis* 2003, 24, 4241-4253
Perfusive flow and intraparticle distribution of a neutral analyte in capillary electrochromatography

- [37] M. Girod, B. Chankvetadze, G. Blaschke, *Electrophoresis* 2001, 22, 1282-1291
Enantioseparations using nonaqueous capillary electrochromatography on cellulose and amylase tris (3,5-dimethylphenylcarbamates) coated on silica gels of various pore and particle size
- [38] J.-C. Valette, Thèse, 2004, Université Claude Bernard-Lyon I
Apport de l'électrochromatographie capillaire à l'analyse d'antibiotiques : application à la famille des phénicolés et tétracyclines
- [39] U. Pyell, H. Rebscher, A. Banholczer, *J. Chromatogr. A* 1997, 779, 155-163
Influence of sample plug width in capillary electrochromatography
- [40] M. M. Dittman, G. P. Rozing, *J. Chromatogr. A* 1996, 744, 63-74
Capillary electrochromatography- a high-efficiency micro separation technique
- [41] H. Poppe, R. Stol, W. T. Kok, *J. Chromatogr. A* 2002, 965, 75-82
Expressions for the C-term in the presence of pore flow
- [42] Veronika Szucs, Ruth Freitag, *J. Chromatogr. A* 2004, 1044, 201-210
Comparison of a three-peptide separation by capillary electrochromatography, voltage-assisted liquid chromatography and nano-high-performance liquid chromatography
- [43] P. D. A. Angus, C. W. Demarest, T. Catalano, J. F. Stobaugh, *Electrophoresis* 1999, 20, 2349-2359
Evaluation of 1.5 μ m reversed phase nonporous silica in packed capillary electrochromatography and application in pharmaceutical analysis
- [44] F. Lelièvre, C. Yan, R. N. Zare, P. Gareil, *J. Chromatogr. A* 1996, 723, 145-156
Capillary électrochromatographie: operating characteristics and enantiomeric separation
- [45] A. S. Rathore, C. Horváth, *J. Chromatogr. A* 1996, 743, 231-246
Separation parameters via virtual migration distances in high-performance liquid chromatography, capillary zone electrophoresis and electrokinetic chromatography
- [46] A. S. Rathore, A. P. Mc Keown, M. R. Euerby, *J. Chromatogr. A* 2003, 1010, 105-111
Interplay of chromatographic and electrophoretic processes in capillary electrochromatography
- [47] A. S. Rathore, Cs. Horváth, *Electrophoresis* 2002, 23, 1211-1216
Chromatographic and electrophoretic migration parameters in capillary electrochromatography
- [48] Z. Liu, K. Otsuka, S. Terabe, *J. Chromatogr. A* 2002, 959, 241-253
Modeling of retention behaviour in capillary electrochromatography from chromatographic and electrophoretic data

[49] M. I. Huber, T. P. Hennessy, Dieter Lubda, K. K. Unger, *J. Chromatogr. B* 2004, 803 137-147

Evaluation and comparison of tailor-made stationary phases based on spherical silica-based beads for capillary électrochromatographie via peptide separation analysis

[50] S. Kitagawa, T. Tsuda, *J. Chromatogr. A* 2003, 995, 209-215

Behavior of neutral solutes in pressurized flow driven electrochromatography using a mixed stationary phase of ODS and anion-exchange,

[51] Y. Zhang, W. Shi, L. Zhang, H. Zou, *J. Chromatogr. A* 1998, 802, 59-71

Some aspects of chromatographic behaviour in capillary electrochromatography

[52] K. Walhagen, M. I. Huber, T. P. Hennessy, M. T. W. Hearn, *Biopolymers* 2003 71, 429-453

On the nature of the forces controlling selectivity in the high performance capillary electrochromatographic separation of peptides

[53] M. G. Cikalo, K. D. Bartle, P. Myers, *J. Chromatogr. A* 1999, 836, 35-51

Influence of the electrical double-layer on electroosmotic flow in capillary electrochromatography

[54] J.-T. Wu, P. Huang, M. X. Li, D. M. Lubman, *Anal. Chem.* 1997, 69, 2908-2913

Protein digest analysis by pressurized capillary electrochromatography using an ion trap storage/ reflectron time-of-flight mass detector

[55] M. M. Dittmann, K. Masuch, Gerard P. Rozing, *J. Chromatogr. A* 2000, 887, 209-221

Separation of basic solutes by reversed-phase capillary electrochromatography

[56] A. S. Rathore, E. Wen, Cs. Horváth, *Anal. Chem.* 1999, 71, 2633-2641

Electroosmotic mobility and conductivity in columns for capillary electrochromatography

[57] P. Huang, J.-T. Wu, D. M. Lubman, *Anal. Chem.* 1998, 70, 3003-3008

Separation of tryptic digest using a modified buffer in pressurized capillary electrochromatography with an ion trap storage/reflectron time-of-flight mass spectrometer

[58] M. Bedair, Z. El Rassi, *Electrophoresis* 2002, 23, 2938-2948

Capillary electrochromatography with monolithic stationary phases: 1. Preparation of sulfonated stearyl acrylate monoliths and their electrochromatographic characterization with neutral and charged solutes

[59] S. Eetlink, W. M. C. Decrop, G. P. Rozing, P. J. Schoenmakers, W. T. Kok, *J. Sep. Sci.* 2004, 27, 1431-1440

Comparison of the efficiency of microparticulate and monolithic capillary columns

[60] K. K. Unger, *Journal of chromatography library*, vol. 16, Elsevier, Amsterdam, 1979

Porous silica, its properties and use as support in column liquid chromatography

- [61] K. Walhagen, K.K. Unger, M. T. W. Hearn, *J. Chromatogr. A* 2000, 887, 165-185
Capillary electroosmotic chromatography of peptides
- [62] R. Wu, H. Zou, H. Fu, W. Jin, M. Ye, *Electrophoresis* 2002, 23, 1239-1245
Separation of peptides on mixed mode of reversed-phase and ion-exchange capillary electrochromatography with a monolithic column
- [63] K. Walhagen, K. K. Unger, *Anal. Chem.* 2001, 73, 4924-4936
Capillary electrochromatography analysis of hormonal cyclic and linear peptides
- [64] E. Hilder, F. Svec, J. M. J. Fréchet, *Anal. Chem.* 2004, 76, 3887-3892
Shielded stationary phases based on porous polymer monoliths for the capillary electrochromatography of highly basic biomolecules
- [65] S. Zhang, X. Huang, J. Zhang, Cs. Horváth, *J. Chromatogr. A* 2000, 887, 465-477
Capillary electrochromatography of proteins and peptides with a cationic acrylic monolith
- [66] L. A. Colón, K. J. Reynolds, R. Alicea-Maldonado, A. M. Fermier, *Electrophoresis* 1997, 18, 2162-2174
Advances in capillary electrochromatography
- [67] L. A. Colón, G. Burgos, T. D. Maloney, J. M. Cintrón, R. L. Rodriguez, *Electrophoresis* 2000, 21, 3965-3993
Recent progress in capillary electrochromatography
- [68] U. Pyell, , *J. Chromatogr. A* 2000, 892, 257-278
Advances in column technology and instrumentation in capillary electrochromatography
- [69] C.-Y. Liu, *Electrophoresis* 2001, 22, 612-628
Stationary phases for capillary electrophoresis and capillary electrochromatography
- [70] L. A. Colón, T. D. Maloney, J. Anspach, H. Colón, *Adv. Chromatogr.* 2003, 42, 43-106
Column technology for capillary electrochromatography
- [71] C. P. Kapnissi-Christodoulou, X. Zhu, I. M. Warner, *Electrophoresis* 2003, 24, 3917-3934
Analytical separations in open-tubular capillary electrochromatography
- [72] K. Jinno, H. Sawada, *Trends in analytical chemistry* 2000, 19, 664-675
Recent trends in open-tubular capillary electrochromatography
- [73] J. J. Pesek, M. T. Matyska, S. Sentellas, M. T. Galceran, M. Chiari, G. Pirri, *Electrophoresis* 2002, 23, 2982-2989
Multimodal open-tubular capillary electrochromatography analysis of amines and peptides

[74] E. Guihen, J. D. Glennon, *J. Chromatogr. A* 2004, 1044, 67-81

Recent highlights in stationary phase design for open-tubular capillary electrochromatography

[75] J. J. Pesek, M. T. Matyska, *J. Chromatogr. A* 2000, 887, 31-41

Open tubular capillary electrokinetic chromatography in etched fused-silica tubes

[76] M. T. Matyska, J. J. Pesek, I. Boysen, T. W. Hearn, *Electrophoresis* 2001, 22, 2620-2628

Characterization and applications of etched chemically modified capillaries for open-tubular capillary electrochromatography

[77] J. J. Pesek, M. T. Matyska, G. B. Dawson, J. I-C. Chen, R. I. Boysen, M. T. W. Hearn, *Anal. Chem.* 2004, 76, 23-30

Open tubular capillary electrochromatographie of synthetic peptides on etched chemically modified columns

[78] G. B. Dawson, M. T. Matyska, J. J. Pesek, R. R. Seipert, *J. Chromatogr. A* 2004, 1047, 299-303

Electrochromatographic studies of etched capillaries modified with a cyano pentoxy biphenyl liquid crystal

[79] J. J. Pesek, M. T. Matyska, S. Swedberg, S. Udivar, *Electrophoresis* 1999, 20, 2343-2348

Protein and peptide separations on high surface area capillaries

[80] M. T. Matyska, J. J. Pesek, R. I. Boysen, M. T. W. Hearn, *Anal. Chem.* 2001, 73, 5116-5125

Characterization of open-tubular capillary electrochromatography columns for the analysis of synthetic peptides using isocratic conditions

[81] F. L. Onuska, M.E. Comba, T. Bistricki, R. J. Wilkinson, *J. Chromatogr.* 1977, 142, 117-125

Preparation of surface-modified wide-bore wall coated open-tubular columns

[82] Pullen, P. E., Pesek, J. J., Matyska, M. T., Frommer, J., *Anal. Chem.* 2000, 72, 2751-2757

Characterization by atomic force microscopy of fused-silica capillaries chemically modified for capillary electrokinetic chromatography

[83] J. J. Pesek, M. T. Matyska, L. Mauskar, *J. Chromatogr. A* 1997, 763, 307-314

Separation of protein and peptides by capillary electrochromatography in diol- and octadecyl-modified etched capillaries

- [84] H. Zou, M. Ye, *Electrophoresis* 2000, 21, 4073-4079
Capillary electrochromatography with physically and dynamically adsorbed stationary phases
- [85] Z. Liu, R. Wu, H. Zou, *Electrophoresis* 2002, 23, 3954-3972
Recent progress in adsorbed stationary phases for capillary électrochromatographie
- [86] M. W. Kamande, C. P. Kapnissi, X. Zhu, C. Akbay, I. M. Warner, *Electrophoresis* 2003, 24, 945-951
Open-tubular capillary electrochromatography using a polymeric surfactant coating
- [87] X. Huang, J. Zhang, Cs. Horváth, *J. Chromatogr. A* 1999, 858, 91-101
Capillary electrochromatography of proteins and peptides with porous-layer open-tubular columns
- [88] A. Malik, *Electrophoresis* 2002, 23, 3973-3992
Advances in sol-gel based columns for capillary electrochromatography: sol-gel open-tubular columns
- [89] A.-M., Siouffi, *J. Chromatogr. A* 2003, 1000, 801-818
Silica gel-based monoliths prepared by the sol-gel method: facts and figures
- [90] S. Constantin, R. Freitag, *J. Chromatogr. A* 2000, 887, 253-263
Preparation of stationary phases for open-tubular capillary électrochromatographie using the sol-gel method
- [91] M. Crosnier de Bellaistre, O. Mathieu, J. Randon, J.L. Rocca, *J. Chromatogr. A* 2002, 971, 199-205
Control of electroosmotic flow in zirconia-coated capillaries
- [92] A. C. Pierre, Edition Septima, Paris 1992
Introduction aux procédés sol-gel
- [93] J. D. Hayes, A. Malik, *Anal. Chem.* 2001,73, 987-996
Sol-Gel open tubular ODS columns with reversed electroosmotic flow for capillary electrochromatography
- [94] P. D.A. Angus, C. W. Demarest, T. Catalano, J. F. Stobaugh, *J. Chromatogr. A* 2000, 887, 347-365
Aspect of column fabrication for packed capillary electrochromatography,
- [95] L. A. Colón, T. D. Maloney, A. M. Fermier, *J. Chromatogr. A* 2000, 887, 43-53
Packing columns for capillary elctrochromatography

- [96] Lança, F., Rodrigues, J. C., Freitas, S. de S., *J. Sep. Sci.* 2004, 27, 1475-1482
Preparation and use of packed capillary columns in chromatographic and related techniques
- [97] R. J. Boughtflower, T. Underwood, C. J. Paterson, *Chromatographia* 1995, 40, 329-335
Capillary electrochromatography- some important considerations in the preparation of packed capillaries and the choice of mobile phase buffers
- [98] M.M. Robson, S. Roulin, S. M. Shariff, M.W. Raynor, K. D. Bartle, A. A. Clifford, P. Myers, M.R. Euerby, C. M. Johnson, *Chromatographia* 1996, 43,
Capillary electrochromatography using columns packed with a supercritical fluid carrier
- [99] Q. Qu, X. Hu, X. Zhu, S.Gao, Q. Xu, Y. Wang, X. Wang, *J. Sep. Sci.* 2004, 27, 1229-1232
Packing capillary electrochromatography columns using vacuum-A preliminary study
- [100] E. Rapp, E. Bayer, *J. Chromatogr. A* 2000, 887, 367-378
Improved column preparation and performance in capillary electrochromatography
- [101] G. Wang, M. Lowry, Z. Zhong, L. Geng, *J. Chromatogr. A* 2005, 1062, 275-283
Direct observation of frits and dynamic air bubble formation in capillary electrochromatography using confocal fluorescence microscopy
- [102] J.-R. Chen, M. T. Dulay, R. N. Zare, *Anal. Chem.* 2000, 72, 1224-1227
Macroporous photopolymer frits for capillary electrochromatography
- [103] S. M. Piraino, J. G. Dorsey, *Anal. Chem.* 2003, 75, 4292-4296
Comparison of frits used in the preparation of packed capillaries for capillary electrochromatography
- [104] M. Mayer, E. Rapp, C. Marck, G. J. M. Bruin, *Electrophoresis*, 1999, 20, 43-49
Fritless capillary electrochromatography
- [105] Lord, G. A., Gordon, D. B., Myers, P., King, B. W., *J. Chromatogr. A* 1997, 768, 9-16
Tapers and restrictors for capillary electrochromatography and capillary electrochromatography-mass spectrometry
- [106] E. Baltussen, G. W. K. van Dedem, *Electrophoresis* 2002, 23, 1224-1229
Novel approach for fritless capillary electrochromatography
- [107] Q. Tang, B. Xin, M. L. Lee, *J. Chromatogr. A* 1999, 837, 35-50
Monolithic columns containing sol-gel bonded octadecylsilica for capillary electrochromatography

- [108] Q. Tang, N. Wu, M. L. Lee, *J. Microcol. Sep.* 1999, *11*, 550-561
Continuous-bed columns containing sol-gel bonded large-pore octadecylsilica for capillary electrochromatography
- [109] Q. Tang, M. L. Lee, *J. High Resol. Chromatogr.* 2000, *23*, 73-80
Continuous-bed columns containing sol-gel bonded packing materials for capillary electrochromatography
- [110] Q. Tang, M. L. Lee, *J. Chromatogr. A* 2000, *887*, 265-275
Capillary electrochromatography using continuous-bed columns of sol-gel bonded silica particles with mixed-mode octadecyl and propylsulfonic acid functional groups
- [111] M. T. Dulay, R. P. Kulkarni, . N. Zare, *Anal. Chem.* 1998, *70*, 5103-5107
Preparation and characterization of monolithic porous capillary columns loaded with chromatographic particles
- [112] Oguri, S., Tanagaki, H., Hamaye, M., Kato, M., Toyo'oka, T., *Anal. Chem.* 2003, *75*, 5240-5245
On-line preconcentration prior to on-column derivatization monolith octadecasiloxane capillary electrochromatography for the determination of biogenic amines
- [113] G. S. Chirica, V. T. Remcho, *Electrophoresis* 2000, *21*, 3093-3101
A simple procedure for the preparation of fritless columns by entrapping conventional high performance liquid chromatography sorbent
- [114] T. Adam, K. K. Unger, M. M. Dittmann, G. P. Rozing, *J. Chromatogr. A* 2000, *887*, 327-337
Towards the columns bed stabilization of columns in capillary electroendosmotic chromatography. Immobilization of microparticulate silica columns to a continuous bed
- [115] H. Zou, X. Huang, M. Ye, Q. Luo, *J. Chromatogr. A* 2002, *954*, 5-32
Monolithic stationary phases for liquid chromatography and capillary electrochromatography
- [116] F. Steiner, T. Lobert, *Chromatographia* 2003, *58*, 207-212
Characterisation of strong cation exchangers and sulfonic acid alkyl mixed mode materials as stationary phases for capillary electrochromatography
- [117] E. Hilder, F. Svec, J. M. J. Fréchet, *J. Chromatogr. A* 2004, *1044*, 3-22
Development and application of polymeric monolithic stationary phases for capillary electrochromatography

- [118] M. Bedair, Z. El Rassi, *Electrophoresis* 2004, 25, 4110-4119
Recent advances in polymeric monolithic stationary phases for electrochromatography in capillaries and chips
- [119] F. Svec, J. M. J. Fréchet, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 1999, 38, 34-48
Molded rigid monolithic porous polymers : an inexpensive, efficient, and versatile alternative to beads for the design of materials for numerous applications
- [120] T. Ikegami, N. Tanaka, *Current opinion in chemical biology* 2004, 8, 527-533
Monolithic columns for high-efficiency HPLC separation
- [121] C. Legido-Quigley, N. D. Marlin, V. Melin, A. Manz, N. W. Smith, *Electrophoresis* 2003, 24, 917-944
Advances in capillary electrochromatography and micro-high performance liquid chromatography monolithic columns for separation science
- [122] I. Gusev, X. Huang, Cs. Horváth, *J. Chromatogr. A* 1999, 855, 273-290
Capillary columns with in situ formed porous monolithic packing for micro high-performance liquid chromatography and capillary electrochromatography,
- [123] T. Jiang, J. Jiskra, H. A. Claessens, C. A. Cramers, *J. Chromatogr. A* 2001, 923, 215-227
Preparation and characterization of monolithic polymer columns for capillary electrochromatography
- [124] C. Fujimoto, J. Kino, H. Sawada, *J. Chromatogr. A* 1995, 716, 107-113
Capillary electrochromatography of small molecules in polyacrylamide gels with electroosmotic flow,
- [125] N. Delaunay-Bertoncini, C. Demesmay, J.-L. Rocca, *Electrophoresis* 2004, 25, 3204-3215
Development and in situ synthesis of monolithic stationary phases for electrochromatographic separation
- [126] D. Allen, Z. El Rassi, *Electrophoresis* 2003, 24, 3962-3976
Silica-based monoliths for capillary electrochromatography : methods of fabrication and their applications in analytical separation
- [128] N. Tanaka, H. Kobayashi, K. Nakanishi, H. Minakuchi, N. Ishizuka, *Anal. Chem.* 2001, 420 A- 429 A
Monolithic LC Columns
- [129] W. Li, D. P. Fries, A. Malik, *J. Chromatogr. A* 2004, 1044, 23-52
Sol-gel stationary phases for capillary electrochromatography

[130] N. Ishizuka, H. Kobayashi, H. Minakuchi, K. Nakanishi, K. Hirao, K. Hosoya, T. Ikegami, N. Tanaka, *J. Chromatogr. A* 2002, 960, 85-96

Monolithic silica columns for high-efficiency separations by high-performance liquid chromatography

[131] E. F. Hilder, F. Svec, J. M.J. Fréchet, *Electrophoresis* 2002, 23, 3934-3953

Polymeric monolithic stationary phases for capillary electrochromatography

[132] F. Svec, E. C. Peters, D. Sýkora, C. Yu, J. M. J. Fréchet, *J. High Resol. Chromatogr.* 2000, 23, 3-18

Monolithic stationary phases for capillary electrochromatography based on synthetic polymers: designs and applications

[133] J. L. Liao, N. Chen, S. Hjertén, *Anal. Chem.* 1996, 68, 3468-3472

Preparation of continuous beds derivatized with one-step alkyl and sulfonate groups for capillary electrochromatography

[134] A. Palm, M. V. Novotny, *Anal. Chem.* 1997, 69, 4499-4507

Macroporous polyacrylamide/poly(ethylene glycol) matrixes as stationary phases in capillary electrochromatography

[135] R. Freitag, *J. Chromatogr. A* 2004, 1033, 267-273

Comparison of the chromatographic behaviour of monolithic capillary columns in capillary electrochromatography and nano-high-performance liquid chromatography

[136] A. H. Que, M. V. Novotny, *Anal. Chem.* 2002, 74, 5184-5191

Separation of neutral saccharide mixtures with capillary electrochromatography using hydrophilic monolithic columns

[137] D. Hoegger, R. Freitag, *J. Chromatogr. A* 2001, 914, 211-222

Acrylamide-based monoliths as robust stationary phases for capillary electrochromatography

[138] C. Legido-Quigley, N. Marlin, N. W. Smith, *J. Chromatogr. A* 2004, 1030, 195-200

Comparison of styrene-divinylbenzene-based monoliths and Vydac nano-liquid chromatography columns for protein analysis

[139] A. R. Ivanov, Cs. Horváth, B. L. Karger, *Electrophoresis* 2003, 24, 3663-3673

High-efficiency peptide analysis on monolithic multimode capillary columns: Pressure-assisted capillary electrochromatography/capillary electrophoresis coupled to UV and electrospray ionization-mass spectrometry

[140] A. Premstaller, H. Oberacher, C. G. Huber, *Anal. Chem.* 2000, 72, 4386-4393

High-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry of single- and doubled stranded nucleic acids using monolithic capillary columns

[141] A. Premstaller, H. Oberacher, W. Walcher, A. M. Timperio, L. Zolla, J.-P. Chervet, N. Cavusoglu, A. Van Dorsselar, C. G. Huber, *Anal. Chem.* 2000, 72, 4386-4393

High-performance liquid chromatography electrospray ionization mass using monolithic capillary columns for proteomic studies

[142] W. Jin, H. Fu,, X. Huang, H. Xiao, H. Zou, *Electrophoresis* 2003, 24, 3172-3180

Optimized preparation of poly(styrene-co-dininybenzene-co-methacrylic acide) monolithic capillary column for capillary électrochromatographie

[143] G. S. Chirica, V. T. Remcho, *J. Chromatogr. A* 2001, 924, 223-232

Novel monolithic columns with templated porosity

[144] E. C. Peters, M. Petro, F. Svec, J. M. J. Fréchet, *Anal. Chem.* 1997, 69, 3646-3649

Molded rigid polymer monoliths as separation media for capillary electrochromatography

[145] E. C. Peters, M. Petro, F. Svec, J. M. J. Fréchet, *Anal. Chem.* 1998, 70, 2288-2295

Molded rigid polymer monoliths as separation media for capillary electrochromatography. 1. Fine control of porous properties and surface chemistry,

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

Chip electrochromatography

[147] Q.-H. Wan, *J. Phys. Chem. B* 1997, 101, 8449-8453

Electrical conductivity as a tool for characterizing packing structure in capillary electrochromatography

[148] M. Pursch, L. C. Sander, *J. Chromatogr. A* 2000, 887, 313-326

Stationary phases for capillary electrochromatography

[149] J. Jiskra, H. A. Claessens, C. A. Cramers, *J. Sep. Sci.* 2003, 26, 1305-1330

Stationary and mobiles phases in capillary electrochromatography (CEC)

[150] B. Behnke, J. W. Metzger, *Electrophoresis* 1999, 20, 80-83

Tryptic digest mapping by gradient capillary elecchromatography

[151] K. Ohyama, M. Wada, N. Kishikawa, Y. Ohba, K. Nakashima, N. Kuroda, *J. Chromatogr. A* 2005, 1064, 255-259

Stepwise gradient of buffer concentration for capillary électrochromatographie of peptides on sulfonated naphthalimido-modified silyl silica gel

[152] G. Ping, P. Schmitt-Kopplin, N. Hertkorn, W. Zhang, Y. Zhang, A. Kettrup, *Electrophoresis* 2003, 24, 958-969

Separation of selected humic degradation compounds by capillary electrochromatography with monolithic and packed columns

[153] A. P. Mc Keown, M. Euerby, H. Lomax, *J. Sep. Sci.* 2002, 25, 1257-126

Assesment of silica_based reversed-phase materials for the analysis of a range of basic analytes by capillary electrochromatography

[154] J.C. Valette, A.C. Bizet, C. Demesmay, J.L. Rocca, E. Verdon, *J. Chromatogr. A* 2004, 1049, 171-181

Separation of basic compounds by capillary electrochromatography on an X-Terra RP18[®] stationary phase

[155] J. Jiskra, T. Jiang, H. A. Claessens, C. A. Cramers, *J. Microcol. Sep.* 2000, 12, 530-540
Chromatographic properties of reversed phase stationary phases under pressure and electro driven conditions. Effect of buffer composition

[156] N. S. Wilson, J. Gilroy, J. W. Dolan, L. R. Snyder, *J. Chromatogr. A* 2004, 1026, 91-100
Column selectivity in reversed-phase liquid chromatography VI Columns with embedded or end-capping polar groups

[157] R. E. Majors, *LC GC*, 1998, 17, 198-220
Analytical HPLC column technology and current status

[158] C. Stella, thèse n°3412, Université de Genève, 2003
Caractérisation de phases stationnaires pour l'analyse de substances basiques à l'aide d'outils chimométriques

[159] K. Ohyama, Y. Shirawasa, M. Wada, N. Kishikawa, Y. Ohba, K. Nakashima, N. Kuroda, *J. Chromatogr. A* 2004, 1042, 189-195
Investigation of the novel mixed-mode stationary phase for capillary electrochromatography I. Preparation and characterisation of sulfonated naphthalimido-modified silyl silica gel

[160] J. Zhang, X. Huang, S. Zhang, Cs. Horváth, *Anal. Chem.* 2000, 72, 3022-3029
Capillary electrochromatography of proteins on an anion-exchanger column,

[161] M. Bedair, Z. El Rassi, *J. Chromatogr. A* 2003, 1013, 35-45
Capillary electrochromatography with monolithic stationary phases II Preparation with cationic stearyl-acrylate monoliths and their electrochromatographic characterization

[162] D. Hoegger, R. Freitag, *J. Chromatogr. A* 2003, 1004, 195-208
Investigation of mixed-mode monolithic stationary phases for the analysis of charged amino acids and peptides by capillary electrochromatography

[163] Y. Li, R. Xiang, Cs. Horváth, J. A. Wilkins, *Electrophoresis* 2004, 25, 545-553
Capillary electrochromatography of peptides on a neutral porous monolith with annular electroosmotic flow generation

- [164] K. D. Altria, *J. Chromatogr. A* 1999, 856, 443-463
Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography
- [165] D. J. Throckmorton, T. J. Shepodd, A. K. Singh, *Anal. Chem.* 2002, 74, 784-789
Electrochromatography in microchips: Reversed-phase separation of peptides and amino acids using photopatterned rigid polymer monoliths
- [166] G. Ping, L. Zhang, L. Zhang, P. Schmitt-Kopplin, A. Kettrup, Y. Zhang, *J. Chromatogr. A* 2004, 1035, 265-270
Separation of acidic and basic compounds in capillary electrochromatography with polymethacrylate-based monolithic columns
- [167] Ren'an Wu, Hanfa Zou, Mingliang Ye, Zhengdeng Lei, Jianyi Ni, *Anal. Chem.* 2001, 73, 4918-4923
Capillary electrochromatography for separation of peptides driven with electrophoretic mobility on monolithic column
- [168] D. Hindocha, N. W. Smith, *Chromatographia* 2002, 55, 203-209
The analysis of basic pharmaceutical compounds by capillary electrochromatography using continuous bed stationary phase
- [169] C. Klampf, W. Buchberger, P. R. Haddad, *J. Chromatogr. A* 2001, 911, 277-283
Fast separation of pyrimidine derivatives by capillary electrochromatography on ion-exchange/reversed-phase mixed-mode stationary phases.
- [170] H. Fu, C. Xie, H. Xiao, J. Dong, J. HU, H. Zou, *J. Chromatogr. A* 2004, 1044, 237-244
Monolithic columns with mixed modes of reversed-phase and anion-exchange stationary phase for capillary electrochromatography
- [171] I. Gusev, Cs. Horváth, *J. Chromatogr. A* 2002, 948, 203-233
Streaming potential in open and packed fused-silica capillaries
- [172] S. Zhang, X. Huang, N. Yao, Cs. Horváth, *J. Chromatogr. A*, 2002 948, 193-201
Preparation of monodisperse porous polymethacrylate microspheres and their application in the capillary electrochromatography of macrolide antibiotics
- [173] O. Kornyšova, A. Maruška, P. K. Owens, M. Erikson, *J. Chromatogr. A* 2005, 1071, 171-178
Non-particulate (continuous bed or monolithic) acrylated-based capillary columns for reversed-phase liquid chromatography and electrochromatography
- [174] C. W. Klampfl, E. F. Hilder, P. R. Haddad, *J. Chromatogr. A* 2000, 888, 267-274
Investigations on the behaviour of acidic, basic and neutral compounds in capillary electrochromatography on a mixed-mode stationary phase

- [175] C. Yang, Z. El Rassi, *Electrophoresis* 2000, 21, 1977-1984
Electrically driven microseparation methods for pesticides and metabolites: III. Capillary electrochromatography with novel silica-based stationary phases having a surface-bound surfactant moiety
- [176] J. D. Hayes, A. Malik, *Anal. Chem.* 2000, 72, 4090-4099
Sol-gel columns with reversed electroosmotic flow for capillary electrochromatography,
- [177] B. Scherer, F. Steiner, *J. Chromatogr. A* 2001, 924, 197-209
Application of hydrophobic anion-exchange phases in capillary electrochromatography
- [178] P. Huang, X. Jin, Y. Chen, J. R. Srinivasan, D. Lubman, *Anal. Chem.* 1999, 71, 1786-1791
Used of a mixed-mode packing and voltage tuning for peptide mixture separation in pressurized capillary electrochromatography with an ion trap storage/reflectron time-of-flight mass spectrometer detector
- [179] A. Dermaux, P. Sandra, *Electrophoresis* 1999, 20, 3027-3065
Applications of capillary electrochromatography
- [180] I. S. Krull, A. Sebag, R. Stevenson, *J. Chromatogr. A* 2000, 887, 137-163
Specific applications of capillary electrochromatography to biopolymers, including proteins, nucleic acids, peptide mapping, antibodies, and so forth
- [181] G. Vanhoenacker, T. Van den Bosch, G. Rozing, P. Sandra, *Electrophoresis* 2001, 22, 4064-4103
Recent applications of capillary electrochromatography
- [182] H. Fu, X. Huang, W. Jin, H. Zou, *Current opinion in biotechnology* 2003, 14, 1-5
The separation of biomolecules using capillary electrochromatography
- [183] C. W. Huck, G. Stecher, R. Bakry, G. K. Bonn, *Electrophoresis* 2003, 24, 3977-3997
Recent progress in high-performance capillary bioseparation
- [184] Y. Li, R. Xiang, J. A. Wilkins, Cs. Horvath, *Electrophoresis* 2004, 25, 2242-2256
Capillary electrochromatography of peptides and proteins
- [185] D. Bandilla, C. D. Skinner, *J. Chromatogr. A* 2004, 1044, 113-129
Capillary electrochromatography of peptides and proteins
- [186] A. Apffel, H. Yin, W. S. Hancock, D. McManigill, J. Frenz, S.-L. Wu, *J. Chromatogr. A* 1999, 832, 149-163
Effect of electric field on liquid chromatographic separation of peptide digests. Combining capillary separation techniques

- [187] T. Adam, K. K Unger, *J. Chromatogr. A* 2000, 894, 241-251
Comparative study of capillary electroendosmotic chromatography and electrically assisted gradient nano-liquid chromatography for the separation of peptides
- [188] K. Zhang, Z. Jiang, C. Yao, Z. Zhang, Q. Wang, R. Gao, C. Yan, *J. Chromatogr. A* 2003, 987, 453-458
Separation of peptides by pressurized capillary electrochromatography
- [189] R. Nakashima, S. Kitagawa, T. Yoshida, T. Tsuda, *J. Chromatogr. A* 2004, 1044, 305-309
Study of flow rate in pressurized gradient capillary electrochromatography using splitter and separation of peptides using an amide stationary phase
- [190] J.-T. Wu, P. Huang, M. X. Li, D. M. Lubman, *Anal. Chem.* 1997, 69, 320-326
Open-tubular capillary electrochromatography with an on-line ion trap storage/ reflectron time-of-flight mass detector for ultrafast peptide mixture analysis
- [191] N. Johannesson, M. Wetterhall, K. E. Markides, J. Bergquist, *Electrophoresis* 2004, 25, 809-816
Monomer surface modifications for rapid peptide analysis by capillary electrophoresis and capillary electrochromatography coupled to electrospray ionization-mass spectrometry
- [192] B. E. Slentz, N. A. Penner, F. E. Regnier, *J. Chromatogr. A* 2002, 948, 225-233
Capillary electrochromatography of peptides on microfabricated poly(dimethylsiloxane)chips modified by cerium (IV)-catalyzed polymerisation
- [193] B. He, J. Ji, F. E. Regnier, *J. Chromatogr. A* 2000, 887, 465-477
Capillary electrochromatography of peptides in a microfabricated system
- [194] B. E. Slentz, N. A. Penner, F. E. Regnier, *J. Chromatogr. A* 2003, 984, 97-107
Protein proteolysis and the multi-dimensional electrochromatographic separation of histidine-containing peptide fragments on a chip
- [195] B. He, N. Tait, F. Regnier, *Anal. Chem.* 1998, 70, 3790-3797
Fabrication of nanocolumns for liquid chromatography
- [196] S. Zhang, J. Zhang, Cs Horváth, *J. Chromatogr. A* 2001, 914, 189-200
Rapid separation of peptides and proteins by isocratic capillary electrochromatography at elevated temperature
- [197] A. S. Rathore, Y. Li, J. Wilkins, *J. Chromatogr. A* 2005 sous presse
Use of electrokinetic measurements for characterization of columns used in capillary electrochromatography

[198] Z. Liang, J. Duan, L. Zhang, W. Zhang, Y. Zhang, C. Yan, *Anal. Chem.* 2004, 76, 6935-6940

Pressurized electrochromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry for analysis of peptides and proteins

[199] X. Zhang, S. Huang, *J. Chromatogr. A* 2001, 910, 13-18

Single step on-column frit making for capillary high-performance liquid chromatography using sol-gel technology

[200] M. Schmid, F. Bäuml, A. P. Köhne, T. Welsch, *J. High Resol. Chromatogr.* 1999, 22, 438-442

Preparation of on-column frits in packed fused silica by sol-gel technology

[201] C. R. Silva, I. C. Sales Fontes Jardim, C. Airoidi, *J. Chromatogr. A* 2003, 987, 139-146

Evaluation of applicability and the stability of a C₁₈ stationary phase containing embedded urea groups

[202] H. Engelhardt, R. Grüner, M. Scherer, *Chromatographia* 2001, 53 suppl., S 154-S 161

The polar selectivities of non-polar reversed phases

[203] D. Norton, S. A. Shamsi, *J. Chromatogr. A* 2003, 1008, 217-232

Capillary electrochromatography of methylated benzo[a]pyrene isomers II Effect of stationary phase tuning

[204] J. Jiskra, H. A. Claessens, C. A. Cramers, R. Kaliszan, *J. Chromatogr. A* 2002, 977, 193-206

Quantitative structure-retention relationships in comparative studies behavior of stationary phases under high-performance liquid chromatography and capillary electrochromatography conditions

[205] C. Stella, S. Rudaz, J.-L. Veuthey, A. Tchaplá, *Chromatographia* 2001, suppl. 53, S-113 – S-131

Silica and other materials as supports in liquid chromatography. Chromatographic tests and their importance for evaluating these supports. Part I

[206] C. Stella, S. Rudaz, J.-L. Veuthey, A. Tchaplá, *Chromatographia* 2001, suppl. 53, S-132 – S-140

Silica and other materials as supports in liquid chromatography. Chromatographic tests and their importance for evaluating these supports. Part II

[207] R. E. Majors, M. Przybyciel, LC-GC Europe, dec 2002

Columns for reversed-phase LC separations in highly aqueous mobile phases

[208] C. Stella, S. Rudaz, M. Mottaz, P.-A. Carrupt, J.-L. Veuthey, *J. Sep. Sci.* 2004, 27, 284-292

Analysis of basic compounds at high pH values by reversed-phase liquid chromatography

[209] A. Maisch, *GIT Fachz. Lab.*, 2001, 21, 370-371
Stability BS-C23 eine spezielle C 18 Phase mit positiver Ladung

Liste des Equations

- Eq. 1 $\delta = \sqrt{\frac{\epsilon_0 \epsilon_r R T}{2 F^2 I}}$ pg 29
- Eq. 2 $\zeta = \frac{\delta \sigma}{\epsilon_0 \epsilon_r}$ pg 29
- Eq. 3 $v_{eo} = \mu_{eo} E$ pg 29
- Eq. 4 $v_{eo} = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r \zeta E}{\eta}$ pg 29
- Eq. 5 $v_{eo \text{ moy}} = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r \zeta E}{\eta} \left(\frac{\sigma_{remplie}}{\sigma_{creuse}} \right)$ pg 32
- Eq. 6 $\mu_{eo \text{ moy}} = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r \zeta}{\eta} \left(\frac{\sigma_{remplie}}{\sigma_{creuse}} \right)$ pg 32
- Eq. 7 $\mu_{eo} = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r \zeta \tau}{\eta}$ pg 33
- Eq. 8 $\tau = \left(\frac{\sigma_{remplie}}{\sigma_{creuse}} \right)$ pg 33
- Eq. 9 $v_{eo \text{ moy}} = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r E}{\eta} d_p E \left(\frac{\sigma_{remplie}}{\sigma_{creux}} \right)$ pg 36
- Eq. 10 $\sigma_{obs}^2 = \sigma_{externe}^2 + \sigma_{colonne}^2$ pg 38
- Eq. 11 $\sigma_{externe}^2 = \sigma_{injection}^2 + \sigma_{detection}^2 + \sigma_{eletrodispersion}^2 + \sigma_{adsorption}^2 + \sigma_{effet Joule}^2 + \sigma_{discontinuité}^2$ pg 39
- Eq. 12 $H = \frac{B}{u} + A + C_m u + C_s u$ pg 40

Eq. 13 $B = 2\gamma D$ pg 41

Eq. 14 $v_{epi} = \mu_{epi} E$ pg 42

Eq. 15 $\mu_{epi}^{\infty} = \frac{q_i}{6\pi\eta R_i}$ pg 42

Eq. 16 $\mu_{epi} = \mu_{epi}^{\infty} \left(-\omega\sqrt{|z_i|I} \right)$ pg 42

Eq. 17 $v_i = \frac{v_o}{1+k_{chrom}}$ pg 44

Eq. 18 $k_{chrom} = \frac{t_i - t_0}{t_0}$ pg 44

Eq. 19 $k_{app} = \frac{t_i - t_{eo}}{t_{eo}}$ pg 44

Eq. 20 $v_i = \frac{v_{eo} + v_{epi}}{1+k_{chromECC}}$ pg 45

Eq. 21 $\kappa_e = \frac{\mu_{ep}}{\mu_{eo\ remplie}}$ pg 45

Eq. 22 $k_c = k_{chromECC} + k_{chromECC}\kappa_e + \kappa_e$ pg 45

Eq. 23 $k'_{ECC} = \left(1 - \frac{v_{epi}}{v_{eo} + v_{epi}} \right) k_{chrom} - \frac{v_{epi}}{v_{eo} + v_{epi}}$ pg 46

Eq. 24 $v_{obs} = \frac{v_{eo} (1 + \kappa_e)}{1 + k_{chromECC}}$ pg 46

Eq. 25 $k_{chromECC} = \frac{t_i(1+\kappa_e) - t_{eo}}{t_{eo}}$ pg 46

RESUME

L'électrochromatographie capillaire (ECC), est une méthode analytique innovante qui est réalisée à l'aide d'une colonne capillaire remplie de phase stationnaire. L'ECC combine une analyse sous champ électrique avec une séparation des analytes par interaction avec la phase stationnaire. J'ai testé le potentiel de cette technique ainsi que celui d'une phase stationnaire mixte, comportant un groupement ammonium quaternaire à la base d'une chaîne octadécyle : la phase Stability BS-C23, pour assurer la séparation de mélanges complexes de peptides.

Après avoir établi un protocole de remplissage de capillaires et comparé différents modes d'immobilisation de la phase stationnaire, j'ai étudié les caractéristiques physico-chimiques de mes colonnes à l'aide de trois paramètres : le flux électroosmotique réellement engendré au sein de la phase stationnaire, la rétention chromatographique en ECC et un nouveau paramètre, la porosité électrocinétique que j'ai proposé pour évaluer la porosité d'une colonne capillaire directement à partir d'analyses d'ECC. Ces paramètres m'ont permis d'étudier le flux électroosmotique perfusif, la mouillabilité de la phase stationnaire et de déterminer les conditions d'analyse qui permettent d'obtenir les plus grandes efficacités pour des composés neutres et des peptides.

La phase stationnaire mixte engendre un flux électroosmotique intense, indépendant du pH. Et grâce à ses propriétés il a été possible de réaliser des cartes peptidiques de la β -lactoglobuline et de l'hormone de croissance recombinante humaine par ECC, en mode isocratique en moins de 20 minutes, sans l'aide d'aucune pression auxiliaire.

Des analyses réalisées sur des peptides standards, en conditions acides, ont démontré un gain significatif de la symétrie des pics par comparaison à une phase stationnaire octadécyle conventionnelle, ainsi que la prédominance des phénomènes électrophorétiques et une faible rétention à polarité de phases inversée. J'ai démontré qu'aucun phénomène de répulsion ne pouvait être incriminé et que des phénomènes d'échange d'ions étaient extrêmement limités.

Une étude comparative en chromatographie en phase liquide haute performance et en ECC sur la phase mixte Stability BS-C23, a démontré une très grande différence de rétention chromatographique entre les deux modes d'analyse et souligne la profonde originalité de la sélectivité rencontrée en ECC.

MOTS-CLES

Electrochromatographie capillaire (ECC) – chromatographie en phase liquide haute performance (CLHP) – phase stationnaire – mode mixte – colonne capillaire – fritté – porosité électrocinétique – flux électroosmotique – peptides – carte peptidique – hormone de croissance recombinante humaine.

POLE : CHIMIE

LABORATOIRE DE RATTACHEMENT

LABORATOIRE DE CHIMIE ANALYTIQUE (EA 3343)

UNIVERSITÉ PARIS XI

UFR «FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHATENAY-MALABRY »

5, RUE JEAN BAPTISTE CLEMENT

92296 CHATENAY-MALABRY CEDEX