

---

# Notions d'échelle dans les méthodes de séparation :

## Techniques séparatives miniaturisées

---

# PLAN

---

Miniaturiser, pourquoi?

HPLC: avantages et limites du changement d'échelle

Une alternative intéressante

    l'électrophorèse capillaire

    les techniques apparentées

Vers les micropuces : conception et dimensionnement des systèmes

## Quelques points-clés

---

- Années 60:** CPG en colonnes remplies  
Premiers spectromètres de masse
- Années 70:** Introduction de la CPG en colonnes capillaires  
Introduction de la HPLC
- Années 90:** Introduction de l'électrophorèse capillaire  
Spectrométrie de masse: API, MALDI, ICP,...  
Sciences séparatives + couplage MS : >50% du marché instrumental  
Rôle croissant de la biologie dans les développements analytiques
- Années 2000:** Miniaturisation dans tous les domaines  
Chimie bioanalytique pour le diagnostic rapide

# Quelle est la demande en chimie séparative?

---

## Caractéristiques de la méthode:

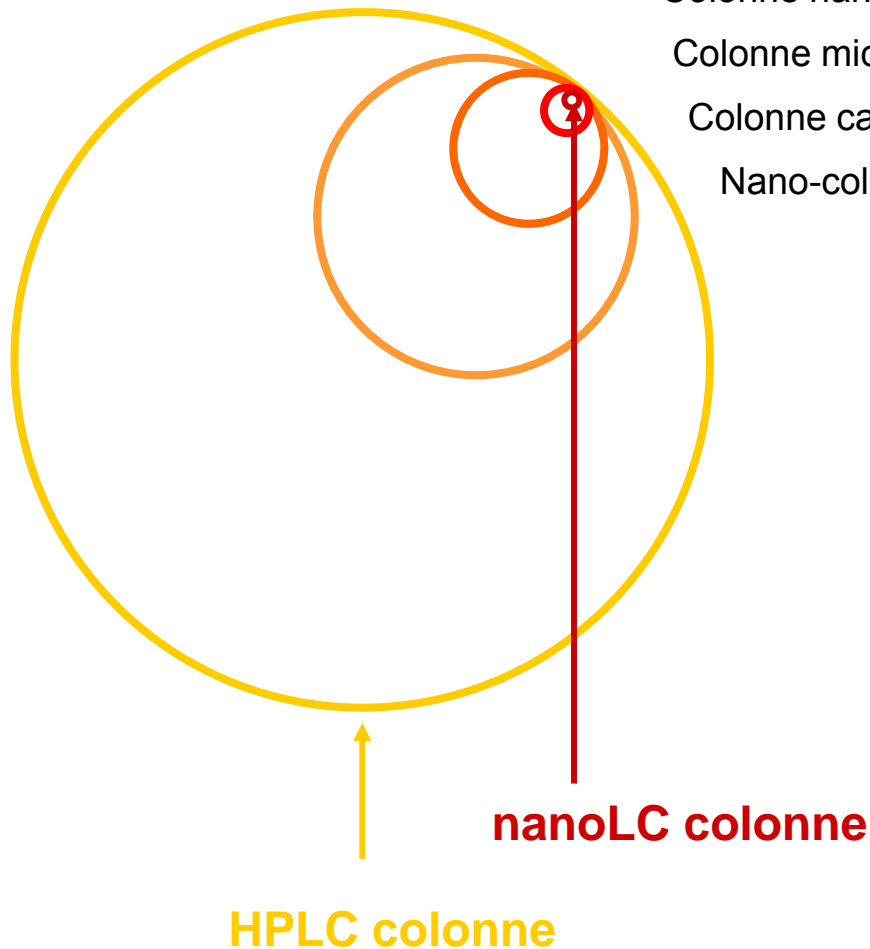
- Rapidité, haut débit
  - Réduction des temps d'analyse
- Faible coût
  - Diminution de la consommation des solvants et des échantillons, des rejets
- Analyses de terrain, « in situ »
  - Réduction de l'encombrement ➤ Systèmes intégrés

## Caractéristiques des échantillons:

- Petits échantillons
  - Diminution de la consommation des échantillons
- Mélanges complexes
  - Méthodes résolutives
- Concentrations de plus en plus faibles
  - Couplage à des détecteurs performants

# La colonne en HPLC: diminution du diamètre

Description	Dimensions	Débit typique
Colonne HPLC	$4 \text{ mm} \leq \text{i.d.} \leq 5 \text{ mm}$	1 – 5 mL/min
Colonne narrow-bore	$2 \text{ mm} \leq \text{i.d.} \leq 4 \text{ mm}$	0,3 – 3 mL/min
Colonne micro-bore	$1 \text{ mm} \leq \text{i.d.} \leq 2 \text{ mm}$	50 – 1000 $\mu\text{L}/\text{min}$
Colonne capillaire	$100 \mu\text{m} \leq \text{i.d.} \leq 1 \text{ mm}$	0,4 – 200 $\mu\text{L}/\text{min}$
Nano-colonne	$25 \mu\text{m} \leq \text{i.d.} \leq 100\mu\text{m}$	25 – 4000 nL/min



## Réduction des consommations

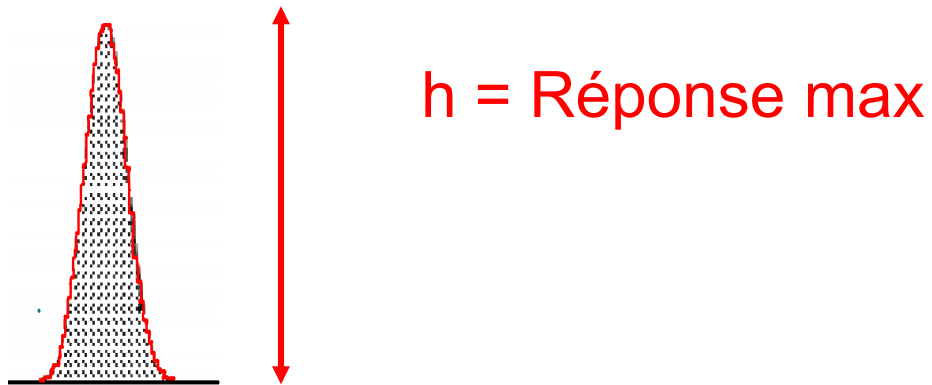
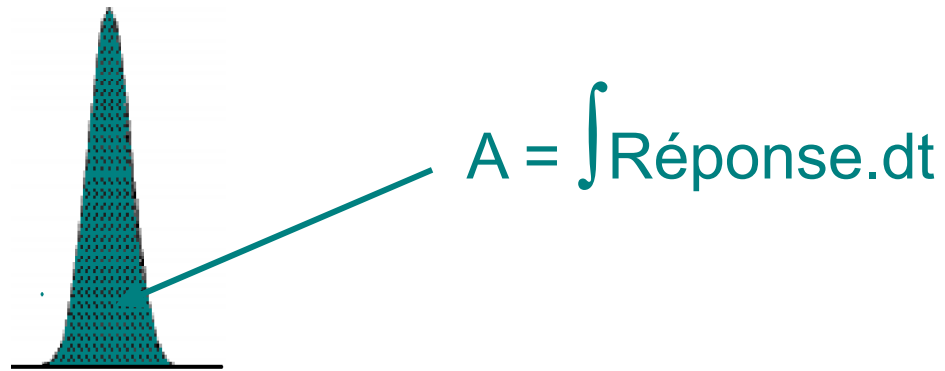
---

Diamètre interne (mm)	Section (mm <sup>2</sup> )	Débit (μL/min)	Consommation de solvants
4,6	16,6	1200	100%
2	3,1	225	19%
1	0,8	56	5%
0,5	0,2	15	1,2%
0,25	0,05	3,5	0,3%

# Notion de sensibilité

---

Détecteurs de concentration : Réponse = Aire du pic



## Amélioration de la sensibilité

---


Diamètre interne (mm)	Section (mm <sup>2</sup> )	Débit (μL/min)	Gain en sensibilité *
4,6	16,6	1200	1
2	3,1	225	5,3
1	0,8	56	21
0,5	0,2	15	80
0,25	0,05	3,5	335

\* pour des trajets optiques identiques



## Diminution de la longueur

---


$$N = \frac{L}{H}$$

Il faut disposer de colonnes plus efficaces

# Aspect théorique

## Grandeurs physiques : la théorie des plateaux

- La théorie des plateaux est sans doute la meilleur théorie permettant d'expliquer les phénomènes de séparation chromatographique.
  - ✓ Pics gaussiens
  - ✓ Calcul du nombre de plateaux
  
- Limitations :
  - ✓ Absence de considération des phénomènes de diffusion
  - ✓ Impossibilité d'introduire tout l'échantillon dans un volume infiniment petit
  - ✓ Absence de considération cinétique (vitesse d'échanges entre les deux phase)
  - ✓ Causes d'élargissement des pics

# Aspect théorique

## Grandeurs physiques : la théorie cinétique

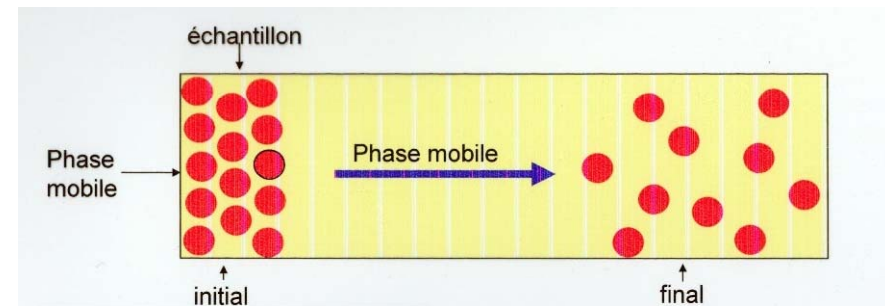
- La théorie cinétique considère le pic chromatographique comme représentatif de la distribution statistique des temps de rétention des molécules d'une substance donnée sur la colonne.
  
- La théorie cinétique considère les **phénomènes de diffusion** et de **transfert de masse**

# Aspect théorique

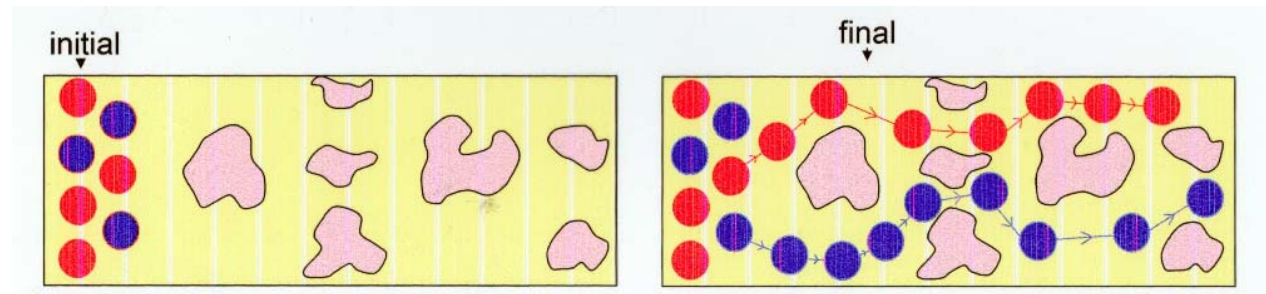
## Grandeurs physiques : la théorie cinétique

### Phénomènes de diffusion :

Diffusion moléculaire longitudinale



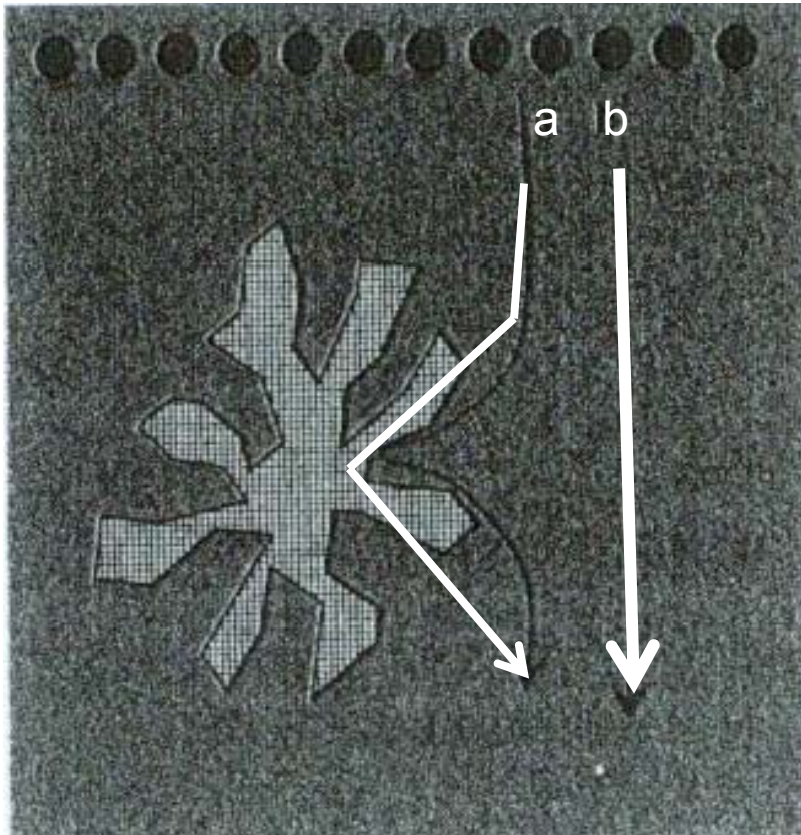
Diffusion turbulente  
Remplissage



# Aspect théorique

## Grandeurs physiques : la théorie cinétique

### Transfert de masse



✓  $t_0$ , les molécules a et b d'une même substance sont sur la même ligne

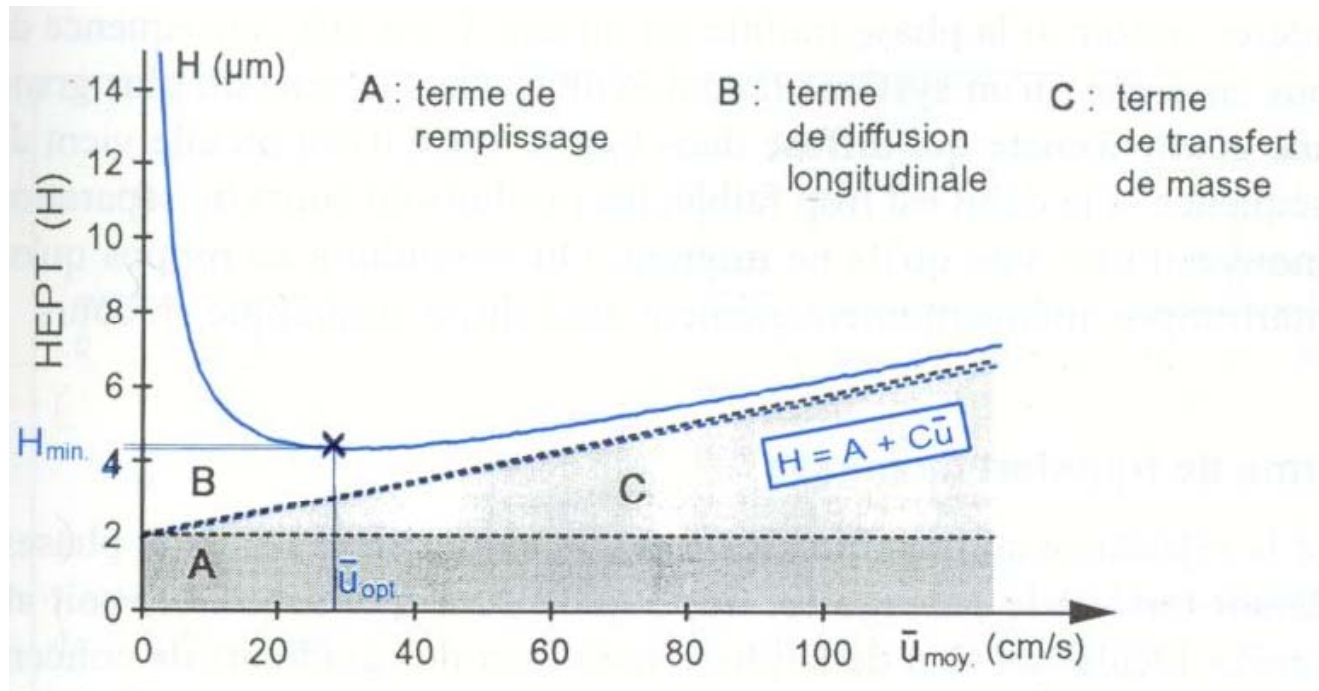
✓  $t_i$ , a va rester dans le pore du grain de la phase stationnaire et b dans la phase mobile

✓  $t_f$ , b ira plus vite que la molécule a

# Aspect théorique

## Grandeurs physiques : la théorie cinétique

### Application à la CPG



Equation de Van Deemter

$$H = A + B/\bar{u} + C.\bar{u}$$

$\bar{u}$  = vitesse linéaire moyenne d'écoulement de la phase mobile dans la colonne

# Aspect théorique

## Grandeurs physiques : la théorie cinétique

### Les solutions pour minimiser des phénomènes de diffusion :

- **Améliorer l'homogénéité de la phase:**
  - ✓ **Absence d'hétérogénéités**
  - ✓ **Absence de bulle**
  - ✓ **Absence de vide**
  
- **Réduire le diamètre des particules  $d_p$**
  
- **Homogénéiser le débit de la phase mobile**
  
- **Diminuer la taille des grains et des pores**

# Aspect théorique

## Grandeurs physiques : la théorie cinétique

### En résumé :

- **Prendre des particules**
  - ✓ De petites tailles
  - ✓ De faible porosité
  
- **Réaliser des chromatographies**
  - ✓ Rapides
  - ✓ Avec des phases stationnaires miniaturisées
  
- **Travailler**
  - ✓ A faible température
  - ✓ En réduisant les volumes morts



# Efficacité de la séparation



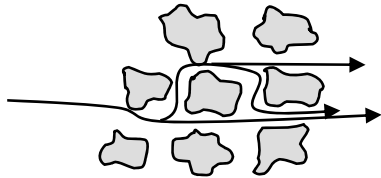
Elargissement de bande selon le modèle de Van Deemter

s'exprime en termes de *hauteur équivalente à un plateau théorique (H)* :

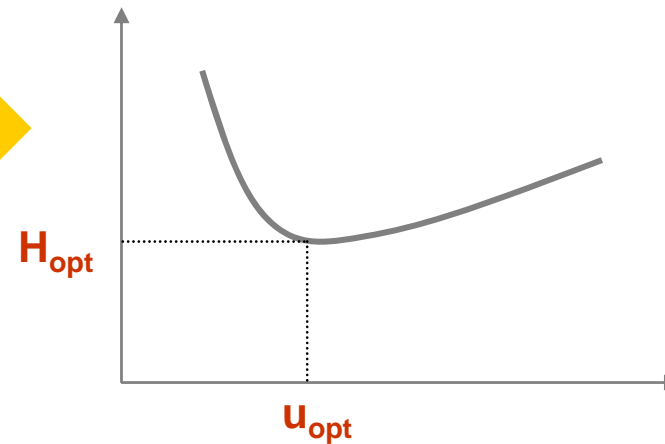
$$H = A + B/u + C.u$$



Chemins préférentiels (A):



$$A = 2 \lambda d_p$$



Diffusion moléculaire (B) :

fonction à la fois du soluté et de la phase mobile

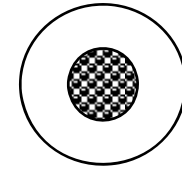
$$B = 2 \gamma D_m$$

Transfert de masse (C) :

influencé par le coefficient de partage et donc la solubilité relative du soluté dans la phase stationnaire

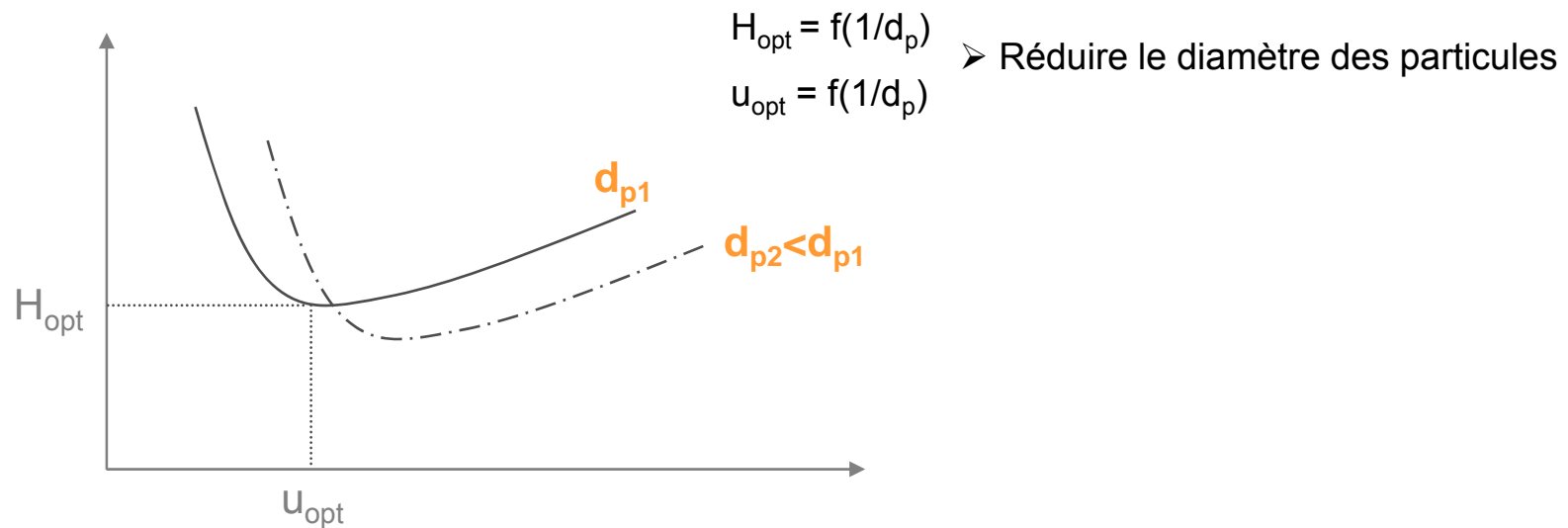
$$C = \frac{8}{\pi^2} \frac{k'}{(1+k')^2} \frac{e^2}{D_s}$$

Phase stationnaire liquide  
e : épaisseur film  
 $D_s$  : coefficient de diffusion dans la phase stationnaire



## Phases particulières : AMELIORER N/t

### Courbes de Van Deemter



Limitation : Augmentation de la pression en tête de colonne

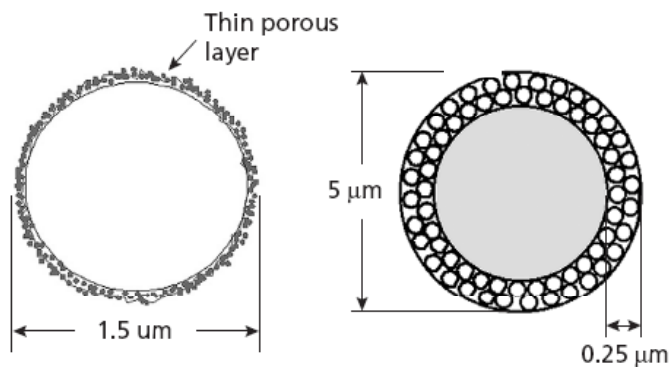
**Loi de Darcy** :  $\Delta P = \eta L u / k_0 d_p^2$

Diamètre des particules limité à 1,5 - 3  $\mu\text{m}$

perméabilité

## Particules non-poreuses ou à couche superficielle poreuse

Amélioration du transfert de masse



**Colonne : Poroshell 300SB-C18** 75 mm x 2.1mm i.d.

Phase mobile: (A) 0.1%TFA, (B) 0.07%TFA dans ACN

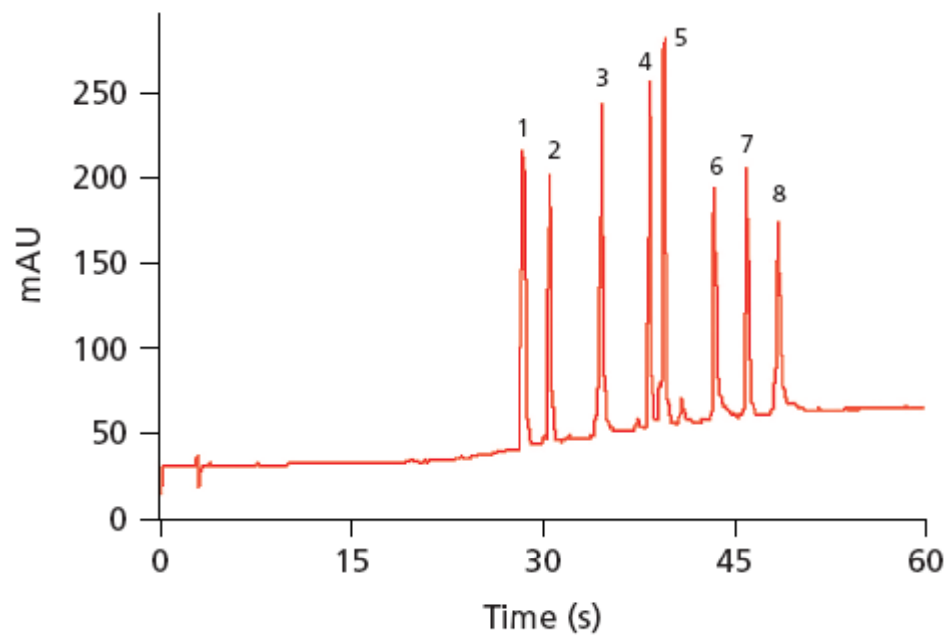
Gradient: 5-100%B en 1 min

**Débit: 3mL/min - P=260bar**

T=70°C

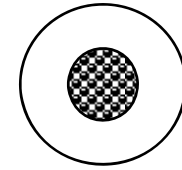
UV à 215nm

**Peaks:** 1 = angiotensin II, 2 = neurotensin, 3 = RNase,  
4 = insulin, 5 = lysozyme, 6 = myoglobin,  
7 = carbonic anhydrase, 8 = ovalbumin



# Conception des colonnes remplies

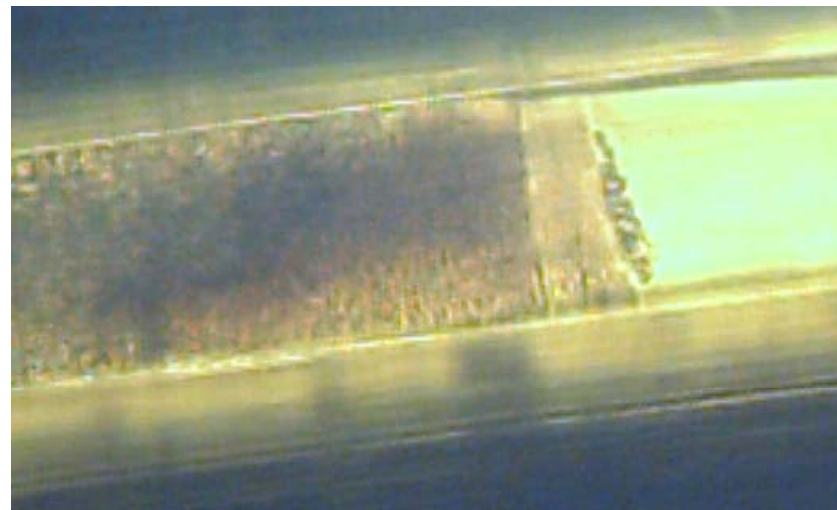
---

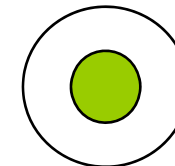


Nombreuses phases stationnaires disponibles commercialement

- mais** remplissage difficile
- fragilité des colonnes
- conception de micro-systèmes séparatifs peu réaliste

Vue au MET d'un capillaire de 75 $\mu$ m i.d. rempli de particules de 5 $\mu$ m





# Les monolithes

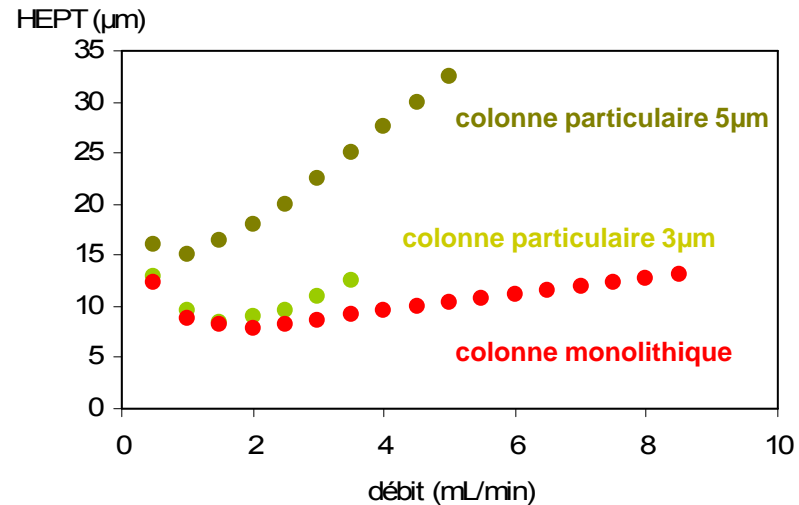
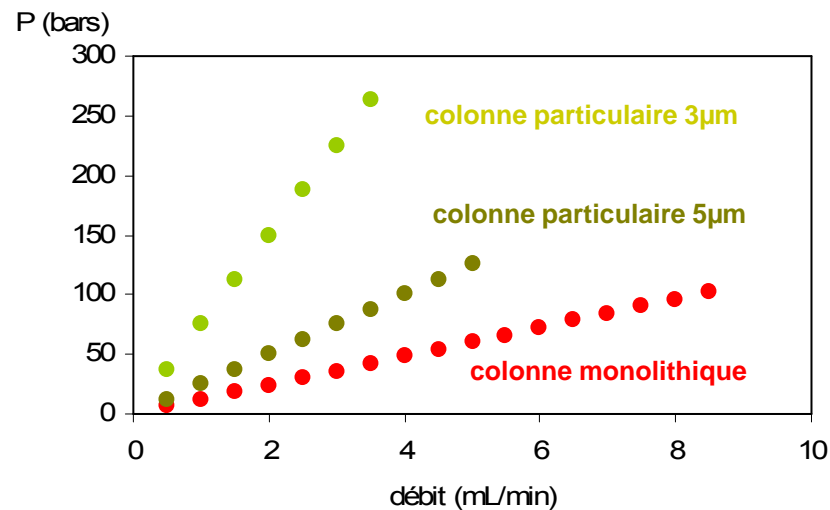
de type inorganique  
de type organique

Structure continue contenant des pores interconnectés

Structure bimodale : réseau de **macropores** et réseau de **mésopores**

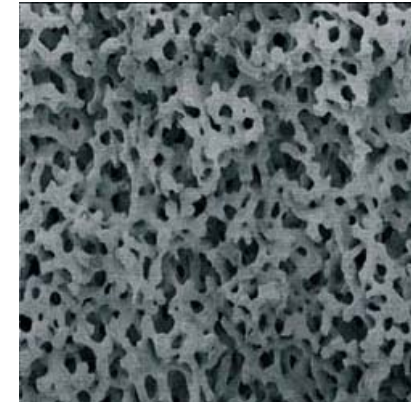
Grande perméabilité  
Transfert de masse amélioré

**Séparation plus rapides**



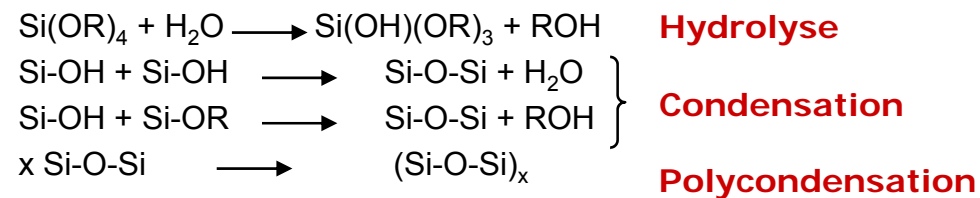
# Préparation des monolithes inorganiques

Tétraméthoxysilane (TMOS)  
+ Acide acétique (catalyseur)  
+ PEG : porogène



Structure du monolithe

génération des mésopores



élimination du PEG,  
renforcement du squelette

# Caractéristiques du réseau poreux

---

Distribution bimodale des pores

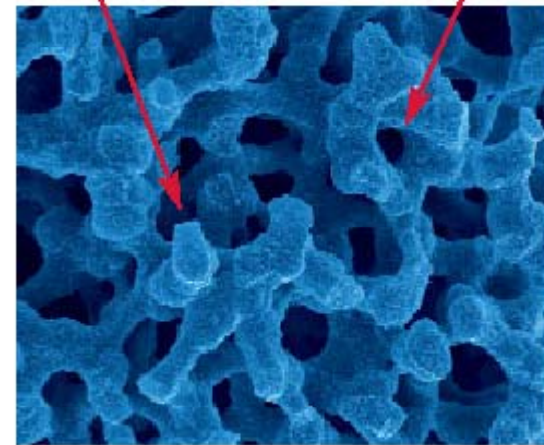
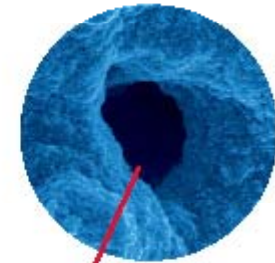
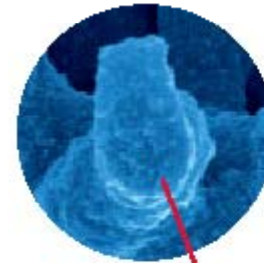
Contrôle indépendant des 2 tailles de pores

**Macroporosité : générée par le PEG**

**Mésoporosité : générée par le traitement à  $\text{NH}_4\text{OH}$   
(ou à l'urée)**

*Mesopores: 13 nm*

*Macropores: 2  $\mu\text{m}$*



*Total porosity > 80%*

# Influence des constituants du mélange

---

## Contrôle indépendant des 2 tailles de pores

### Macroporosité : générée par le PEG

[PEG] : ↗ diminution de la taille du squelette

diminution de la taille des macropores

[TMOS] : ↗ diminution de la taille des macropores

T°gélation : ↗ diminution de la taille des macropores

### Mésoporosité : générée par le traitement à $\text{NH}_4\text{OH}$

Temps de traitement à  $\text{NH}_4\text{OH}$  : ↗ augmentation de la taille des mésopores



## Intérêt des monolithes organiques

---

- ✓ Synthèse simple
- ✓ Synthèse facilement adaptable aux microdispositifs de séparation
- ✓ Stabilité en pH : 1 -13

# Préparation des monolithes organiques

---

✓ à base d'acrylamide

***Synthèse en milieu aqueux*** : solubilité faible des monomères «hydrophobes » dans l'eau, difficulté de contrôle de la taille des pores

***Synthèse en milieu organique***

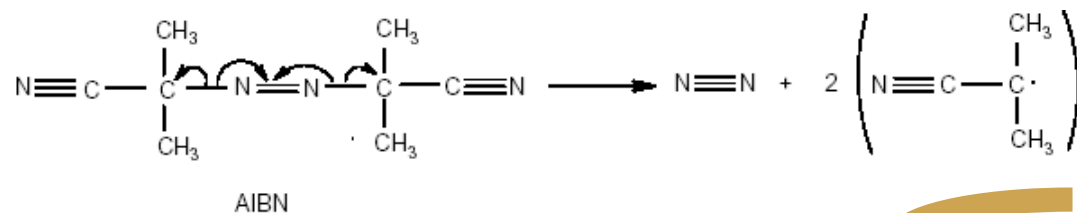
✓ à base d'ester méthacrylique

**Nombreux travaux sur ces monolithes**

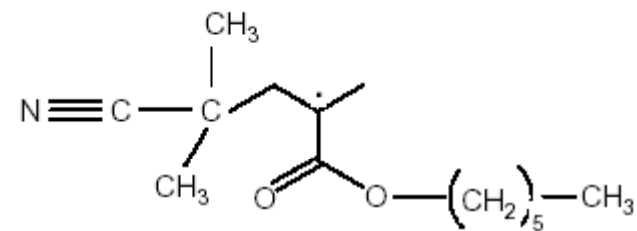
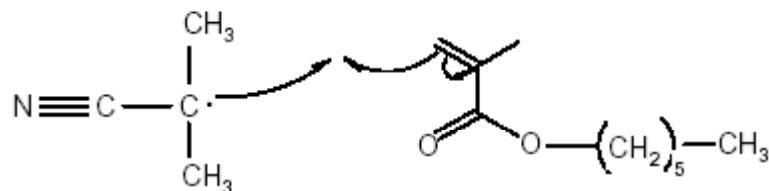
**Synthèse simple**

✓ à base de polystyrène (LC packing, Dionex)

# Préparation des monolithes organiques



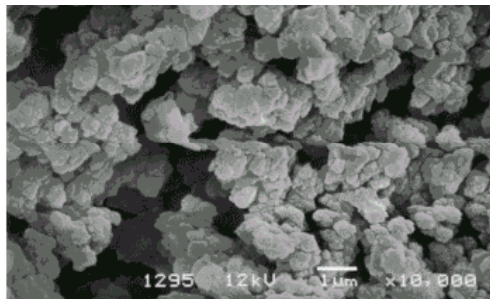
Début de polymérisation



Réticulation des clusters : réseau continu

Réticulation des nuclei: formation de clusters

Taille critique : formation de « nuclei »

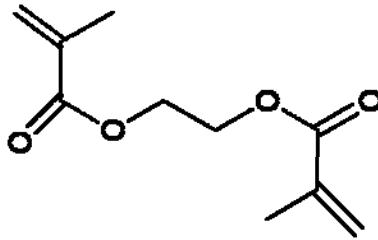


# Préparation des monolithes organiques

---

► Monomères

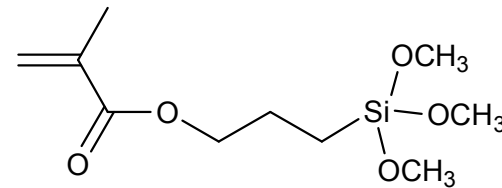
Agent réticulant :



**éthylènediméthacrylate**

► Porogène: mélange de solvant

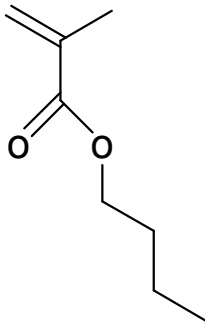
Promoteur d'adhésion (éventuellement):



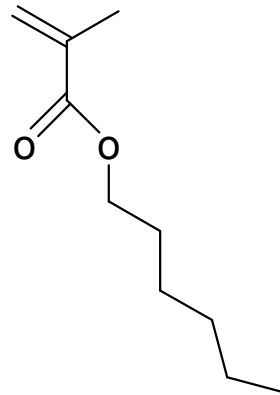
**3-(triméthoxysilyl)propyl-méthacrylate**

► Initiateur:AIBN

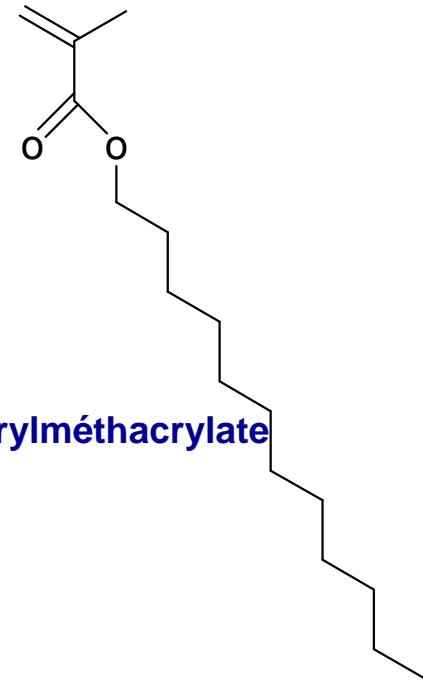
# Monomères



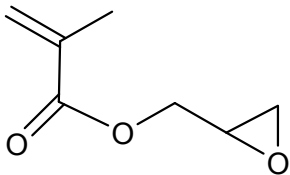
**butylméthacrylate**



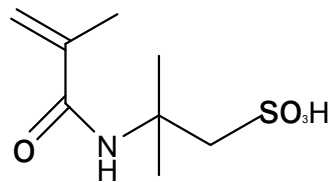
**hexylméthacrylate**



**laurylméthacrylate**



**glycidylméthacrylate**



**AMPS**

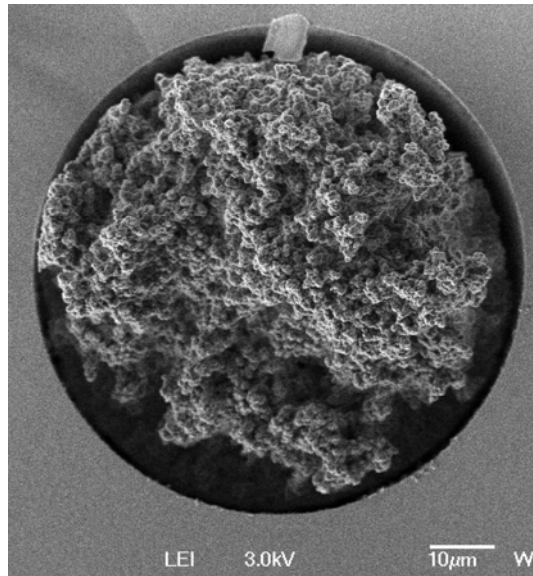
# Choix du solvant



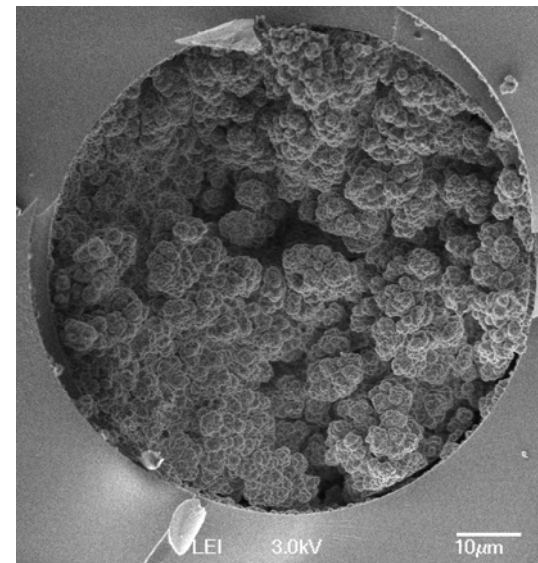
Eau + 1-propanol + 1,4-butanediol

Critères empiriques :

Si bon solvant du polymère final, la taille des pores est déplacée vers les petites tailles



**10/70/20**



**10/50/40**

# Initiation

---

Par **chauffage** : T=55-70°C, t~20h

Facile à réaliser

Lent

Possibilités de fissures

Zone de polymérisation difficile à délimiter



**Micro-colonnes**

Par **irradiation UV**,  $\lambda=365\text{nm}$ , t<1h

Rapide

Zone de polymérisation facile à délimiter

Faible profondeur de pénétration

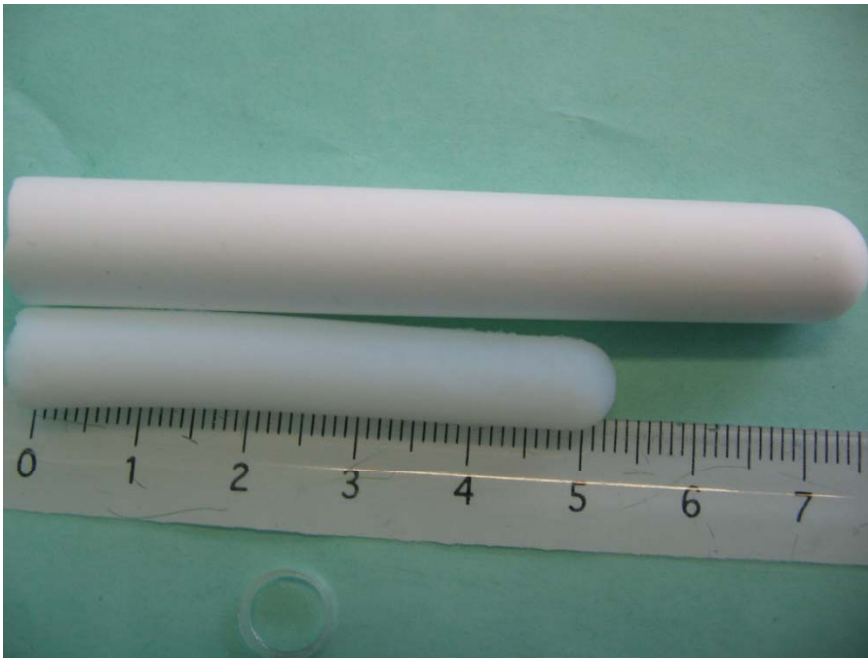
Mise en œuvre plus complexe



**Micro-dispositifs**

## Aspect physique d'un monolithe de silice

---



Monolithes réalisés à partir d'un moule:  
 $L=10\text{cm}$ ,  $d=1\text{cm}$

Travail de Thèse J. Chamieh



## Efficacité des monolithes

---

Influence du diamètre de pores (de manière analogue à  $d_p$  en phase particulaire)

HPLC: Monolithes de silice ( $u=1\text{mm/s}$ )

Macropore ( $\mu\text{m}$ )	H ( $\mu\text{m}$ )	Perméabilité ( $\times 10^{-14}/\text{m}^2$ )
8.0	12.5	130
4.5	11.9	56
2.8	10.5	25
2.0	9.3	19

# Recherche sur les supports: Monolithes de silice

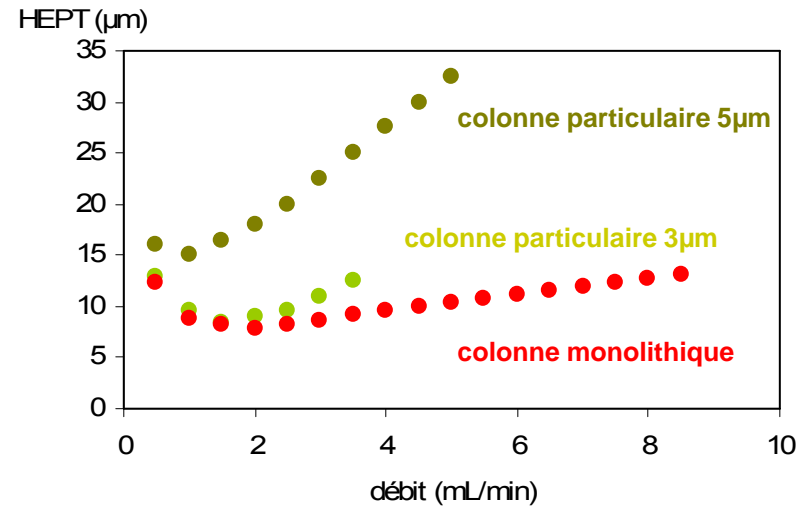
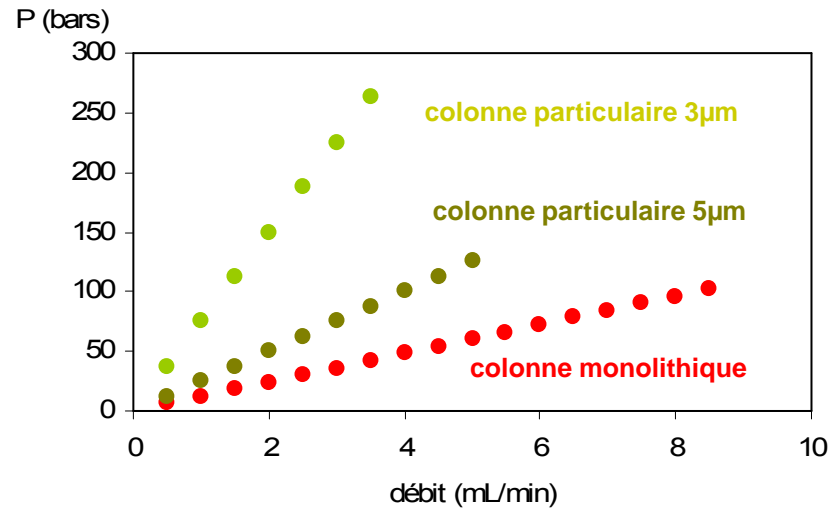
Structure continue contenant des pores interconnectés

Structure bimodale : réseau de **macropores** et réseau de **mésopores**

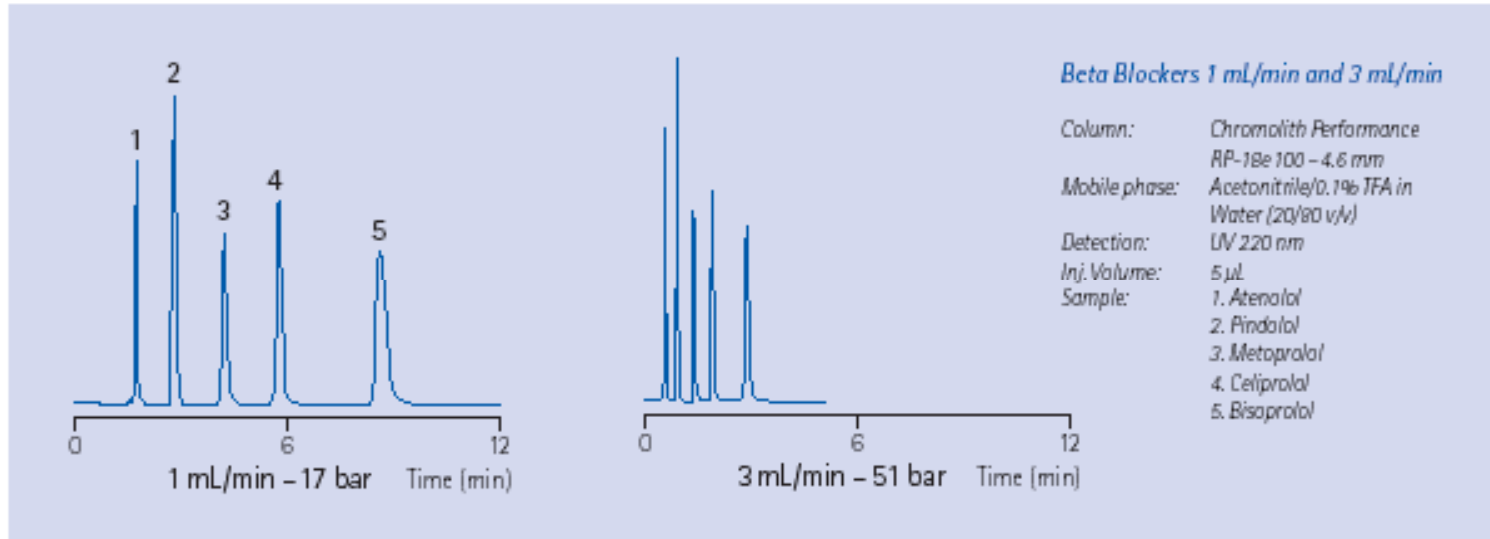
Grande perméabilité

Transfert de masse amélioré

**Séparation plus rapides**



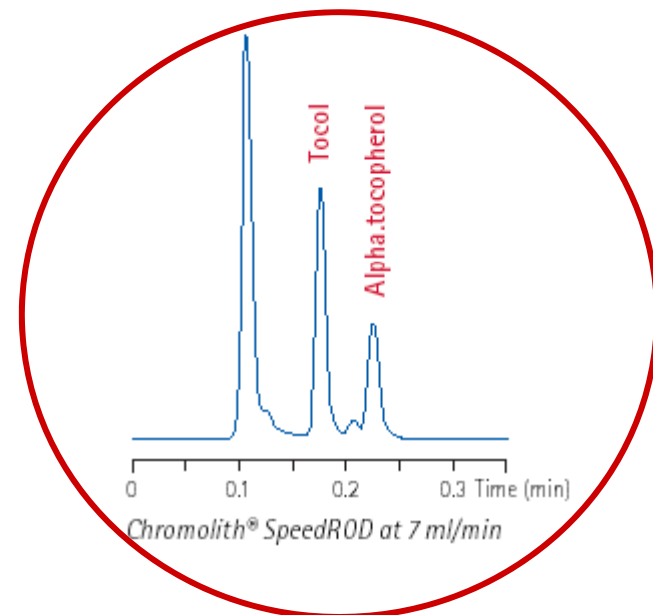
# Colonnes de 4,6 mm i.d.



Column: Chromolith® SpeedRod RP-18  
 encapped  
 Mobile phase: Water: Methanol (2:98, v/v)  
 Detection: Fluorescence detection  
 Ex: 295, Em: 330

Injection volume: 1 µL  
 Column temp: 40 °C  
 Sample: plasma precipitated with  
 3 volumes of 2-propanol

7mL/min ➤ 91bars

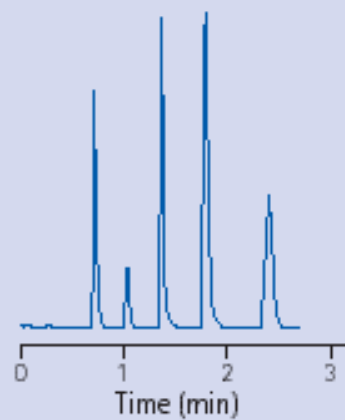


## Colonnes de 100 µm i.d.



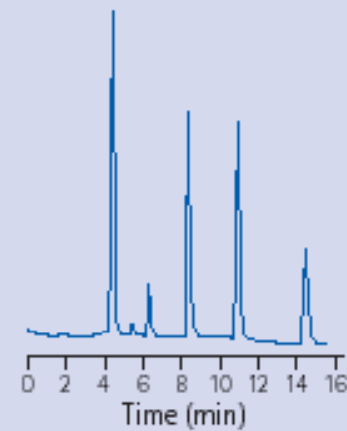
CapROD™  
column

### Separation of low molecular weight analytes



3 µL/min, 130 bar

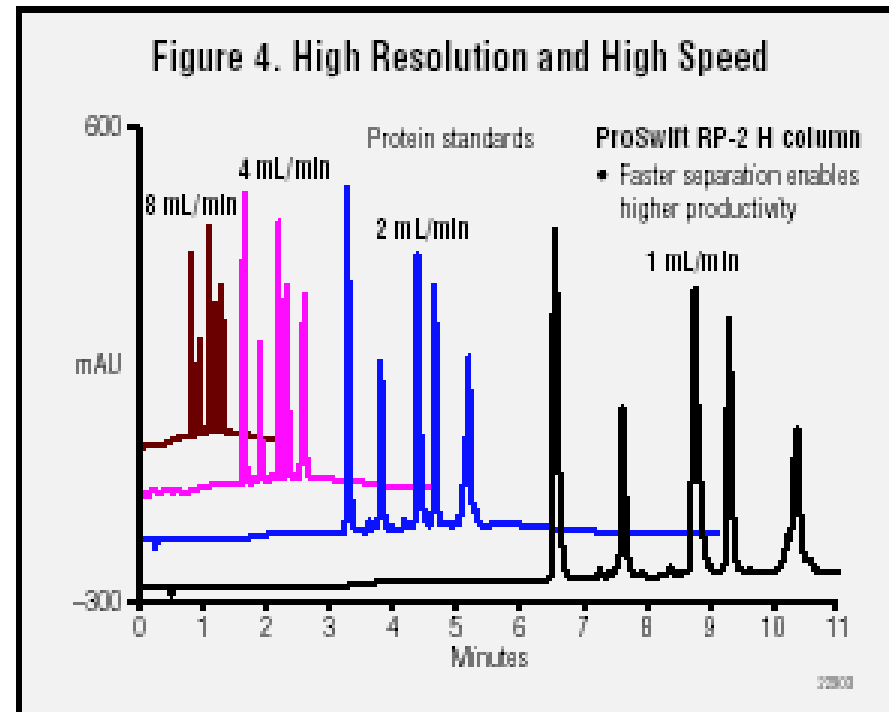
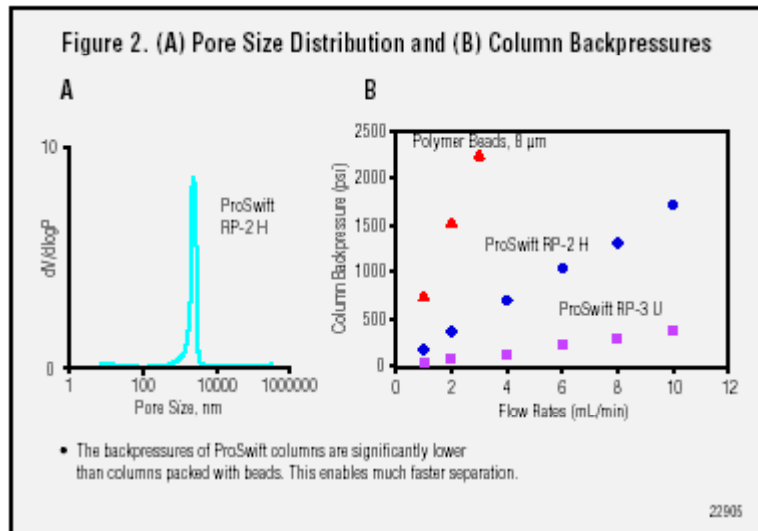
Column: Chromolith® CapRod™  
RP-18 endcapped,  
150 mm x 100 µm  
Eluent: ACN/H<sub>2</sub>O = 50/50 (v/v)  
Inj. Vol.: 0.05 µL  
Temp.: R. T.  
Detection: UV 210 nm



0.5 µL/min, 21 bar

Sample:  
1. Thiouracil  
2. Acetophenone  
3. Benzene  
4. Toluene  
5. Naphthalene

# Séparation de protéines-standards



## Intérêt de travailler à faible débit

---

Lorsque la concentration d'échantillon est très faible

- ✓ besoin de miniaturiser
- ✓ dans colonnes classique, problème de pression

## Le problème des faibles débits

---

### Contraintes technologiques:

- Le pompage proprement dit
- La capacité à générer des gradients
- La mesure et le contrôle
- La détection des fuites,...

### Les options:

Le système de pompage « classique »  
avec split »

La pressurisation des compartiments avec  
contrôle rétroactif du débit

Le pompage électrocinétique

---

# Electrophorèse capillaire :

## notions fondamentales

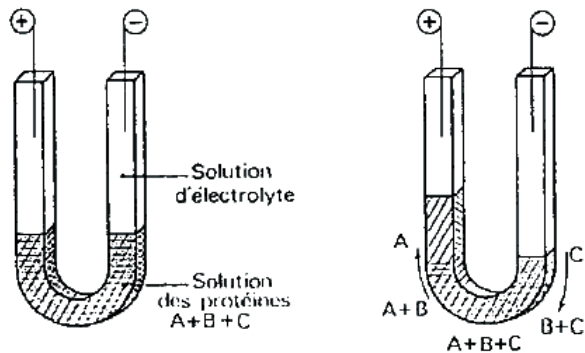
---

Contact : Yannis FRANCOIS, Lab. de Dynamique et Structure  
Moléculaire par Spectrométrie de Masse, institut de Chimie, 1  
rue Blaise Pascal, 67000 Strasbourg  
email: [yfrancois@unistra.fr](mailto:yfrancois@unistra.fr)



# UN PEU D'HISTOIRE ...

# 1937



**Séparation de protéines  
dans le sérum humain**



The Nobel Prize in  
Chemistry  
1948



**Arne Wilhelm Kaurin Tiselius**

"for his research on electrophoresis and adsorption analysis, especially for his discoveries concerning the complex nature of the serum proteins"

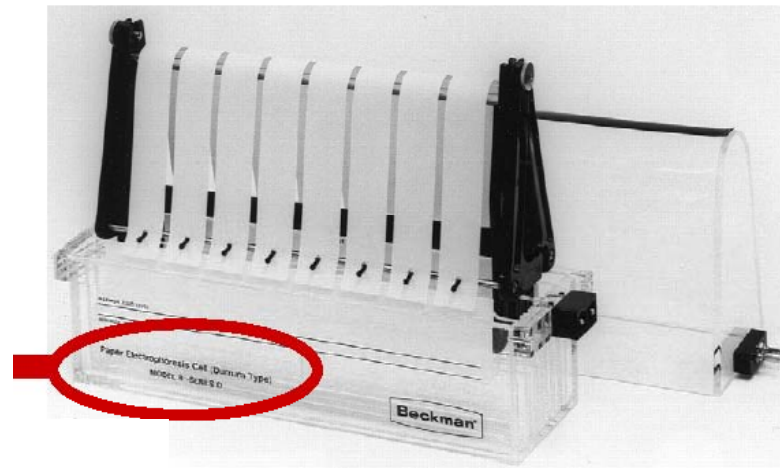
## ... ET LA SUITE

---

1939

Séparation de protéines  
par électrophorèse sur papier

1954



1967

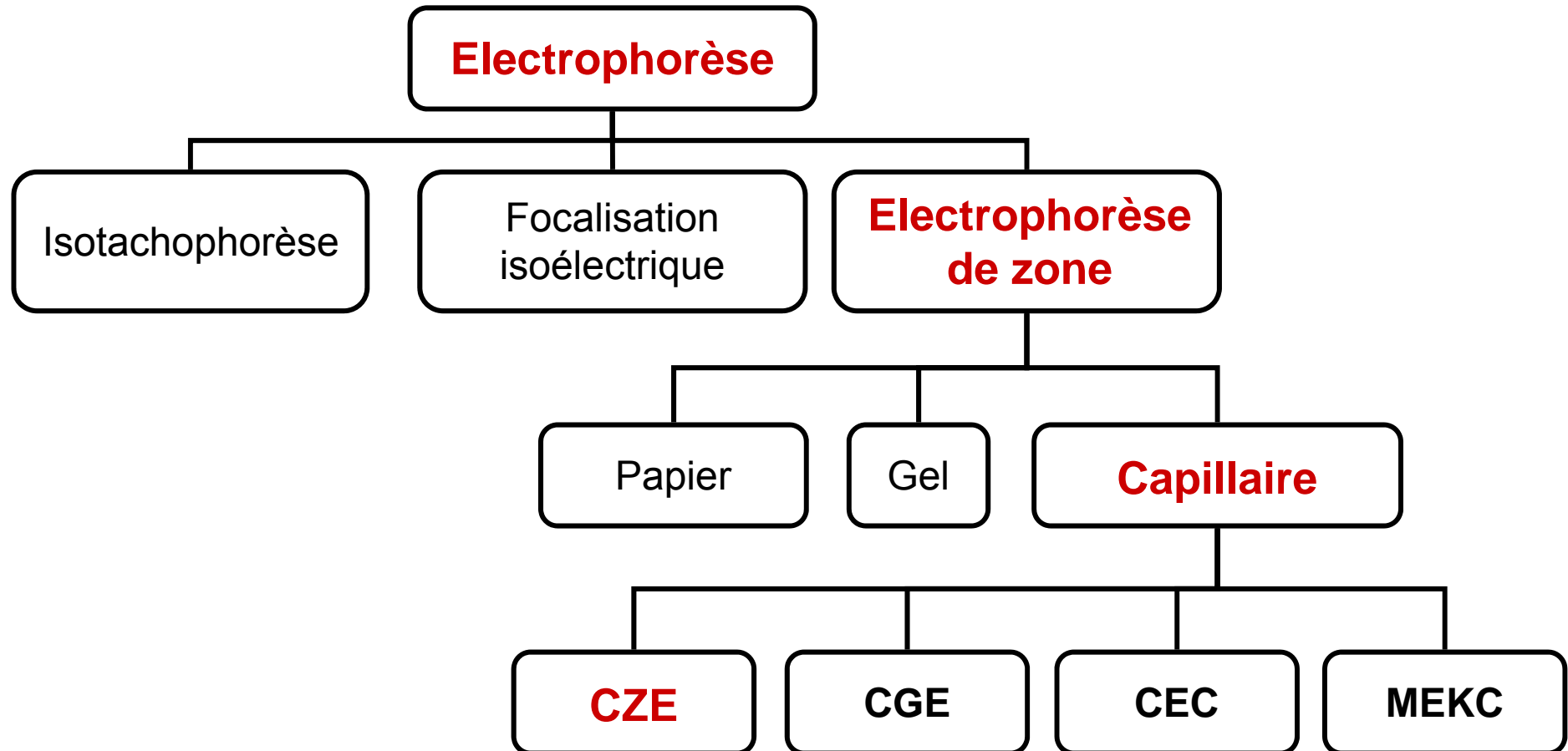
S. Hjerten : capillaires de 300  $\mu\text{m}$  i.d.

1981

J. Jorgenson : capillaires de 75  $\mu\text{m}$  i.d.

# Une grande famille

---



# Plan du cours

---

## 1. La migration en électrophorèse capillaire

1.1 Mobilité électrophorétique

1.2 Phénomène d'électroosmose

## 2. La séparation en électrophorèse capillaire

2.1 Efficacité

2.2 Résolution

## 3. L'amélioration de la sélectivité

## 4. L'analyse quantitative

4.1 Injection

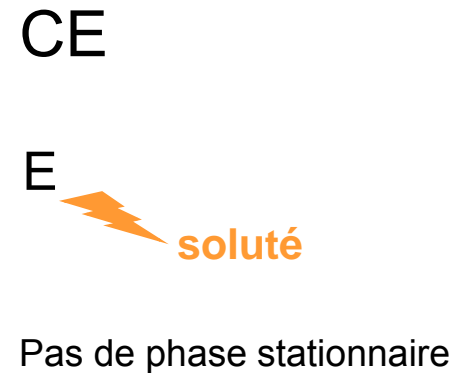
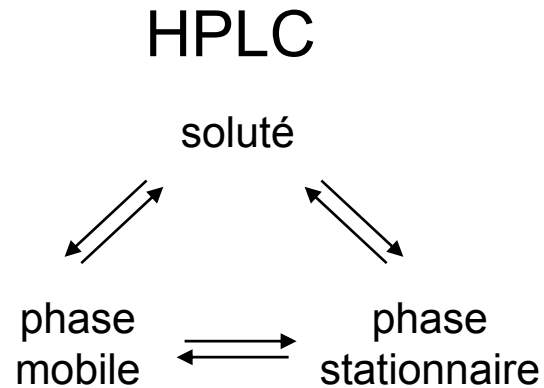
4.2 Détection

4.3 Mesure des surfaces de pics

## 5. La Focalisation isoélectrique (CIEF)

# Une technique séparative

---



😊 instrumentation : pas de pompe, pas de vanne d'injection

➤ MINIATURISATION

faibles volumes d'échantillon, d'électrolyte

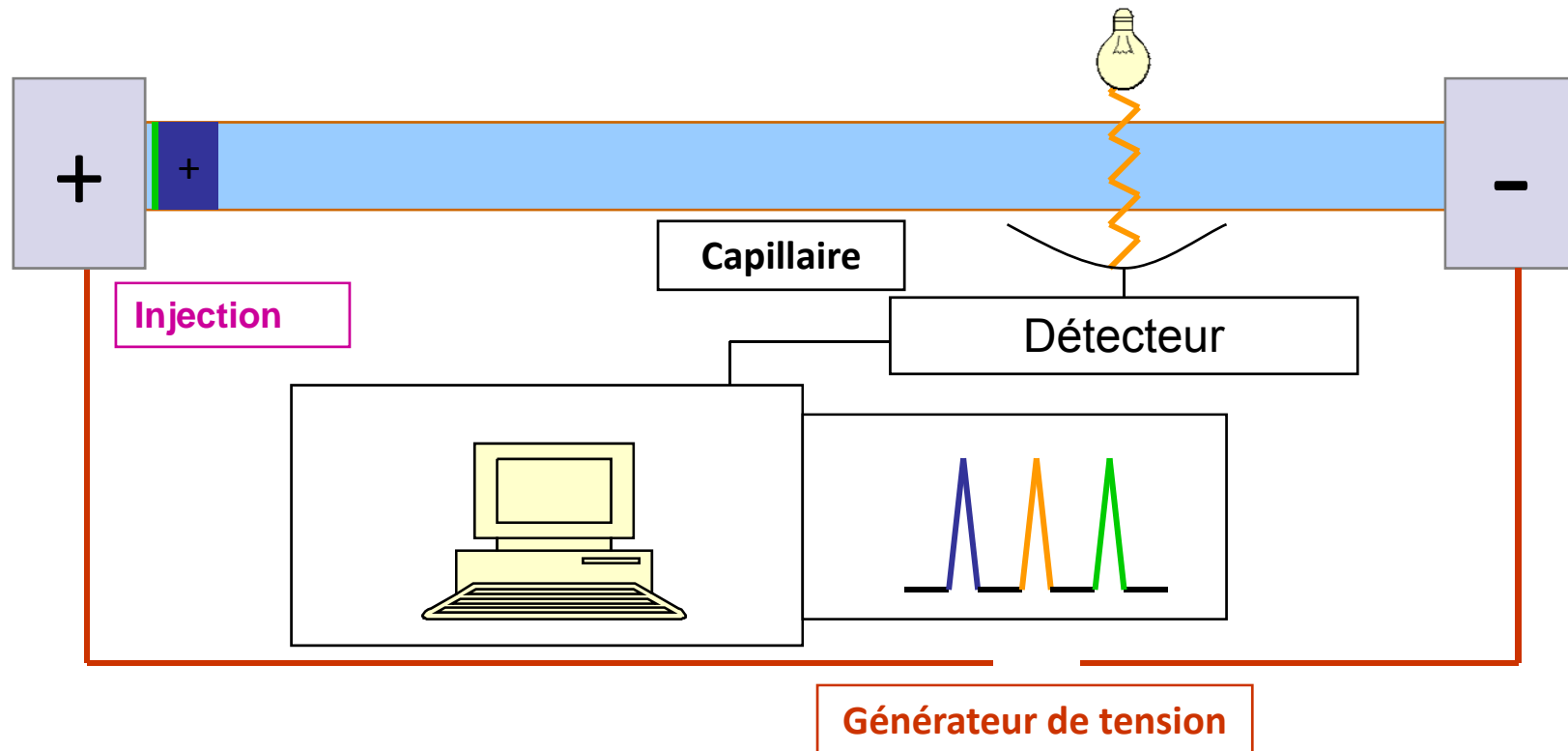
➤ COÛT

EFFICACITE de séparation élevée

😞 faible SENSIBILITE DE DETECTION

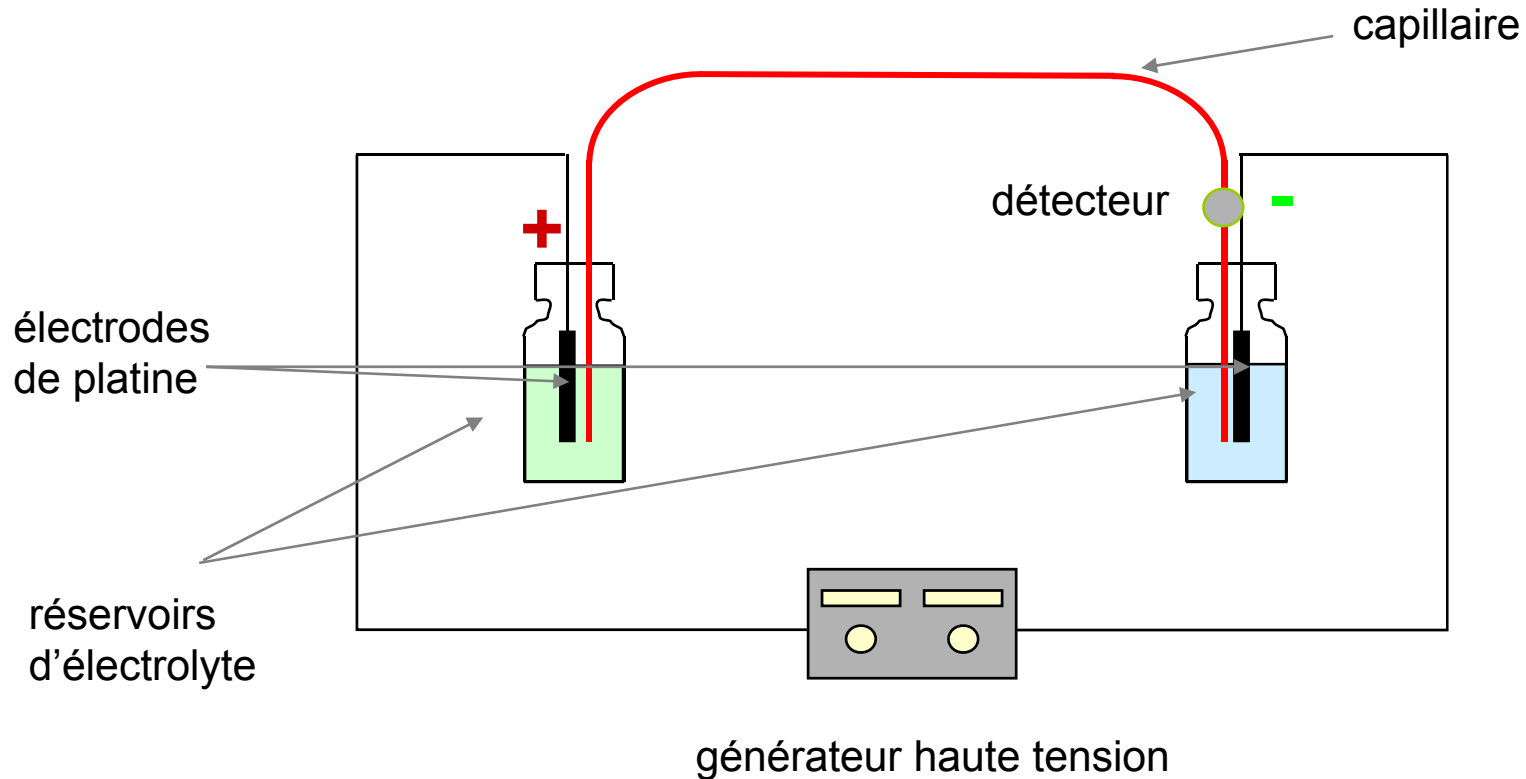
# Introduction électrophorèse capillaire

## Principe



# Dispositif expérimental

---



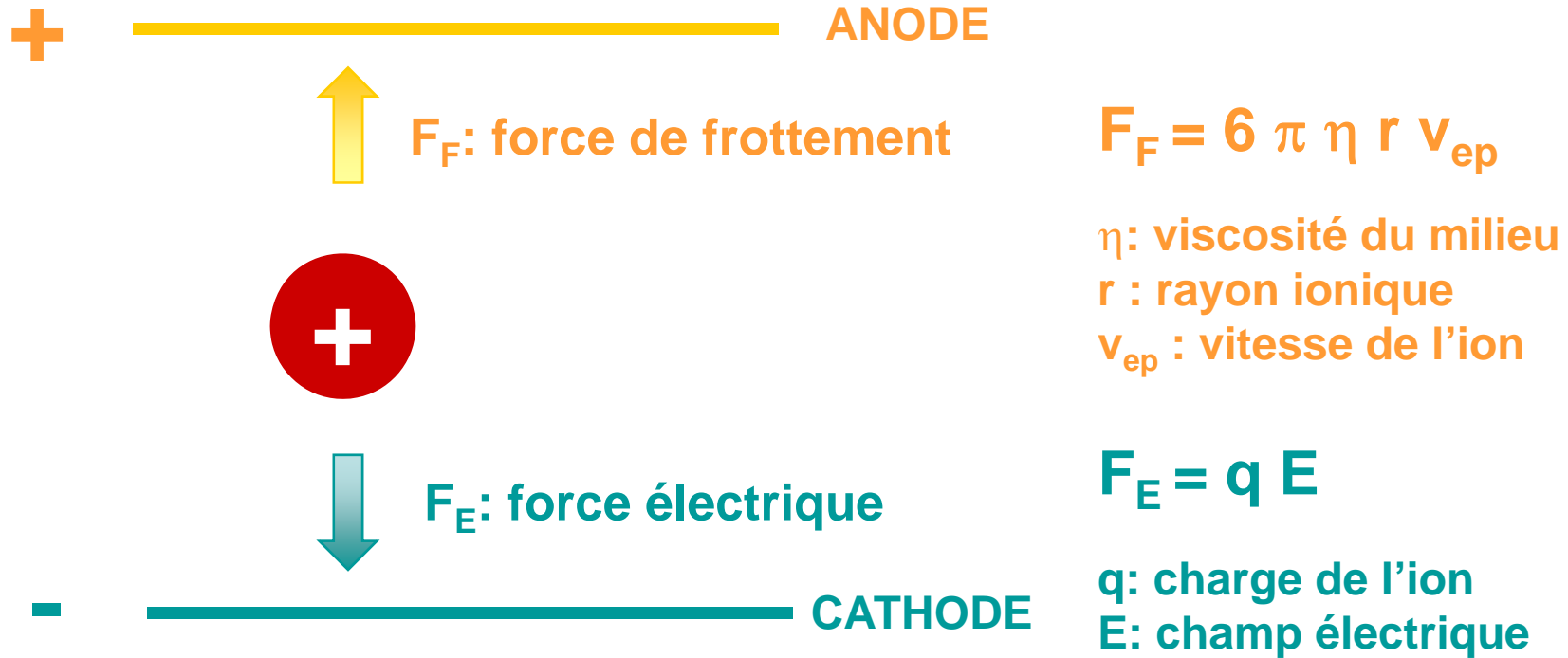
**Capillaires conventionnels : silice**

**longueur : 20 - 100 cm**

**diamètre interne : 20 - 100  $\mu\text{m}$**

**Différences de potentiel : 10 - 40 kV**

# Electrophorèse



$$v_{ep} = \frac{q E}{6 \pi \eta r}$$



$$\mu_{ep} = \frac{q}{6 \pi \eta r}$$



+



-

+



-

+



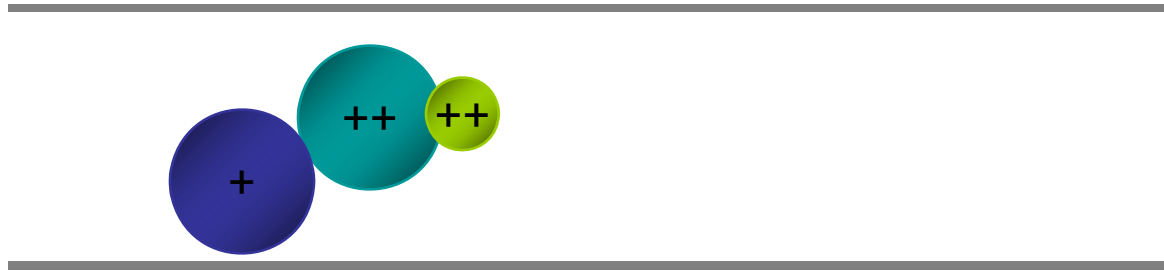
-

+



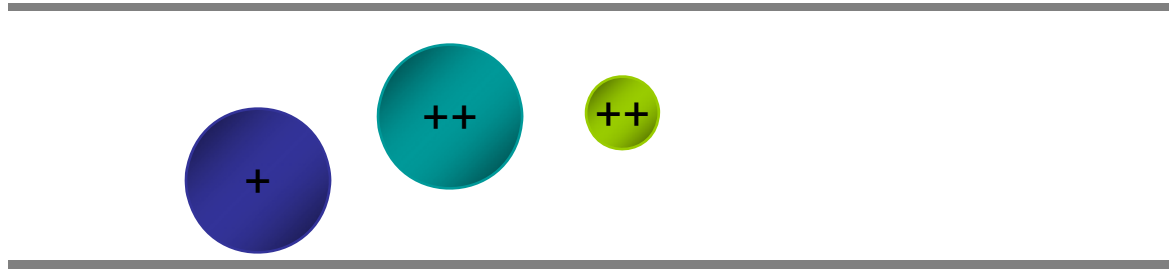
-

+

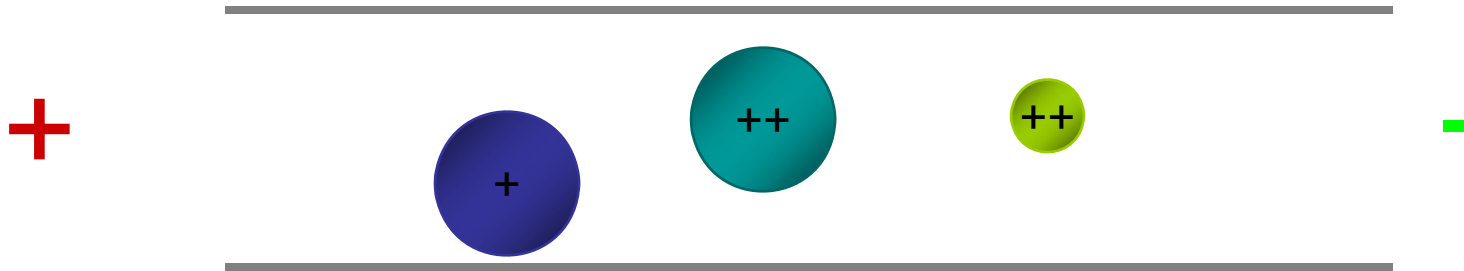


-

+



-



**L'ELECTROPHORESE peut donc séparer :**

- **des molécules portant des CHARGES DIFFERENTES,**
- **des molécules portant des CHARGES IDENTIQUES mais de TAILLES DIFFERENTES.**

# Plan du cours

---

## 1. La migration en électrophorèse capillaire

1.1 Mobilité électrophorétique

1.2 Phénomène d'électroosmose

## 2. La séparation en électrophorèse capillaire

2.1 Efficacité

2.2 Résolution

## 3. L'amélioration de la sélectivité

## 4. L'analyse quantitative

4.1 Injection

4.2 Détection

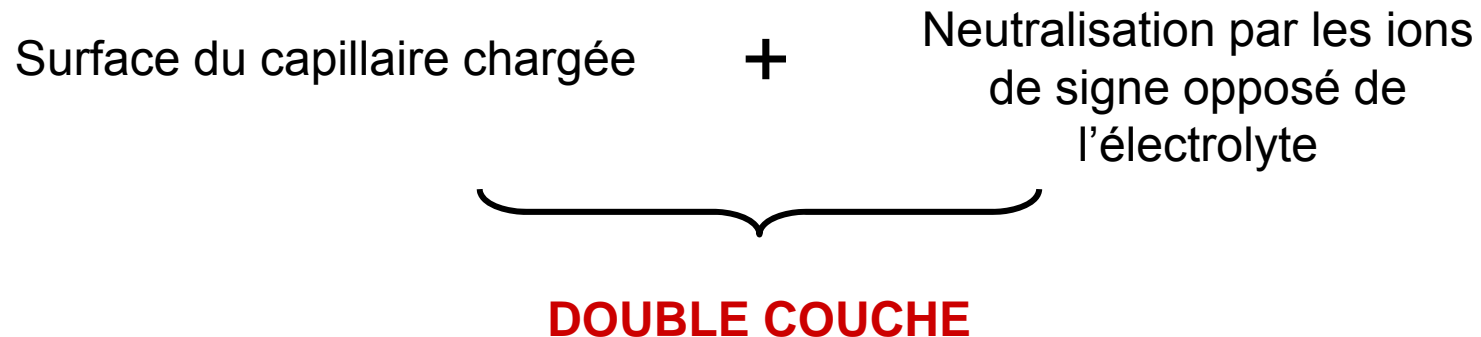
4.3 Mesure des surfaces de pics

## 5. La Focalisation isoélectrique (CIEF)



# Electroosmose

---

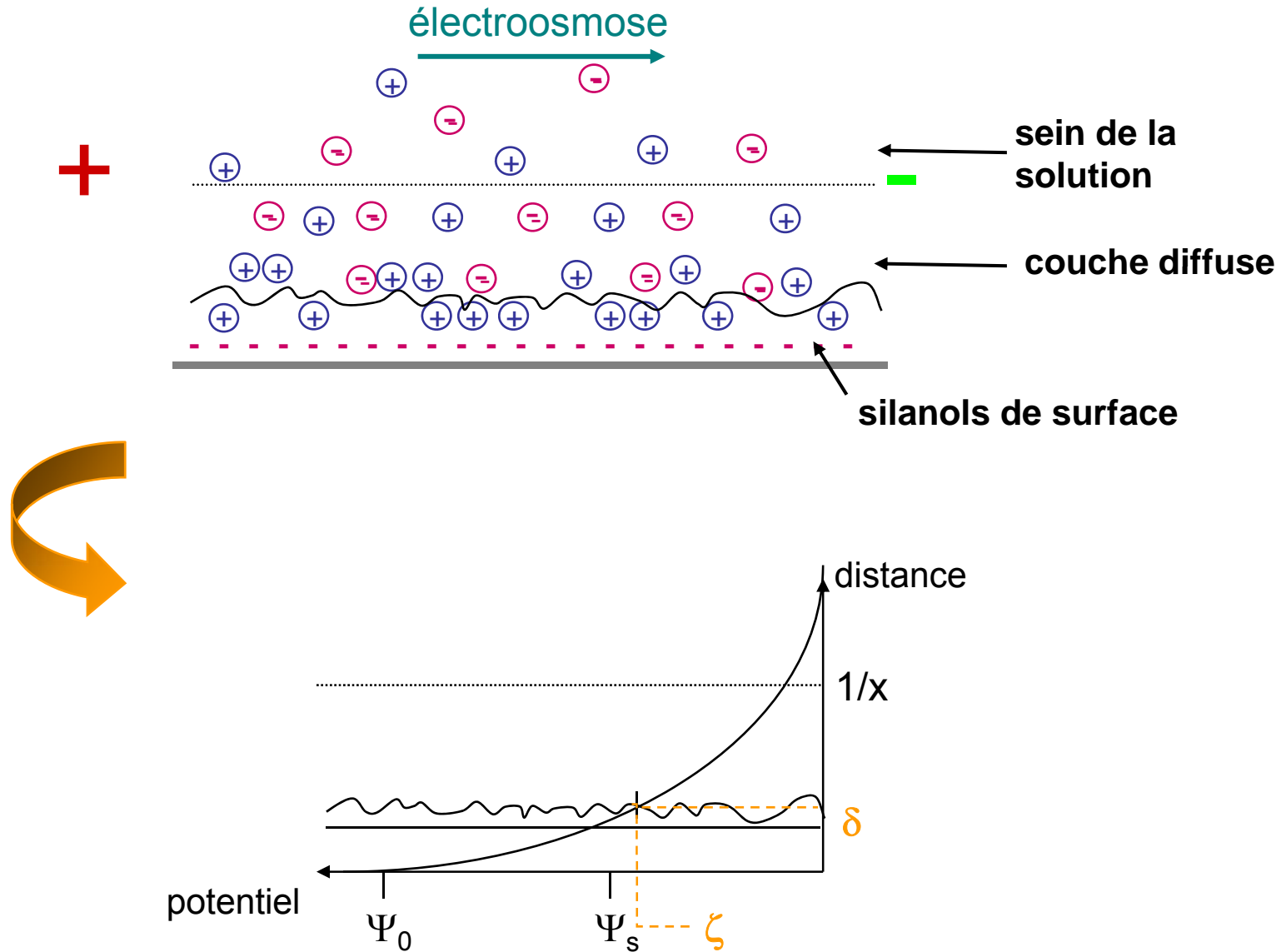


Origine du phénomène : orientation des molécules différente

- à l'interface solide/liquide : ions adsorbés à la surface
- au sein de la solution : ions distribués en fonction des charges électriques et de l'agitation thermique

- ▶ déplacement du solvant qui a lieu sous l'effet de l'application du champ électrique

# DOUBLE COUCHE : le modèle de STERN



# Flux électroosmotique

---

La chute de potentiel dans la double couche détermine la vitesse de déplacement du solvant :

$$V_{eo} = \frac{\varepsilon \zeta E}{4 \pi \eta}$$



$$\mu_{eo} = \frac{\varepsilon \zeta}{4 \pi \eta}$$

$\zeta$  : potentiel zéta

$\varepsilon$  : constante diélectrique du milieu

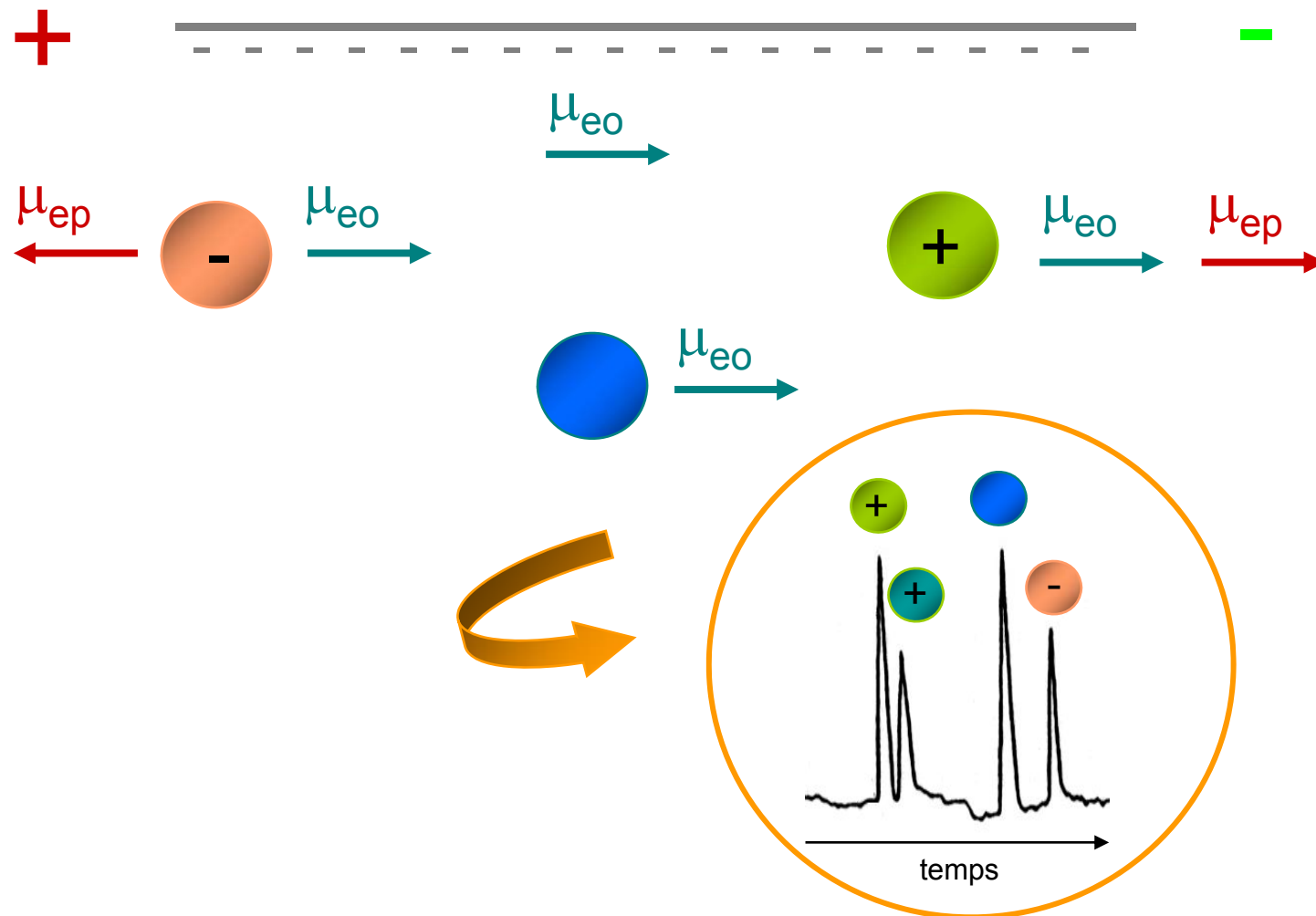
$\eta$  : viscosité de la solution

Ordre de grandeur : de 0,1 à 1 cm.s<sup>-1</sup> pour des champs de l'ordre de 1500 V.cm<sup>-1</sup>.

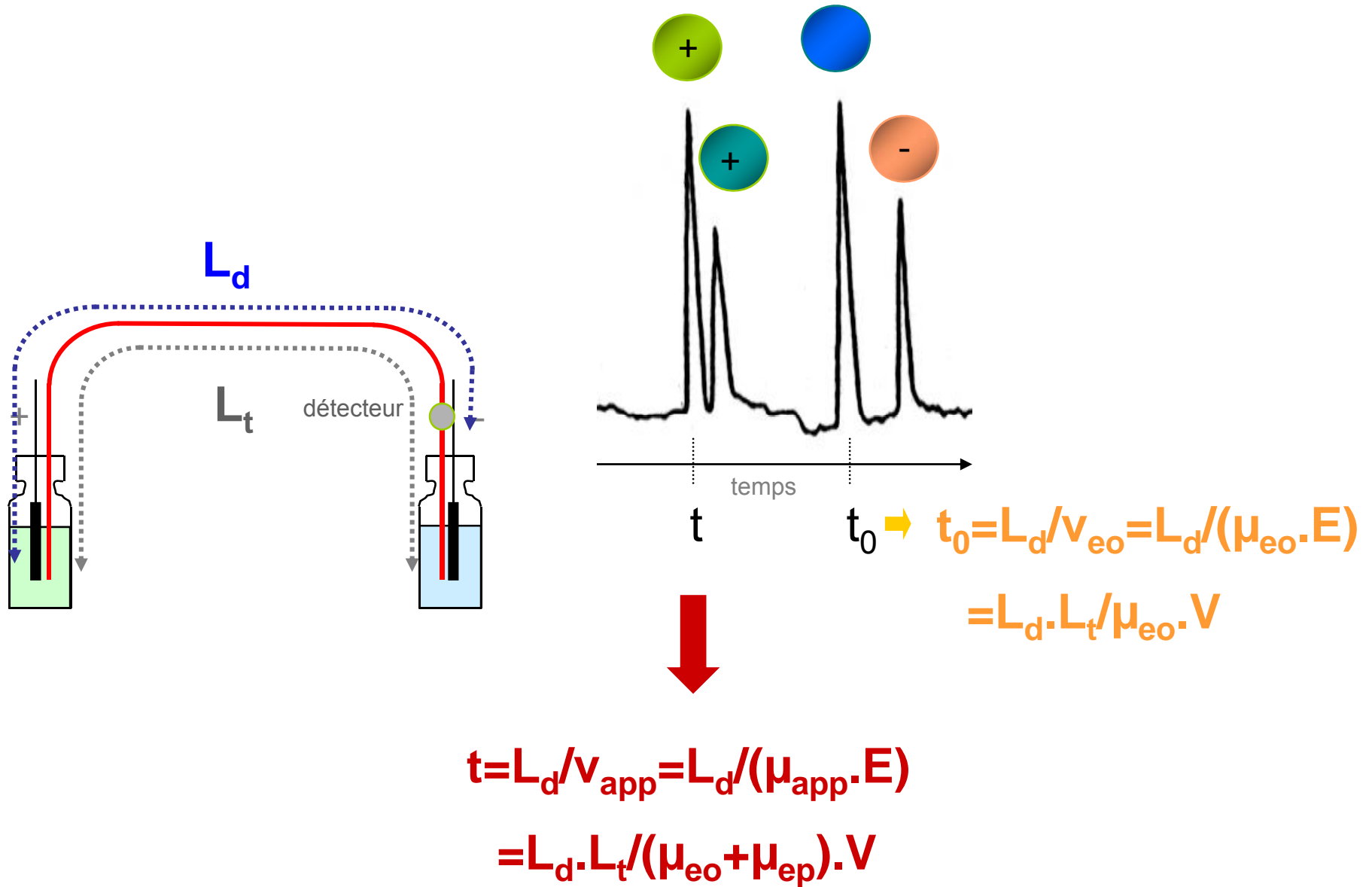
# BILAN

$$\mu_{app} = \mu_{eo} + \mu_{ep}$$

➤ capillaire de silice:



# Mesure des mobilités



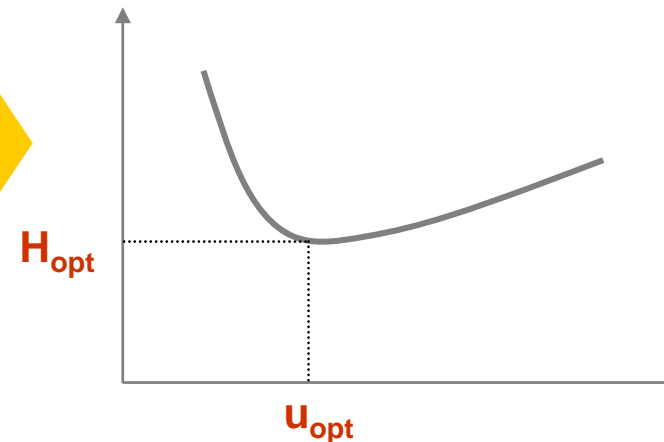
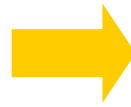
# Efficacité de la séparation



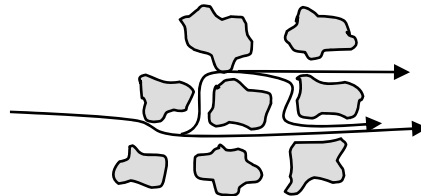
Elargissement de bande selon le modèle de Van Deemter

s'exprime en termes de *hauteur équivalente à un plateau théorique (H)* :

$$H = \cancel{A} + B/u + \cancel{C}u$$



Chemins préférentiels (A):



Diffusion moléculaire (B) :

fonction à la fois du soluté et de la phase mobile

Transfert de masse (C) :

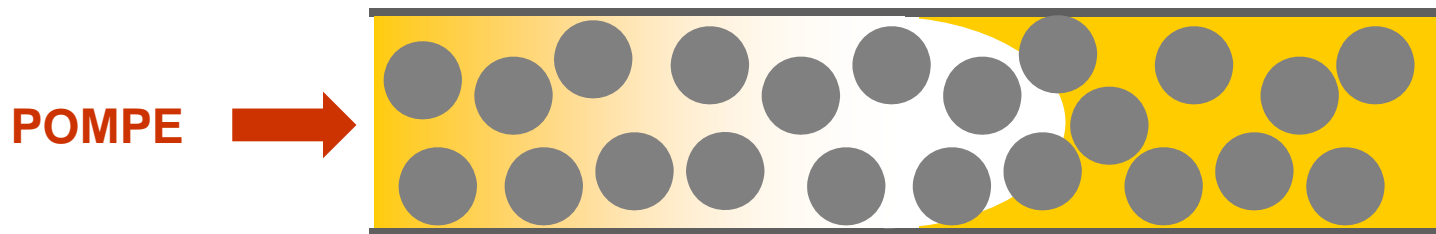
influencé par le coefficient de partage et donc la solubilité relative du soluté dans la phase stationnaire

# Profils d'écoulement

---

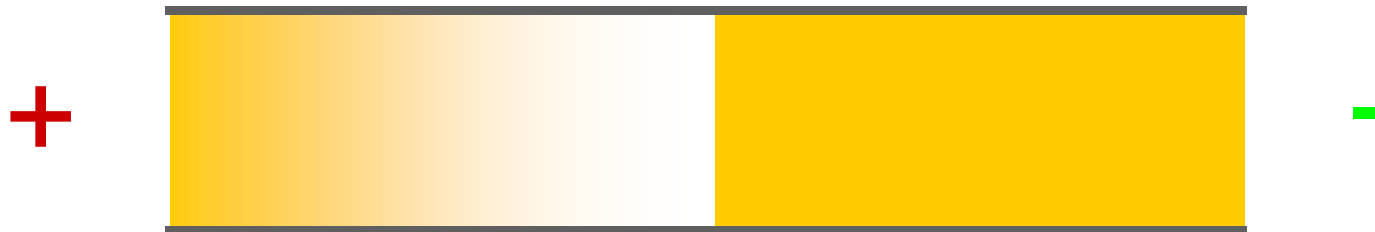
**HPLC**

**FLUX HYDRODYNAMIQUE : profil parabolique**



**CE**

**FLUX ELECTROOSMOTIQUE : profil plat**

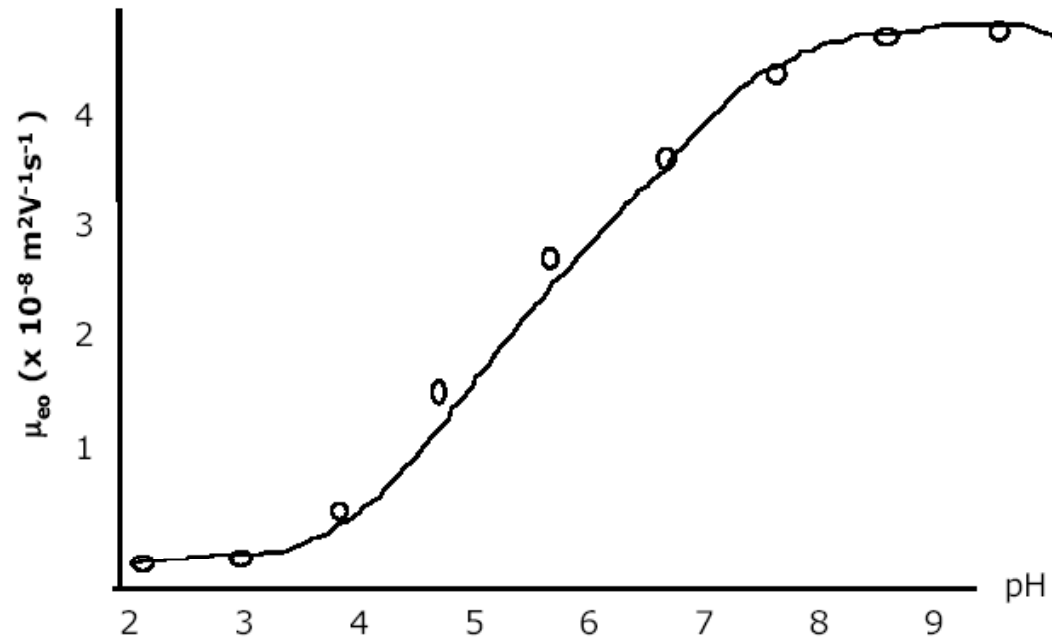


 **EFFICACITE ELEVEE**

# Influence du pH sur la paroi du capillaire

---

Capillaire de silice  
 $pI \sim 2$



→  
augmentation de  $\sigma$



# Modifier la surface, POURQUOI ?

---

✓ Réaliser des séparations « difficiles »

▶ éviter les phénomènes d'adsorption de surface

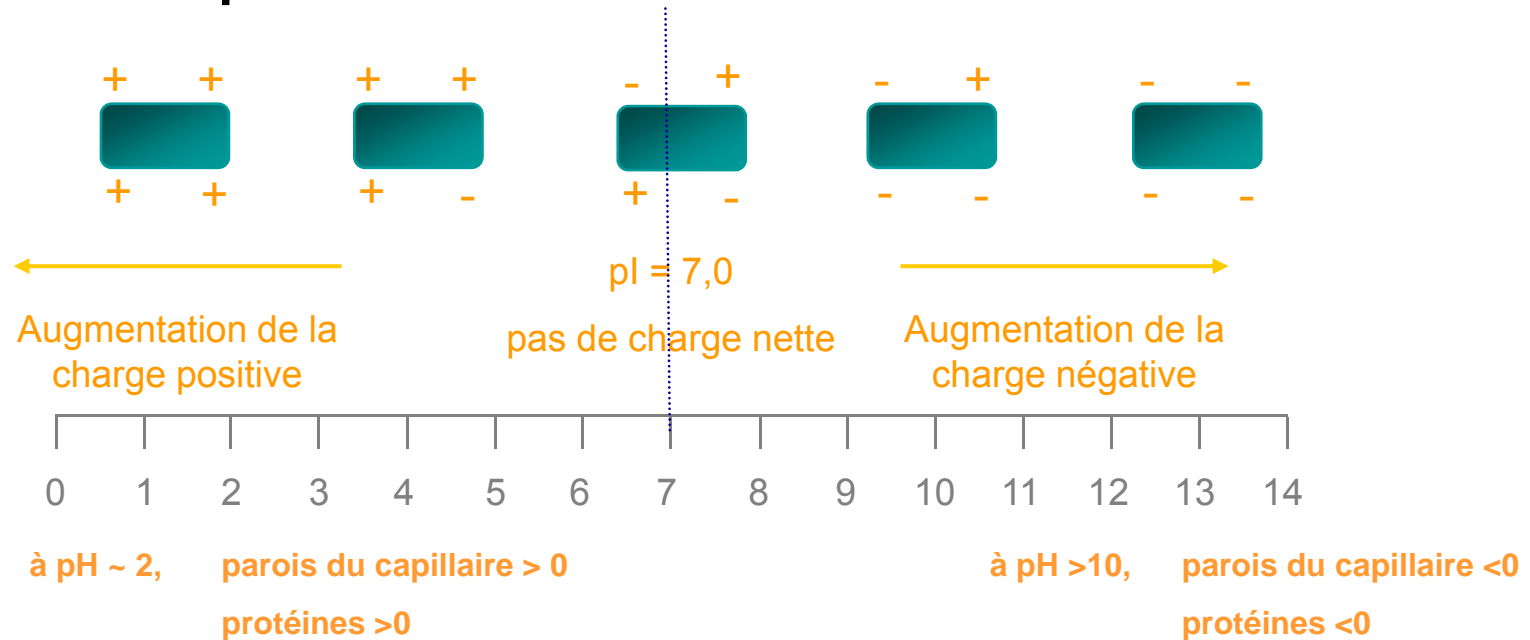
▶ 
$$R_s = \frac{1}{4} \frac{\Delta\mu_{ep}}{\mu_{ep,moy} + \mu_{eo}} \sqrt{N}$$

✓ Réaliser des séparations plus rapides

✓ Obtenir une mobilité électroosmotique indépendante du pH

# Modifier la surface, POURQUOI ?

## Séparation de protéines :

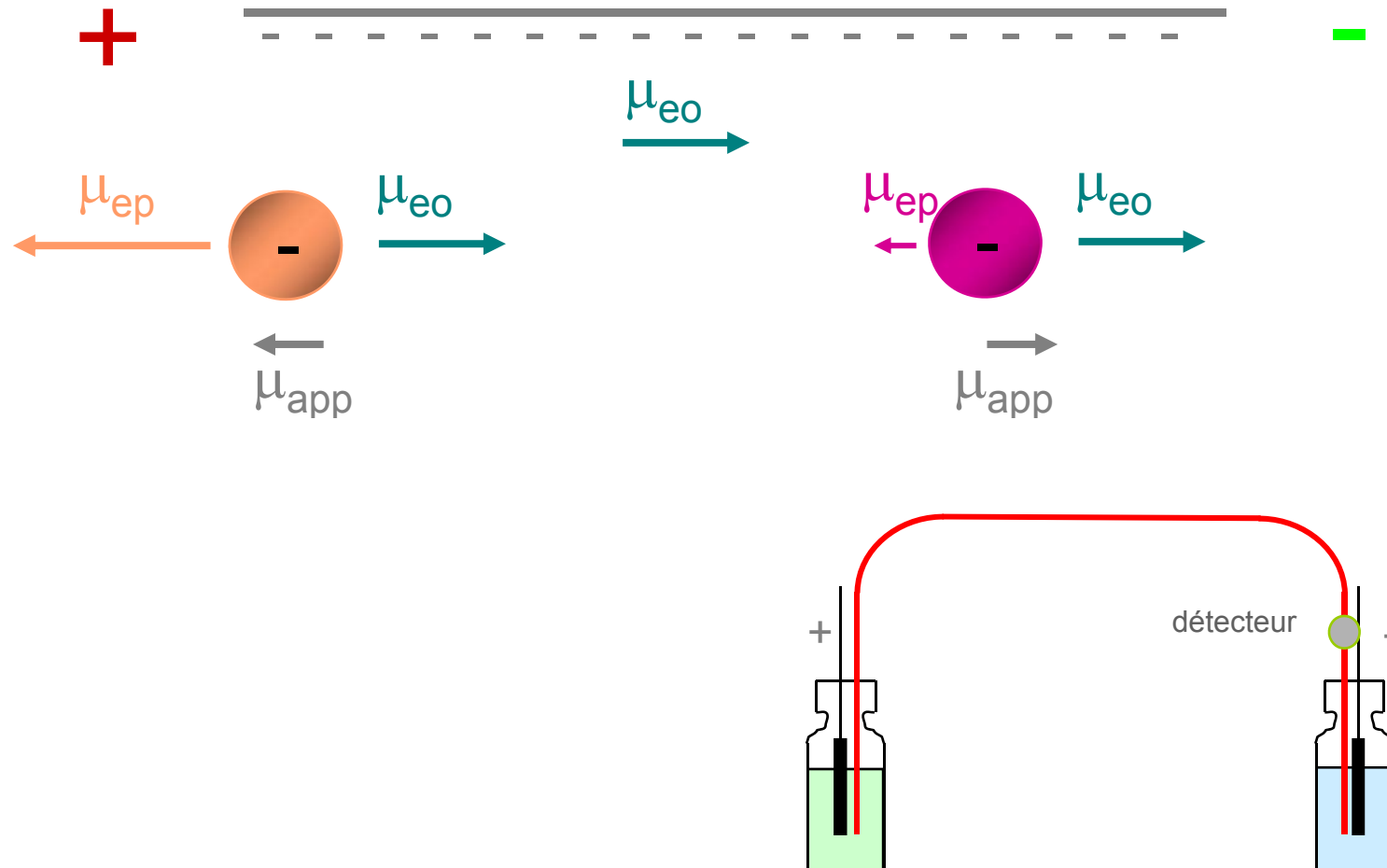


- ✓ exclut l'étude de nombreuses interactions ayant lieu à l'état natif
- ✓ exclut les essais enzymatiques (activité biologique souvent différente)
- ✓ dissolution de la silice à pH>11
- ✓ mobilité électrophorétique des protéines très sensible aux variations de pH dans les régions où pH<6 ou pH>9.

# Modifier la surface, POURQUOI ?

---

Séparation d'anions :



# Modifier la surface, COMMENT ?

---

## Greffages « dynamiques » :

- ▶ Présence d'additifs dans l'électrolyte

## Greffages permanents

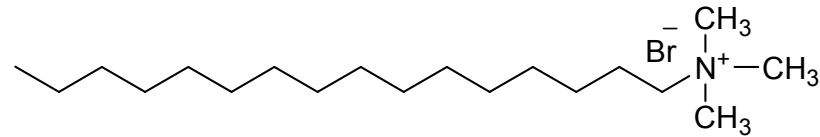
- ▶ Greffage chimique

*1- activation de la silice par un réactif de silanisation*

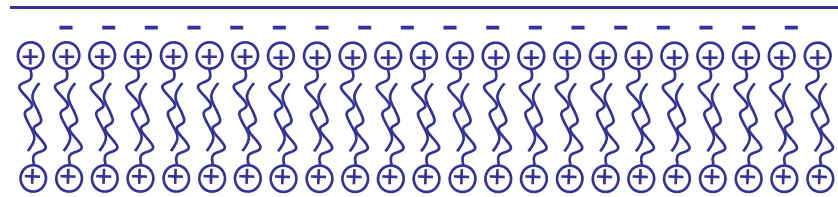
*2- greffage par des groupements fonctionnels*

- ▶ Immobilisation thermique

# Amino « quenchers » : surfactants



CTAB

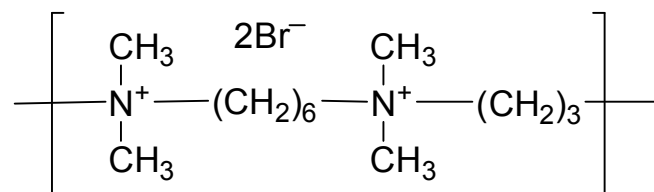


	<b>C<sub>18</sub></b>	<b>C<sub>16</sub></b>	<b>C<sub>14</sub></b>	<b>C<sub>12</sub></b>
<b>concentration (M) pour <math>\zeta = 0</math></b>	<b>8.10<sup>-6</sup></b>	<b>7.10<sup>-5</sup></b>	<b>5.10<sup>-4</sup></b>	<b>2,5.10<sup>-3</sup></b>

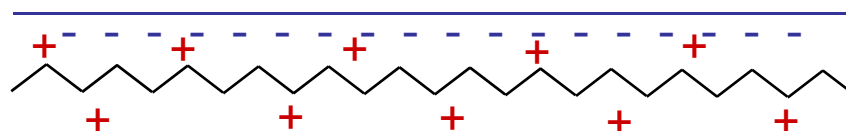
Effet de la longueur de la chaîne hydrocarbonée sur le potentiel  $\zeta$  du quartz en présence de solutions d'acétate d'alkylammonium

# Amino « quenchers » : polymères polycationiques

---



polybrene

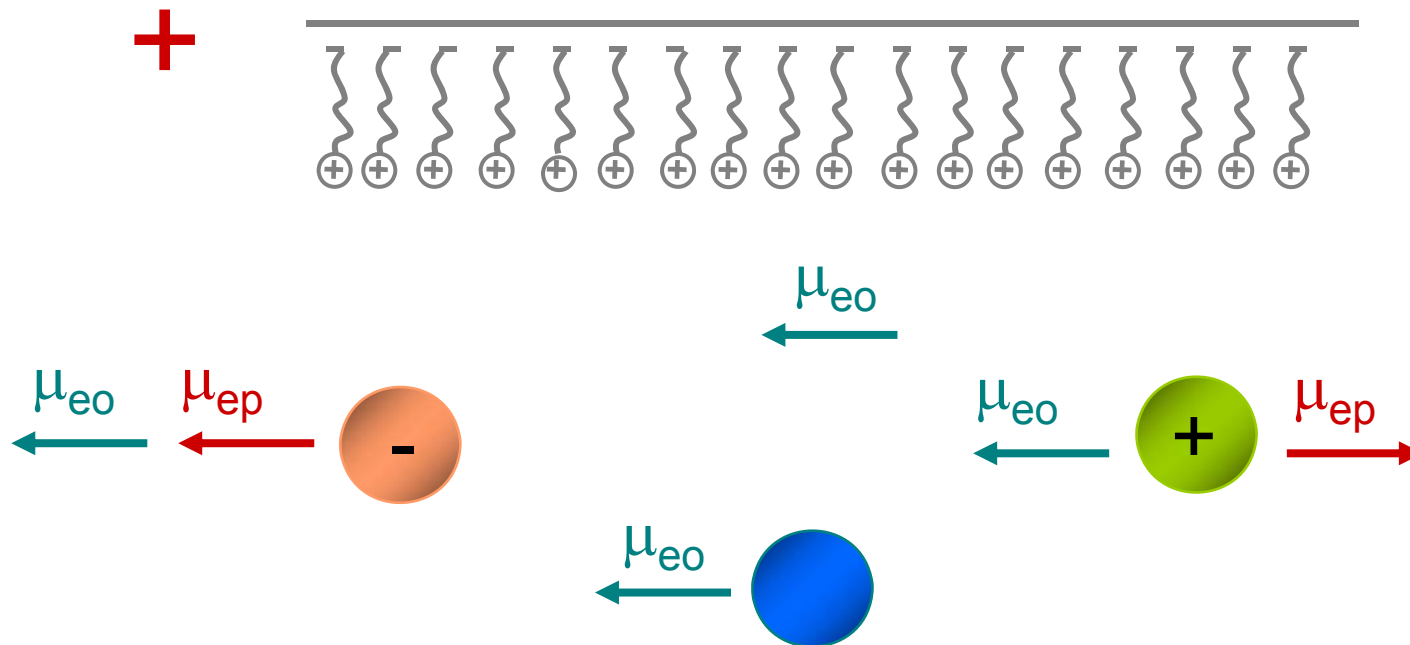


# BILAN

---

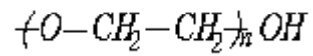
$$\mu_{app} = \mu_{eo} + \mu_{ep}$$

➤ surface chargée positivement

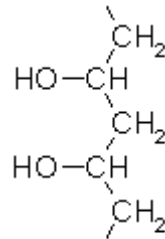


# Autres additifs

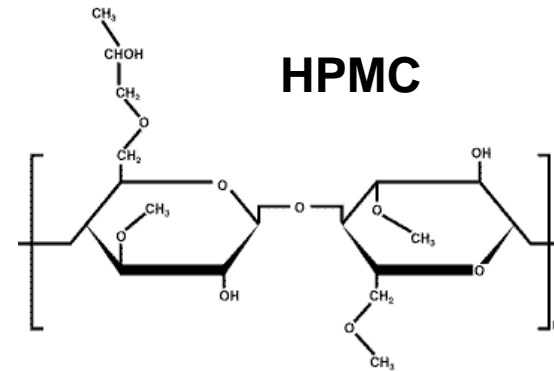
## Polymères neutres hydrophiles



**PEO**



**PVA**



**HPMC**

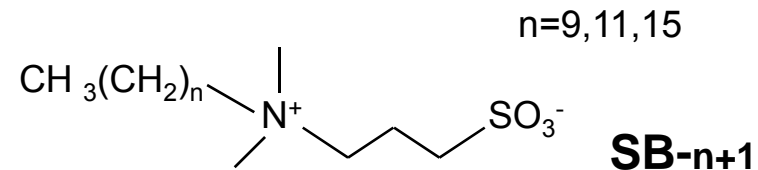
## Surfactants neutres

**Triton X-100**

**Brij-35**

**Tween 20**

## Surfactants zwitterioniques



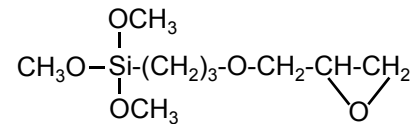


# Greffages permanents

---

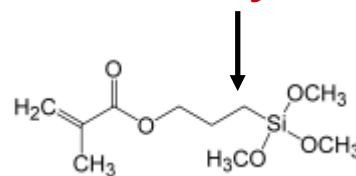
- Par liaison covalente

## Silylation

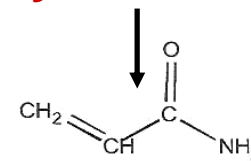


$\gamma$ -GPTMS

## Silylation et polymérisation



MAPS



Acrylamide

- Par immobilisation thermique

Alcool polyvinylique (PVA)

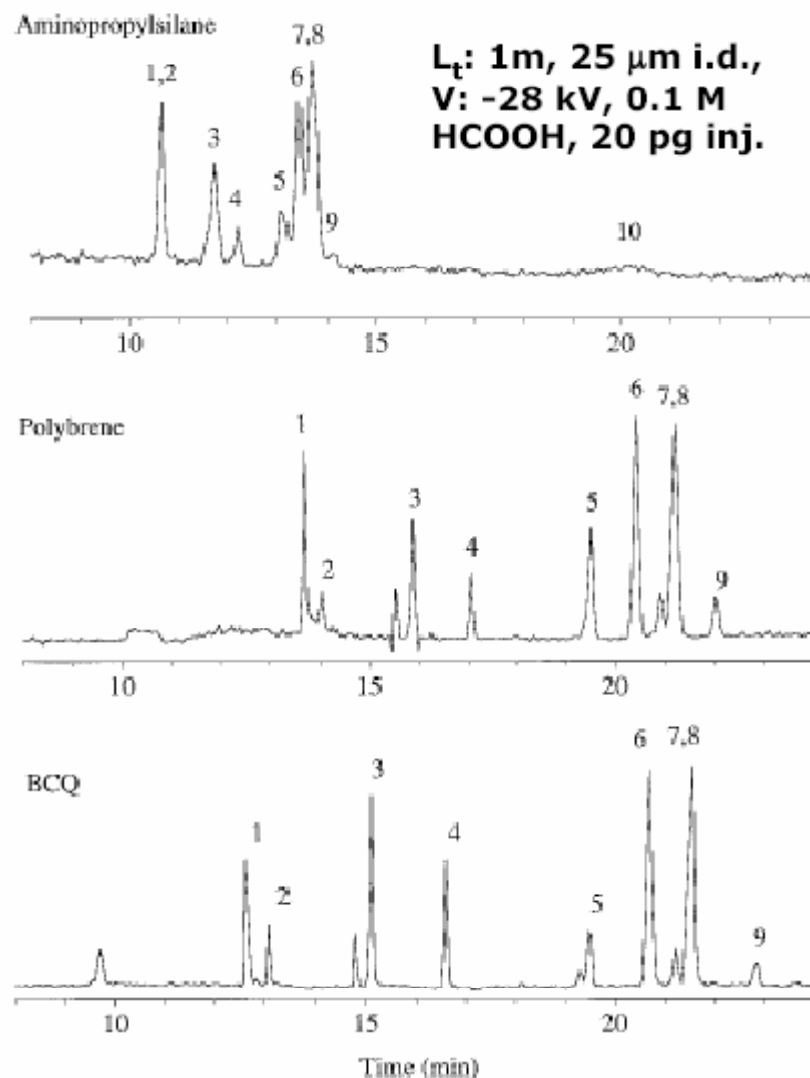
Hydroxypropylméthylcellulose (HPMC)

**Insolubles dans les solutions aqueuses après chauffage**

# Modifier la surface, COMMENT ?

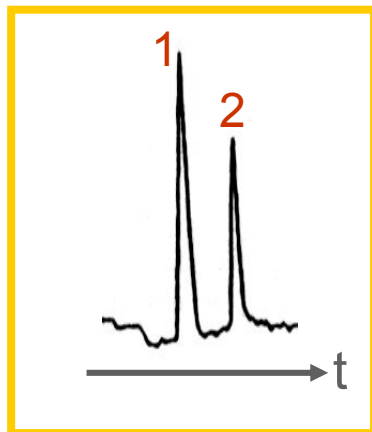
**Table 1. Comparison of separation efficiencies for different capillary coatings<sup>a</sup>**

	Peptides	<i>m/z</i>	Theoretical plates		
			APS	Polybrene	BCQ
1	Leu-enkephalin	556	62 000	185 000	352 000
2	Glu-Fibrinogen	786	38 000	185 000	380 000
3	Substance P <sub>3-11</sub>	548	76 000	249 000	505 000
4	Cholecystokinin <sub>10-20</sub>	418	49 000	273 000	312 000
5	Substance P <sub>1-9</sub>	553	29 000	355 000	355 000
6	Angiotensin I	433	31 000	230 000	237 000
7	Val <sub>4</sub> I <sub>17</sub> Angiotensin III	442	26 000	152 000	152 000
8	ACTH <sub>1-10</sub>	482	60 000	111 000	256 000
9	pGlu <sub>4</sub> -MBP <sub>4-14</sub>	459	18 000	268 000	288 000



# Facteurs de séparation

---



HPLC

CE

déplacement

$k'$

$\mu_{ep}$

sélectivité

$\alpha = k'_1/k'_2$

$\alpha = \mu_{ep,1}/\mu_{ep,2}$

résolution

$$R_s = \frac{1}{4} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \frac{k'}{k' + 1} \sqrt{N}$$

$$R_s = \frac{1}{4} \frac{\Delta\mu_{ep}}{\mu_{ep,moy} + \mu_{eo}} \sqrt{N}$$


# Efficacité de la séparation

---

Variance de la zone migratrice (loi de diffusion d'Einstein):  $\sigma^2$

$$\sigma^2 = 2D_m t$$

proportionnelle à la longueur parcourue et à la hauteur équivalente à un plateau théorique :  $\sigma^2 = H.L$


$$N = \frac{L}{H} = \frac{L^2}{\sigma^2}$$



Vitesse de migration :  $v = \frac{(\mu_{ep} + \mu_{eo})V}{L}$

Temps de transit du soluté à travers le capillaire :  $t = \frac{L^2}{(\mu_{ep} + \mu_{eo})V}$

$$N = \frac{(\mu_{ep} + \mu_{eo})V}{2 D_m}$$

# Optimisation de la séparation

---

$$R_s = \frac{1}{4} \frac{\Delta\mu_{ep}}{\mu_{ep,moy} + \mu_{eo}} \sqrt{N}$$

avec  $N = \frac{(\mu_{ep} + \mu_{eo})V}{2D_m}$

↗  $V$


↗  $\Delta\mu_{ep}$

$$\mu_{ep,moy} = -\mu_{eo}$$

## Influence du voltage

---

Limitation : Puissance dissipée


$$\frac{P}{L} = \frac{\Lambda C r^2 V^2}{L^2}$$

L : longueur du capillaire

r : rayon du capillaire

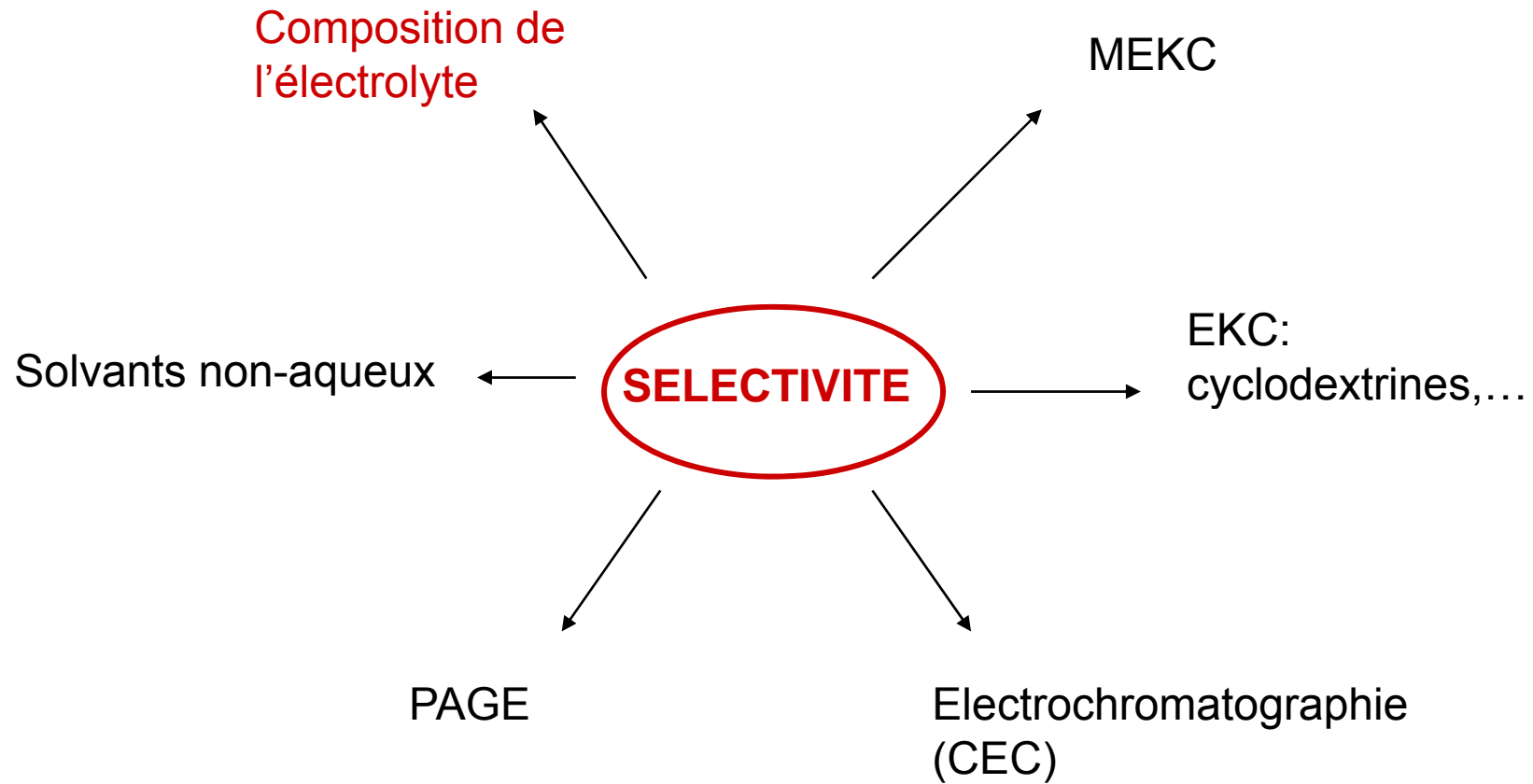
C : concentration de l'électrolyte

$\Lambda$  : conductance molaire de la solution

 **capillaires de faibles diamètres**

# AMELIORER LA SELECTIVITE

---



## Facteurs affectant la mobilité électroosmotique

---

$$\mu_{eo} = \frac{\varepsilon \zeta}{4 \pi \eta} \sim \frac{\sigma \delta}{\eta}$$

- ▶ **Composition de l'électrolyte** : nature et concentration des ions, pH, solvants organiques
- ▶ **Nature du capillaire**
- ▶ **Température**



# Plan du cours

---

## 1. La migration en électrophorèse capillaire

1.1 Mobilité électrophorétique

1.2 Phénomène d'électroosmose

## 2. La séparation en électrophorèse capillaire

2.1 Efficacité

2.2 Résolution

## 3. L'amélioration de la sélectivité

## 4. L'analyse quantitative

4.1 Injection

4.2 Détection

4.3 Mesure des surfaces de pics

## 5. La Focalisation isoélectrique (CIEF)

## Facteurs affectant la mobilité électrophorétique

---

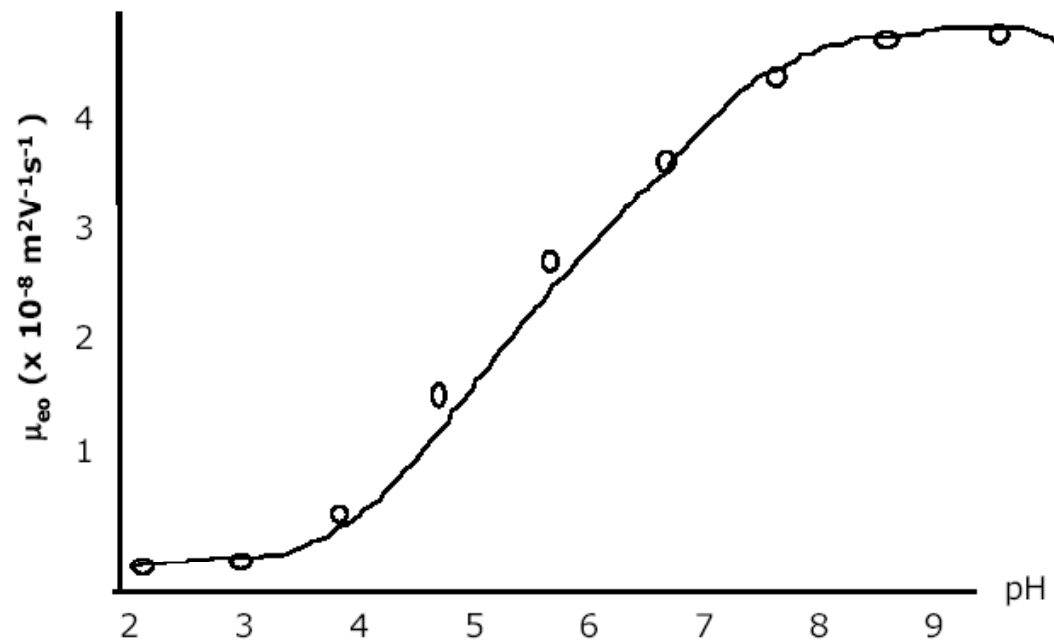
$$\mu_{ep} = \frac{q}{6 \pi \eta r}$$

- ▶ **pH** : modification de l'intensité de la charge portée par les espèces
- ▶ **composition ionique de l'électrolyte** : influence sur les interactions entre les groupements ionisables des solutés et les ions de l'électrolyte (Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, ...)
- ▶ ajout de modificateur organique
- ▶ température

# Influence du pH sur la paroi du capillaire : $\mu_{eo}$

---

Capillaire de silice



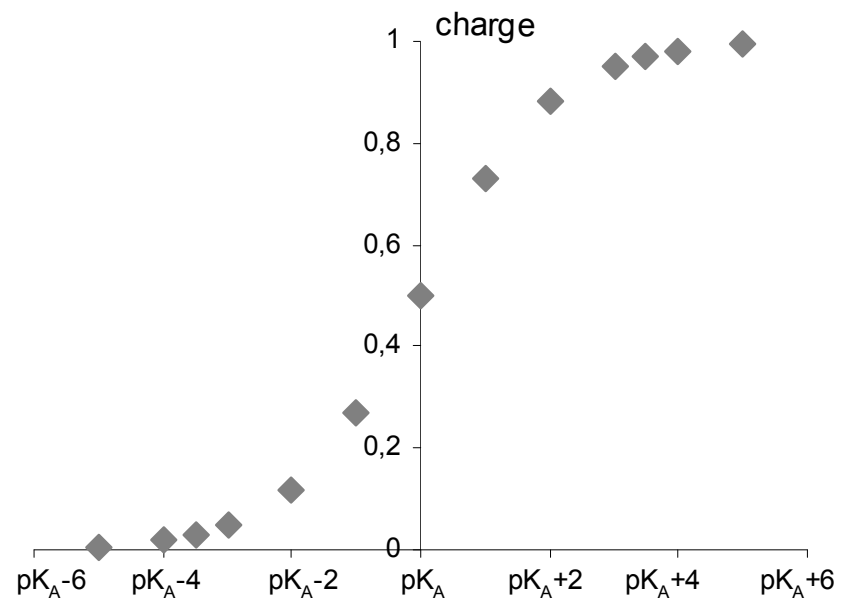
augmentation de  $\sigma$

# Notions de $pK_A$

---



$$\text{avec } pK_A = pH - \log \frac{[L^-]}{[HL]}$$



# Tampons couramment utilisés en électrophorèse capillaire

---

## Solution tampon

## pK<sub>A</sub>

Phosphate	2.12 - 7.21 - 12.32
Citrate	3.06 - 4.74 - 5.40
Formate	3.75
Succinate	4.19 - 5.57
Acétate	4.74
Borate	9.24

## *Tampons zwitterioniques*

MES	6.15
HEPES	7.55
TRIS	8.30

} Conductivité  
faible

## Influence de la force ionique

---

$$\mu_{eo} = \frac{\varepsilon \zeta}{4 \pi \eta} \sim \frac{\sigma \delta}{\eta}$$

$\sigma$  : densité de charge à la surface du capillaire

$\eta$  : viscosité de la solution

$\delta$  : épaisseur de la double couche



$$\delta = K.(\varepsilon T / \sum C_i z_i^2)^{1/2}$$

## Influence de la force ionique

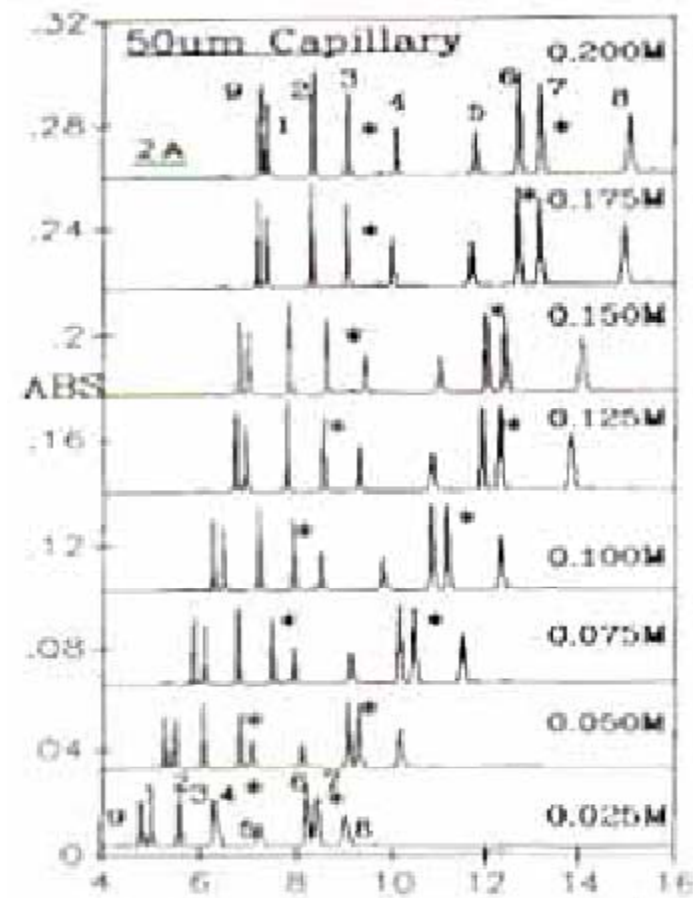
$$\delta = K.(\epsilon T / \sum C_i z_i^2)^{1/2}$$

lorsqu'on augmente la concentration de l'électrolyte

➤ diminution de  $\delta$

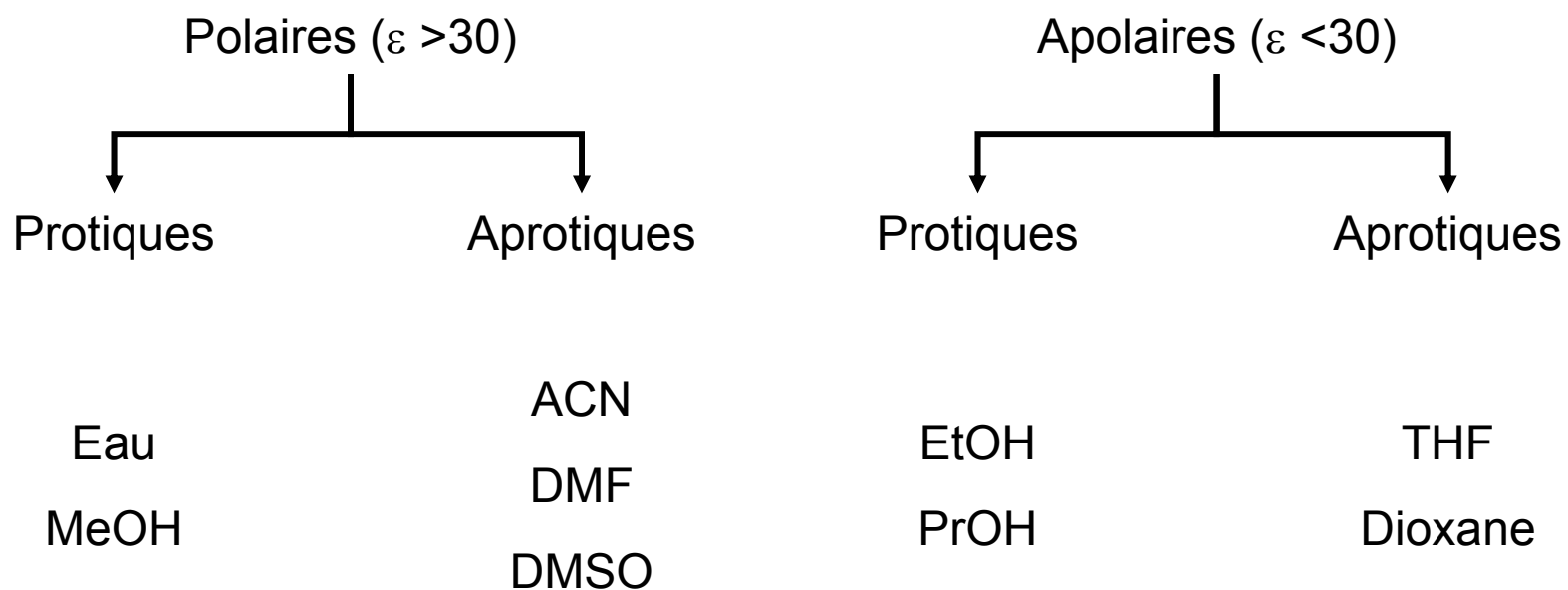
Tampon phosphate  
(0.025-0.2M, pH 2.4),  
V: 30 kV, Ld: 0.5 m.

- 1: Bradykinin
- 2: Angiotensin II
- 3: TRH
- 4: LHRH
- 5: Bombesin,
- 6: Leu-enk
- 7: Met-enk.
- 8: Oxytocin
- 9: Dynorphin



## Influence du modificateur organique

---



➤ Influence la mobilité et/ou les constantes de dissociation ( $pK_A$ , paires d'ions,...)



# Influence du modificateur organique

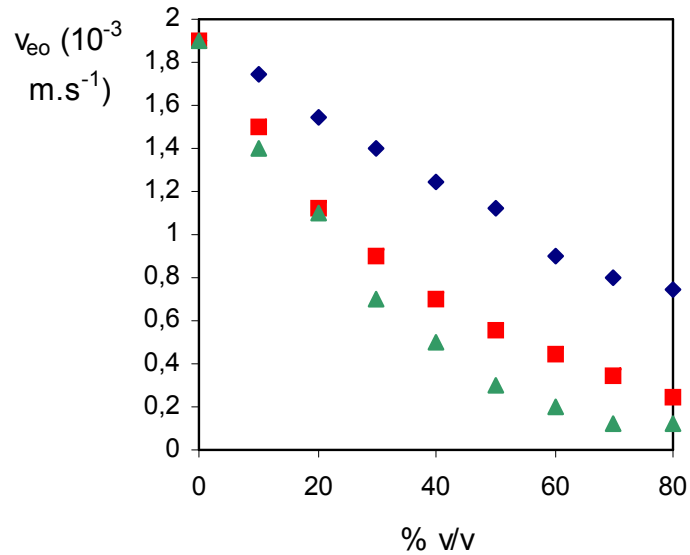
---

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6 \pi \eta r}$$

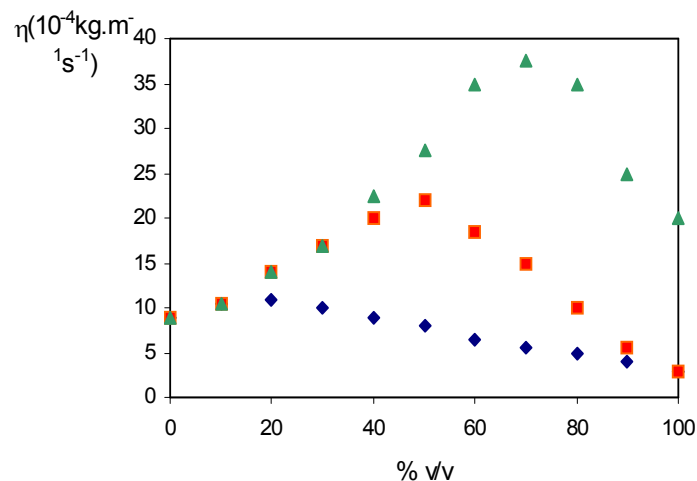
- ▶ Influence sur la viscosité
- ▶ Influence sur le pH
- ▶ Influence sur la solvation

Solvant	Cations	Anions
Eau	++	++
Méthanol	+/-	++
Ethanol	-	++
Acétonitrile	--	--

# Influence du modificateur organique



## ► Influence sur la viscosité



▲ DMSO    ■ acétone    ◆ ACN

$$\mu_{eo} = \frac{\varepsilon \zeta}{4 \pi \eta} \sim \frac{\sigma \delta}{\eta}$$

## ► Influence sur le potentiel zéta

**Solvants polaires** (ex : eau): potentiels  $\zeta$  qui peuvent atteindre 100mV.

**Solvants apolaires** (ex : heptane): pas de potentiel  $\zeta$ , sauf en présence d'additifs.

**Augmentation du pourcentage** de modificateur organique

➤ **diminution de  $\zeta$**

ACN < acétone < MeOH < EtOH, PrOH < DMSO

## Règles générales :

---

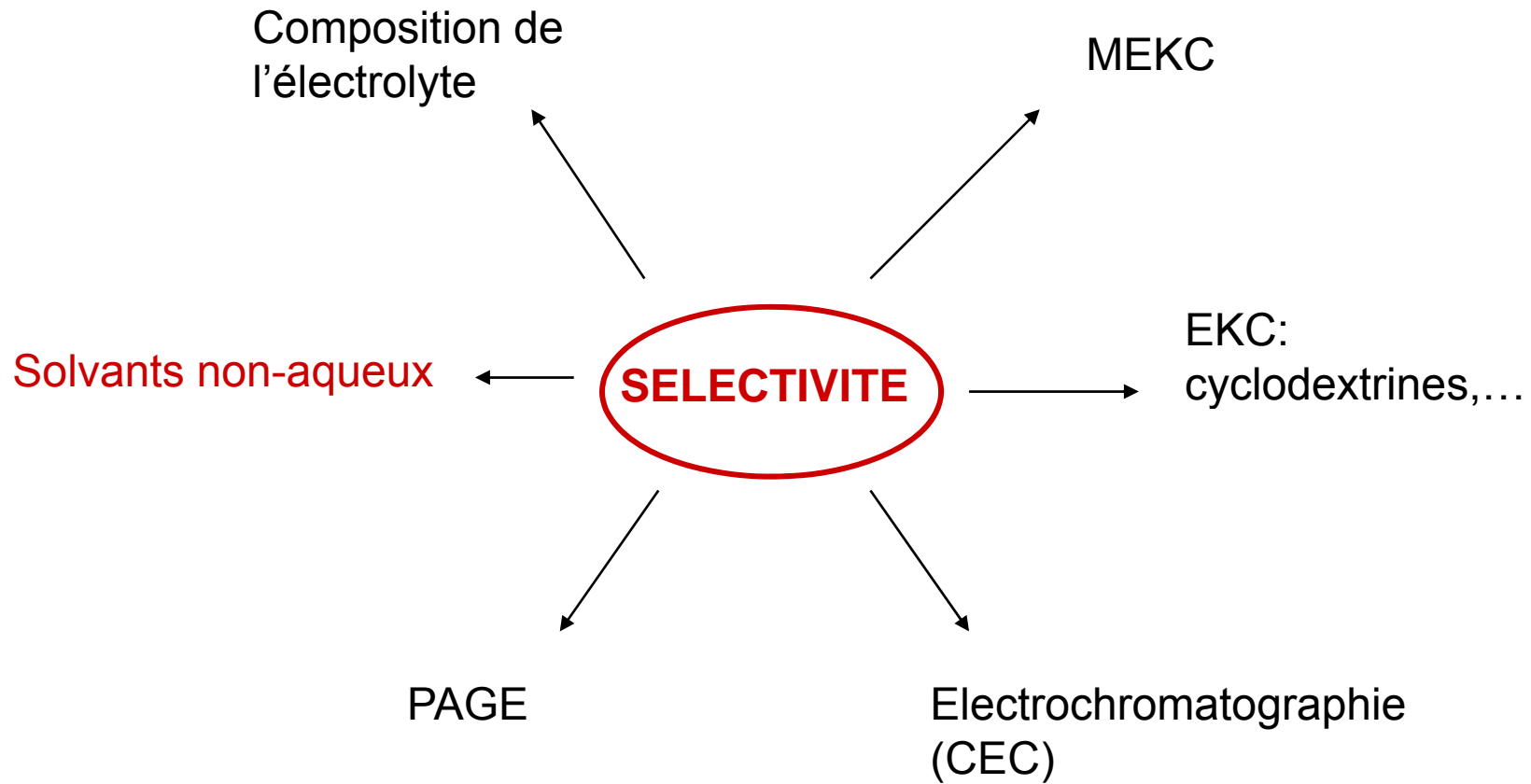
On a **DIMINUTION** de la mobilité électroosmotique :

- ✓ lorsqu'on diminue le pH
  - diminution de  $\sigma$
  
- ✓ lorsqu'on augmente la concentration de l'électrolyte
  - diminution de  $\delta$
  
- ✓ lorsqu'on augmente le pourcentage de modificateur organique
  - diminution de  $\zeta$

ACN < acétone < MeOH < EtOH, PrOH < DMSO

# AMELIORER LA SELECTIVITE

---



## Intérêt des milieux non-aqueux

---

✓ faibles courants

❖ **augmentation des diamètres des capillaires**

➤ semi-préparative

❖ **augmentation de l'efficacité ( $N/t \propto \varepsilon/\eta^2$ )**

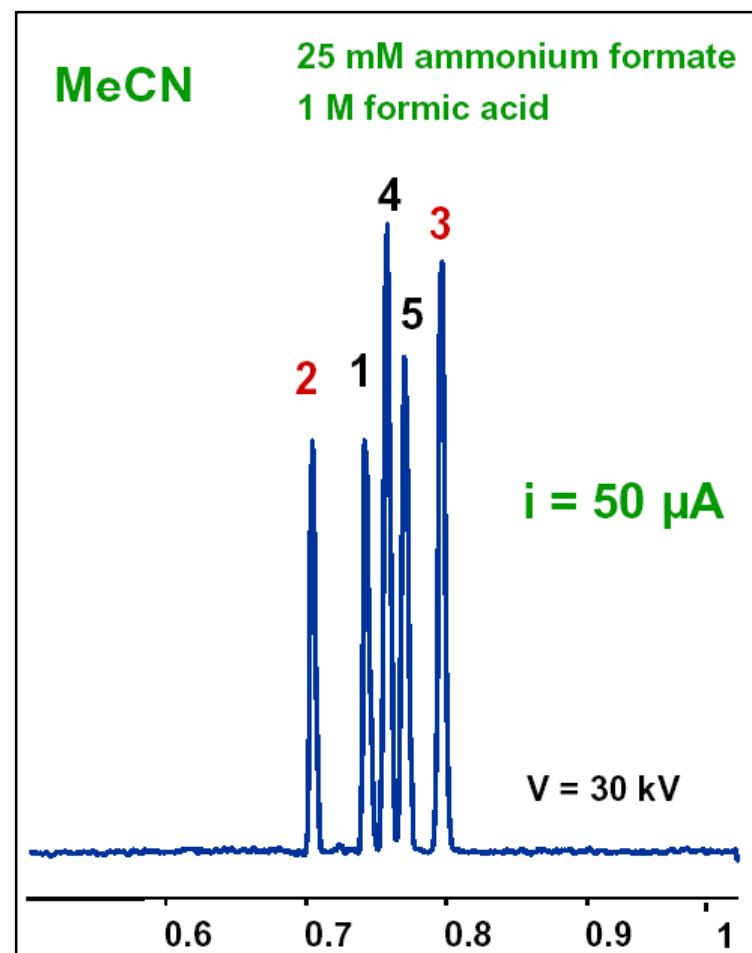
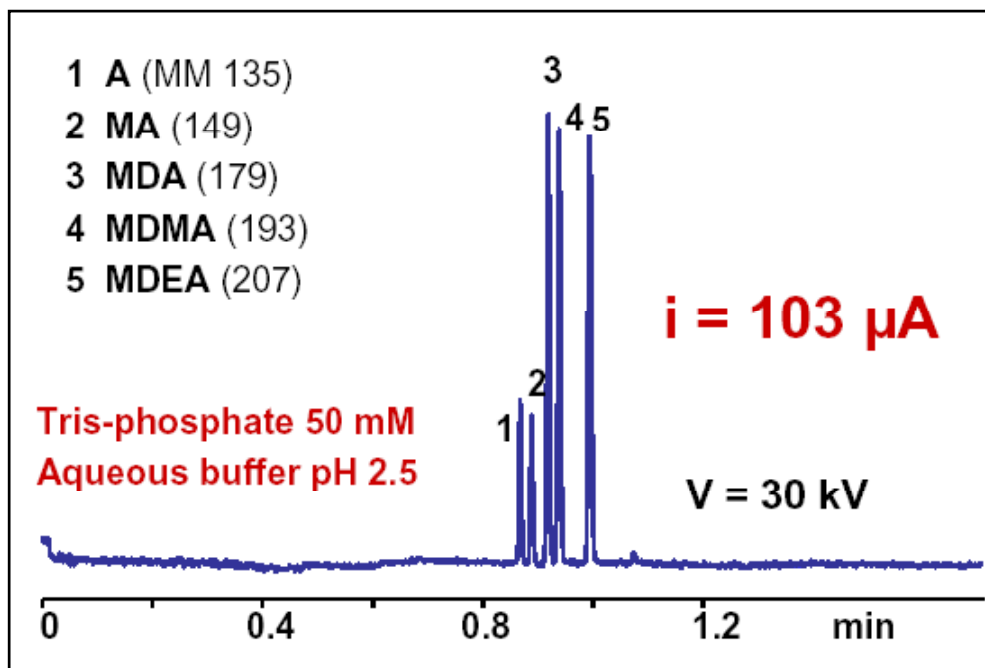
	$\varepsilon/\eta$	$\varepsilon/\eta^2$
eau	88,2	6924
méthanol	22,7	552
NMF	110,3	20075
acétonitrile	110,3	4136

✓ modification des sélectivités

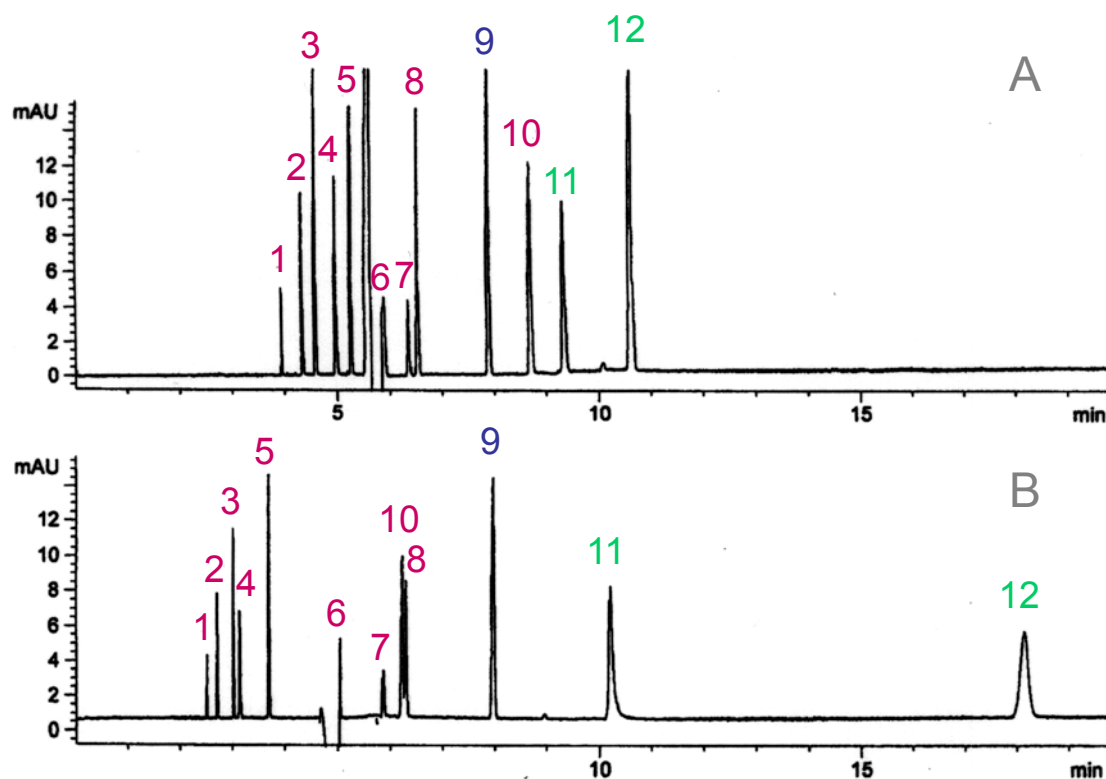
✓ meilleure compatibilité avec la spectrométrie de masse

✓ augmentation des solubilités (ex: cyclodextrines)

# NACE



# NACE



Séparation d'un mélange de 12 composés

capillaire de silice 58;5cm x 50µm i.d. - 30kV

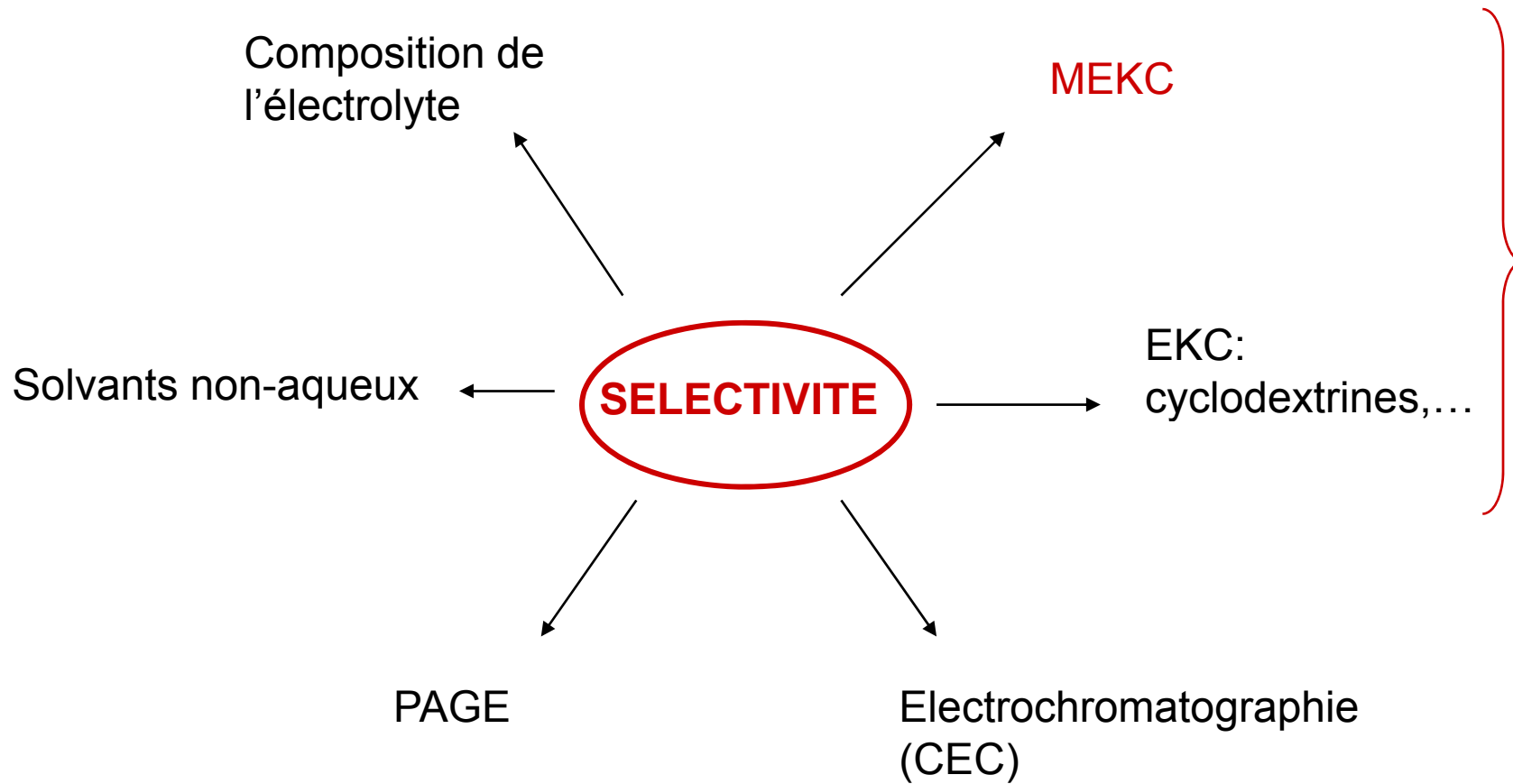
électrolyte : (A) **éthanol**/acétonitrile/acide acétique (50:49:1) dans 20mM CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>

(B) **méthanol**/acétonitrile/acide acétique (50:49:1) dans 20mM CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>

1 amphétamine, 2 éphédrine, 3 levorphanol, 4 dextromoramide, 5 morphine, 6 hydrochlorothiazide, 7 acide benzoïque, 8 acide meso-2,3-diphénylsuccinique, 9 probenecid, 10 chlorothiazide, 11 acide phénylènediacétique, 12 acide éthacrynique.

# AMELIORER LA SELECTIVITE

---





# Chromatographie électrocinétique

---

= technique séparative qui allie des phénomènes de type :

- électroosmose
- électrophorèse
- chromatographie



Partage phase mobile/ phase « stationnaire » du soluté



Mécanismes engendrés par l'ajout dans l'électrolyte d'une pseudo-phase stationnaire



Pas de développement instrumental différent



**Séparation des molécules neutres**

# Séparation de molécules neutres

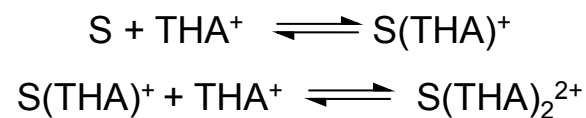
---

- Mobilité non affectée par la présence d'un champ électrique
- Co-élution de toutes ces molécules avec le flux électroosmotique

Stratégies :

## 1. Formation de complexes chargés

ex : composés faiblement hydrophiles en présence de tetrahexylammonium (THA<sup>+</sup>)



ex : catéchols en présence d'acide borique

## 2. Micelles ioniques

- le plus couramment utilisé

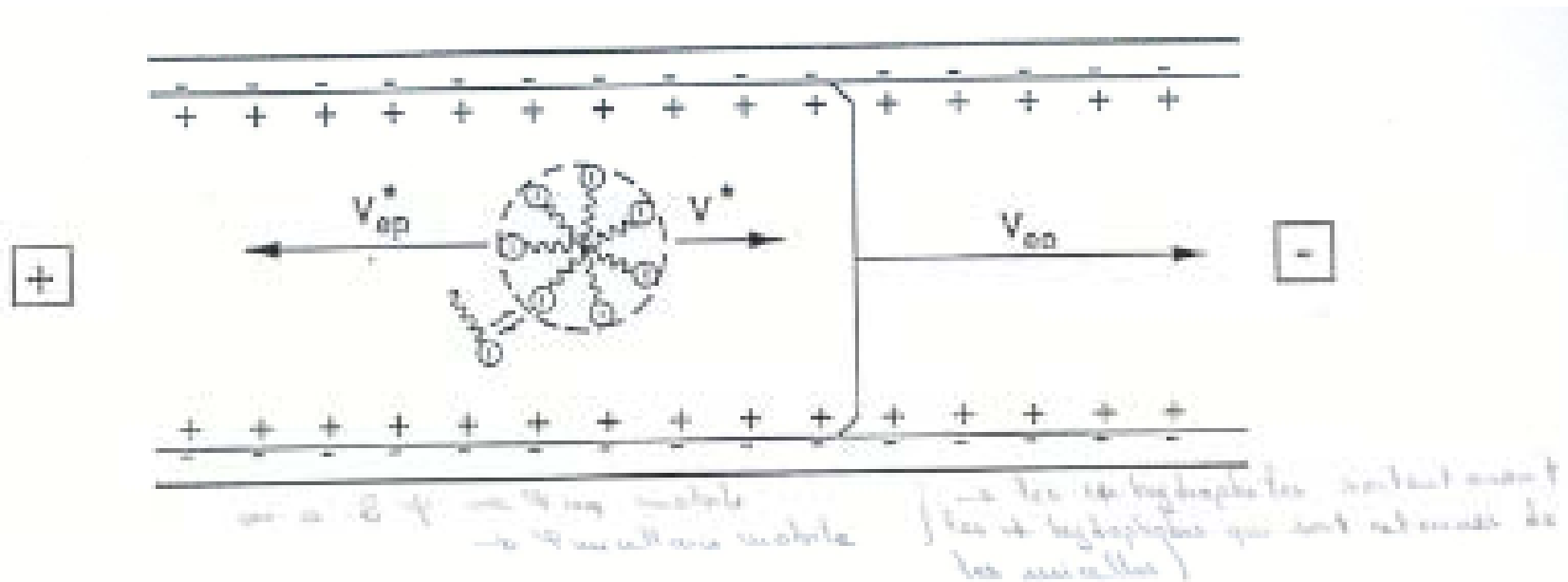
# Chromatographie électrocinétique micellaire

---

- assez solubles dans l'électrolyte pour former des micelles
- transparents à l'UV
- micelles homogènes
- micelles de faible viscosité

Surfactant	CMC( $10^{-3}$ M) à 25°C dans l'eau
<b>Sodium dodecylsulfate (SDS)</b>	<b>8.1</b>
Sodium tetradecylsulfate (STS)	2.1 (50°C)
Sodium N-lauroyl-N-methyltaurate (LMT)	8.7
Sodium cholate	13-15
<b>Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)</b>	<b>0.92</b>

# Chromatographie électrocinétique micellaire



$$V_{eo} = m_{eo} E$$

vitesse d'écoulement électroosmotique

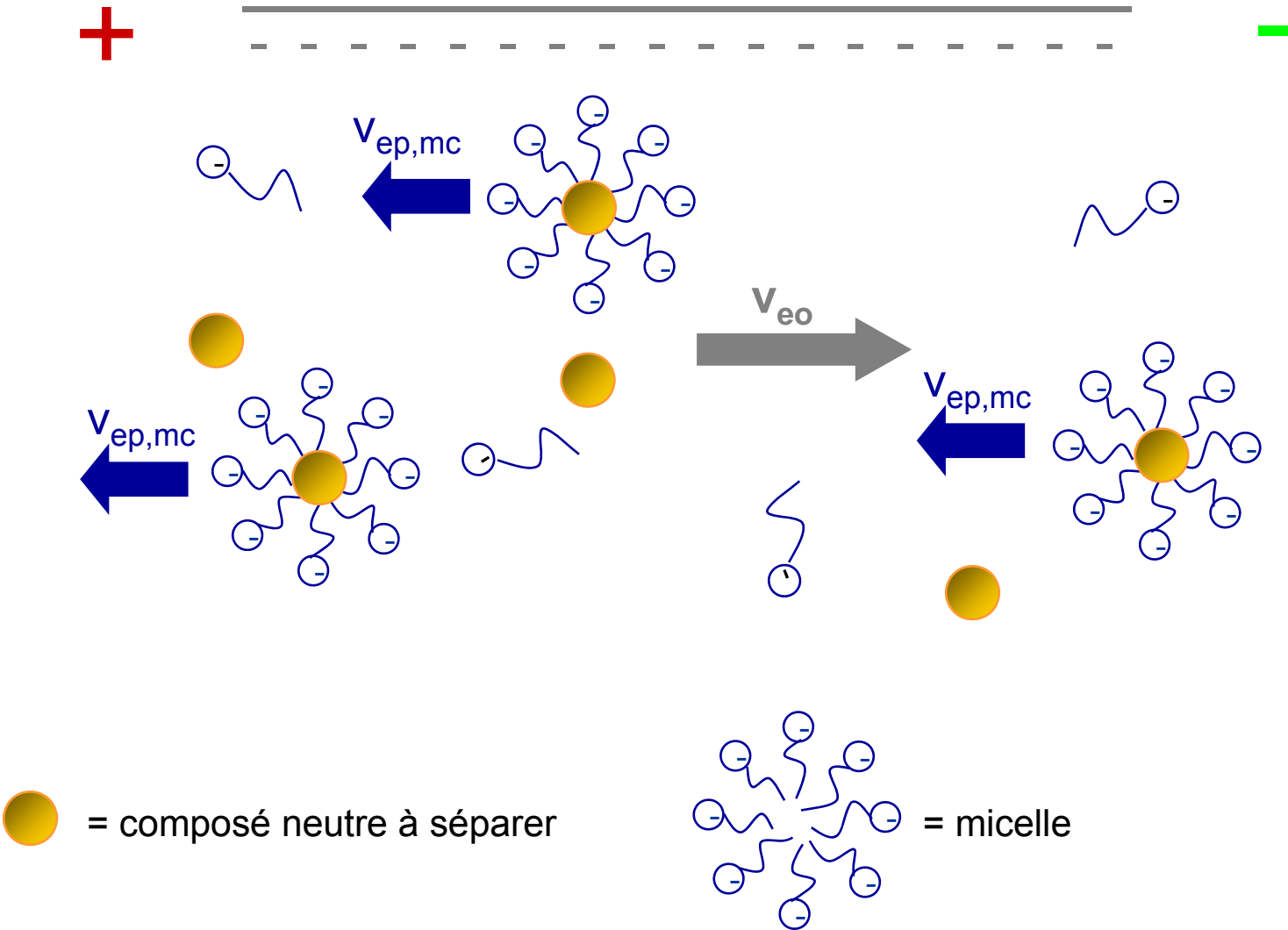
$$V_{ep}^* = m_{ep}^* E$$

vitesse de migration électrophorétique

$$V^* = (m_{eo} + m_{ep}^*) E$$

vitesse de migration apparente

# Chromatographie électrocinétique micellaire



injection

détection

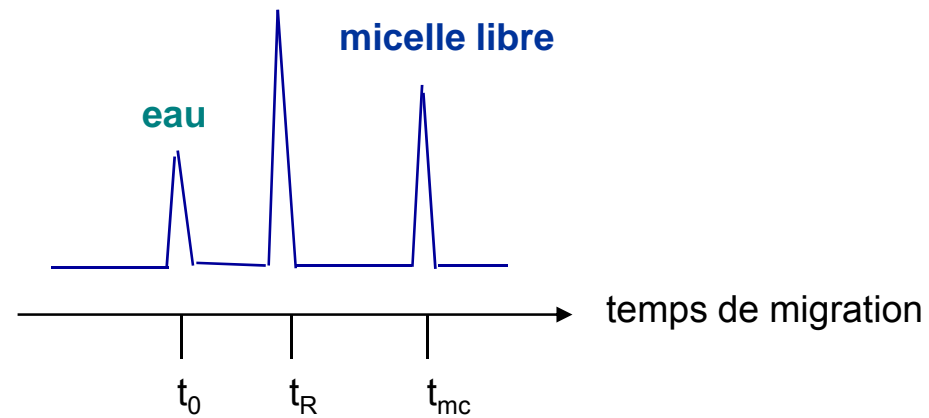


micelle  
libre

soluté

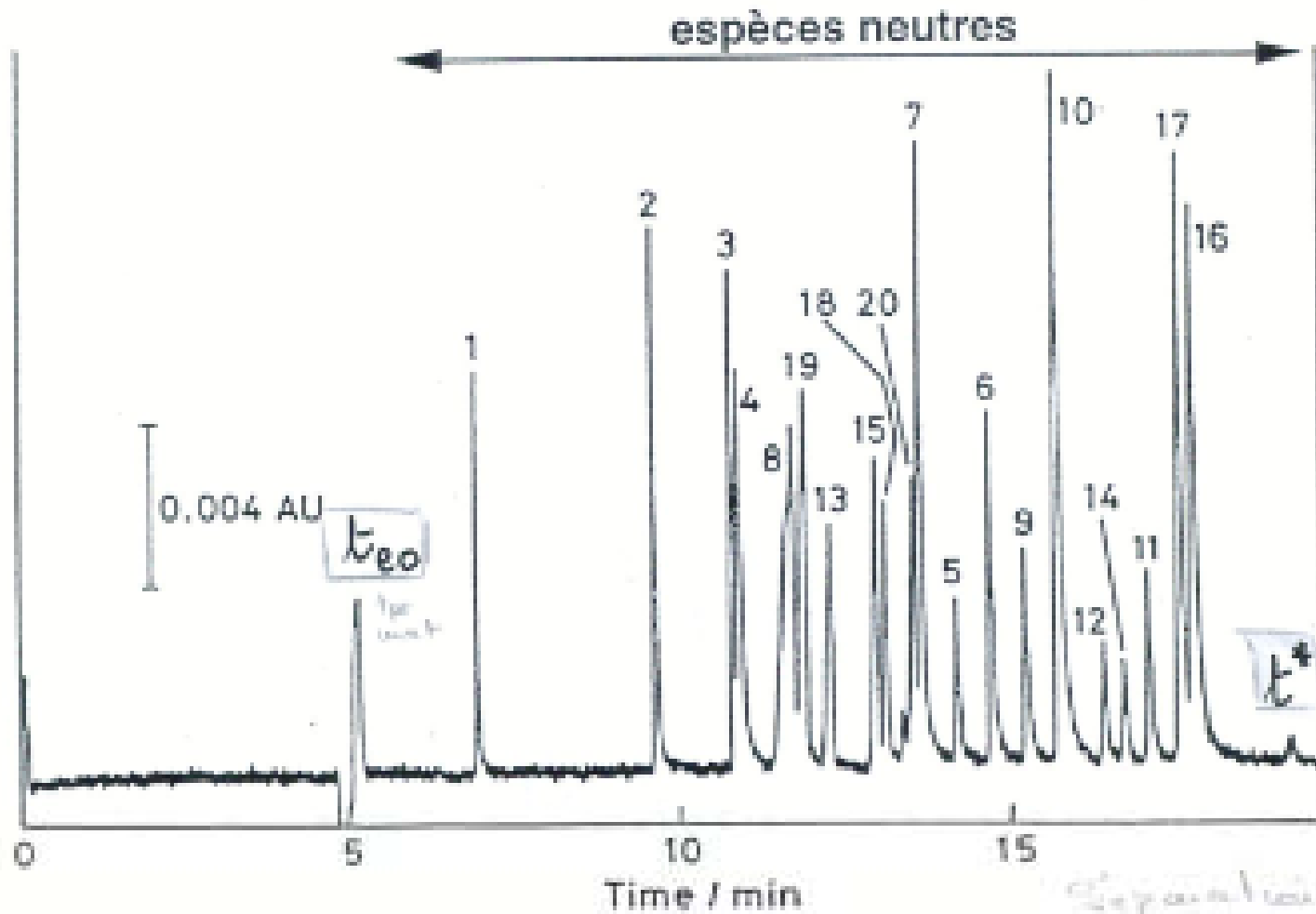
eau

soluté



$t_0 < t_R < t_{mc}$  ➤ Fenêtre de détection

# Chromatographie électrocinétique micellaire



Séparation des polychlorophénols

Séparation des espèces neutres de la phase hydrophobe

## Mobilité des solutés en MEKC

---

$$\mu_{\text{soluté}} = \frac{n_{\text{aq}}}{n_{\text{aq}} + n_{\text{mc}}} \mu_{\text{eo}} + \frac{n_{\text{mc}}}{n_{\text{aq}} + n_{\text{mc}}} \mu_{\text{mc}}$$

fraction de soluté présent dans la micelle =  $\frac{n_{\text{mc}}}{n_{\text{aq}} + n_{\text{mc}}}$

fraction de soluté présent dans la phase aqueuse =  $\frac{n_{\text{aq}}}{n_{\text{aq}} + n_{\text{mc}}}$

$$k' = \frac{n_{\text{mc}}}{n_{\text{aq}}}$$

  $\frac{1}{1 + k'} = \frac{n_{\text{aq}}}{n_{\text{aq}} + n_{\text{mc}}}$    $\mu_{\text{soluté}} = \frac{1}{1 + k'} \mu_{\text{eo}} + \frac{k'}{1 + k'} \mu_{\text{mc}}$

$$\frac{k'}{1 + k'} = \frac{n_{\text{mc}}}{n_{\text{aq}} + n_{\text{mc}}}$$

$$t_R = \frac{1 + k'}{1 + (t_0/t_{\text{mc}})k'} t_0$$



## Mobilité des solutés en MEKC

---

$$t_R = \frac{1 + k'}{1 + (t_0/t_{mc})k'} t_0$$

si  $t_{mc} \rightarrow \infty$   $\Rightarrow$  micelle = phase stationnaire



définition de  $t_R$  analogue à la définition donnée en chromatographie

$$t_R = (1 + k') t_0$$

si  $t_0 \rightarrow \infty$   $\Rightarrow$  suppression du flux électroosmotique



les solutés auront une migration anodique

$$t_R = \frac{1 + k'}{k'} t_{mc}$$

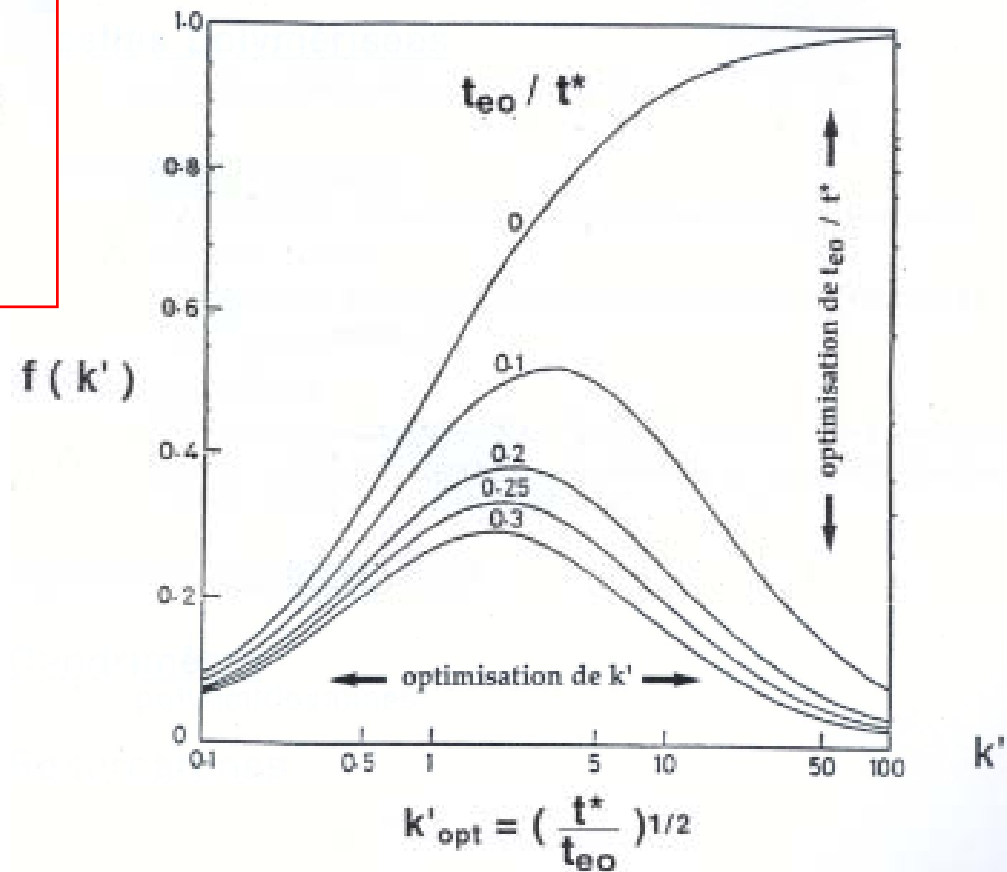
# Résolution et sélectivité en MEKC

$$R_s = \frac{\Delta t_M}{4 \sigma_t}$$

$$R_s = \frac{1}{4} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \frac{k_2'}{1 + k_2'} \frac{1 - t_{eo} / t^*}{1 + (t_{eo} / t^*) k_1'} N^{1/2}$$

$$\alpha = \frac{k_2'}{k_1'} \quad (\text{sélectivité})$$

Variation de  $f(k') = \left(\frac{k'}{1+k'}\right) \left(\frac{1 - t_{eo}/t^*}{1 + (t_{eo}/t^*) k'}\right)$   
 en fonction de  $k'$  et du rapport  $t_{eo}/t^*$



# Pseudo-phases utilisées en MEKC

---

## Micelles anioniques

alkylsulfates, alkylsulfonates (C<sub>10</sub>-C<sub>16</sub>)  
sels biliaires (cholate, taurocholate)  
N-dodecanoyl-acide aminé

## Micelles cationiques

alkyltriméthylammonium (C<sub>10</sub>-C<sub>16</sub>)

## Micelles mixtes

octylglucoside - borate  
SDS - N-dodecanoyl-acide aminé  
SDS-Brij 35  
octyltriméthylammonium-dodécyltriméthylammonium

## Micelles polymérisées

poly(N-undécylényl-L-valinate)

## Polymères ioniques

copolymères butylacrylate-butylméthacrylate-acide  
méthacrylique  
copolymère butylméthacrylate-méthacryloyloxyéthyl-  
triméthylammonium

## Microémulsions

tampon aqueux (86,6-91,1%)-SDS (6-1,5 %)-1-butanol  
(6,6 %) heptane, hexane, cyclohexane ou diéthyloxy  
(0,8 %) (p/p)

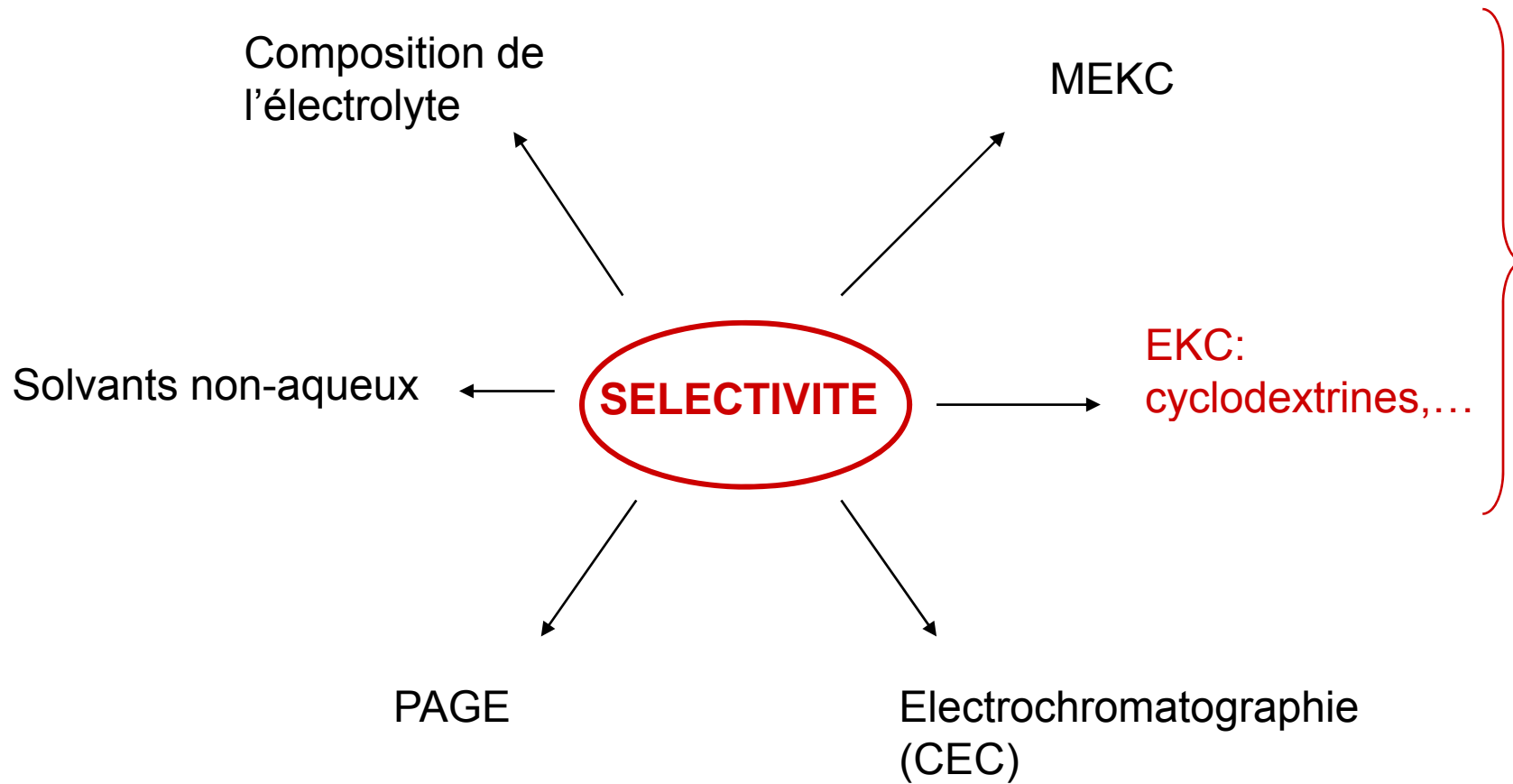
## Cyclodextrines ionisées

## Dendrimères

polyamidoamines

# AMELIORER LA SELECTIVITE

---



# Séparations chirales (densité de charge identique)

---

- = technique séparative qui allie des phénomènes de type :
- électroosmose
  - électrophorèse



Principe reposant sur la reconnaissance chirale



Mécanismes engendrés par l'ajout dans l'électrolyte d'un sélecteur chiral



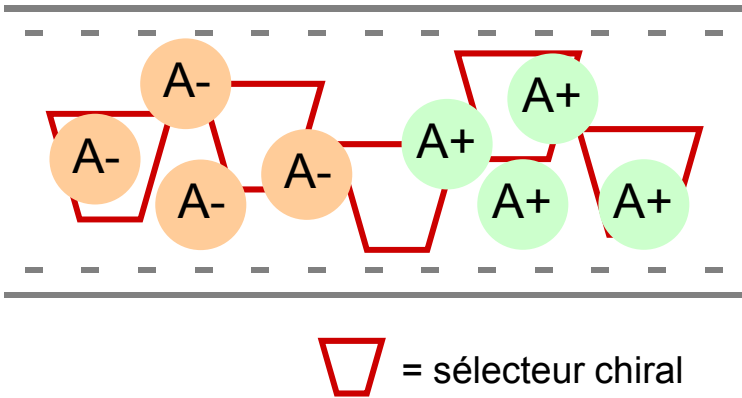
Pas de développement instrumental différent



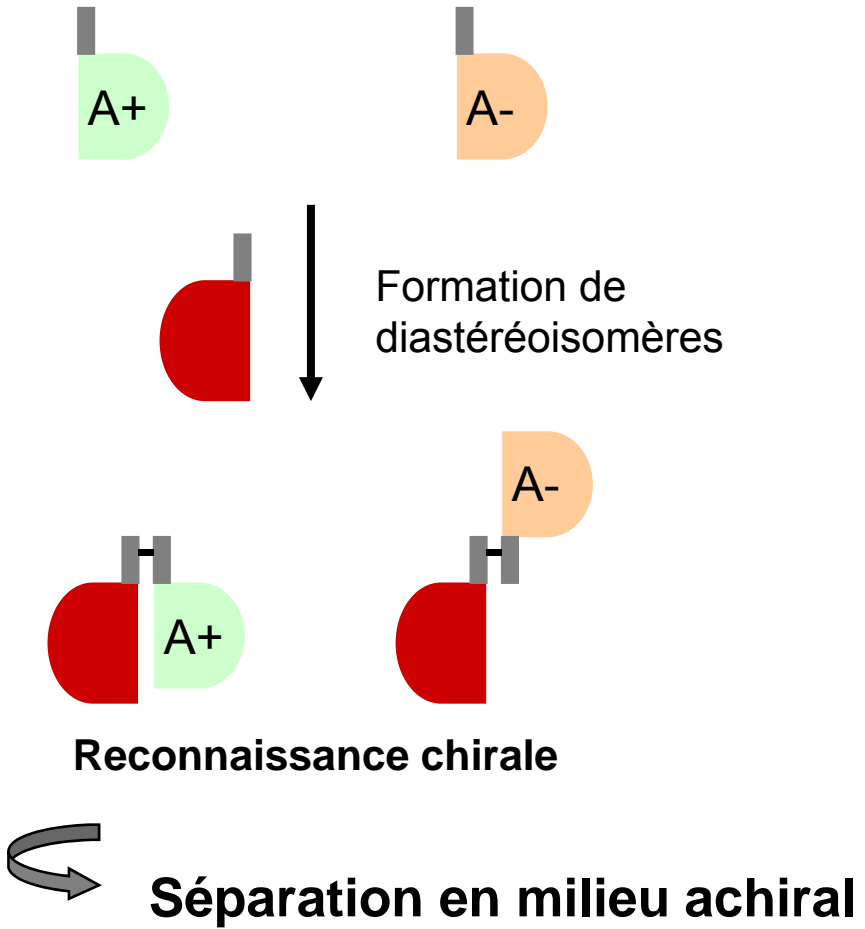
Séparation des énantiomères

# Séparations chirales (densité de charge identique)

## Séparation directe



## Séparation indirecte



# Sélecteurs chiraux

---

## ***Complexation de type inclusion***

- ✓  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -cyclodextrines
- ✓ éthers-couronnes
- ✓ antibiotiques macrocycliques

## ***Complexation de type chélation***

- ✓  $\alpha$ -hydroxy ou  $\alpha$ -aminoacides et métaux (Cu)

## ***Association avec des polymères chiraux***

- ✓ maltodextrines
- ✓ héparine, dextrans sulfonatés

## ***Partage dans des micelles***

- ✓ acides biliaires
- ✓  $\alpha$ -hydroxy ou  $\alpha$ -aminoacides à chaîne alkyle

## ***Formation de paires d'ions***

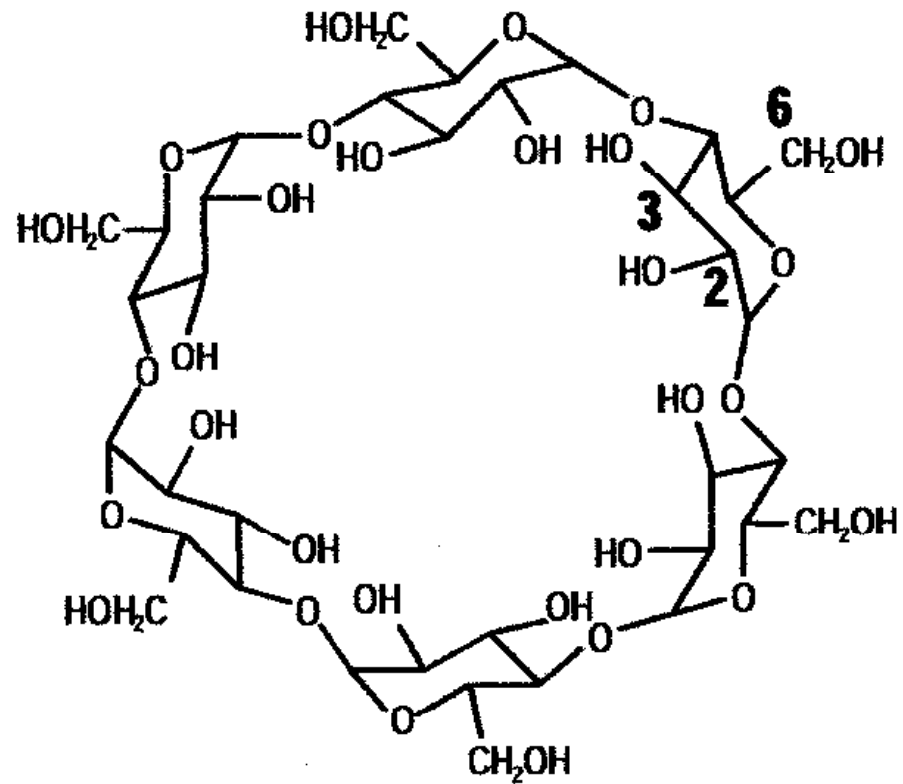
- ✓ camphrosulfonates
- ✓ quinine et ses dérivés

## ***Interaction par affinité***

- ✓ protéines

# Les cyclodextrines

---



$\alpha$  -CD



# Caractéristiques des cyclodextrines

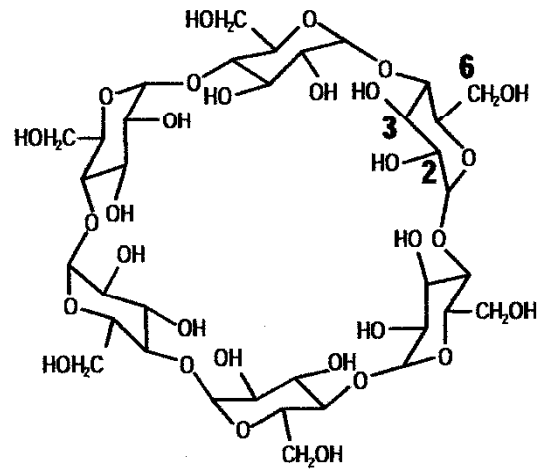
---

Cyclodextrine	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
nombre d'unités glucose	6	7	8
poids moléculaire	972.9	1135.0	1297.2
diamètre interne de la cavité/nm	0.47–0.52	0.62–0.64	0.75–0.83
diamètre/nm	1.46	1.54	1.75
hauteur de la cavité/nm	0.79–0.80	0.79–0.80	0.79–0.80
solubilité dans l'eau à 25°C	140mM	16mM	140mM



dans 4M urée : 89mM

dans 8M urée : 226mM

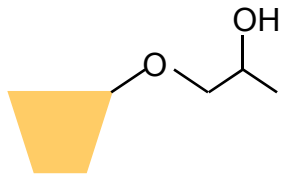


$\alpha$  -CD

Il existe de nombreuses cyclodextrines modifiées :

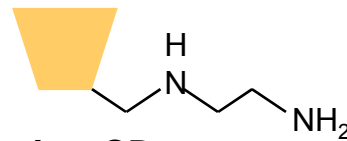
→ réaction avec les OH en positions 2,3 et 6

neutres



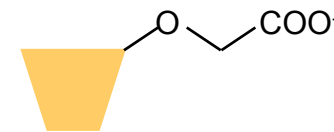
Hydroxy-CD

chargées positivement



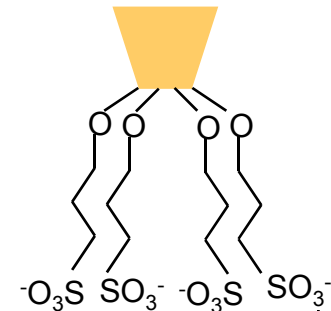
Amino-CD

chargées négativement



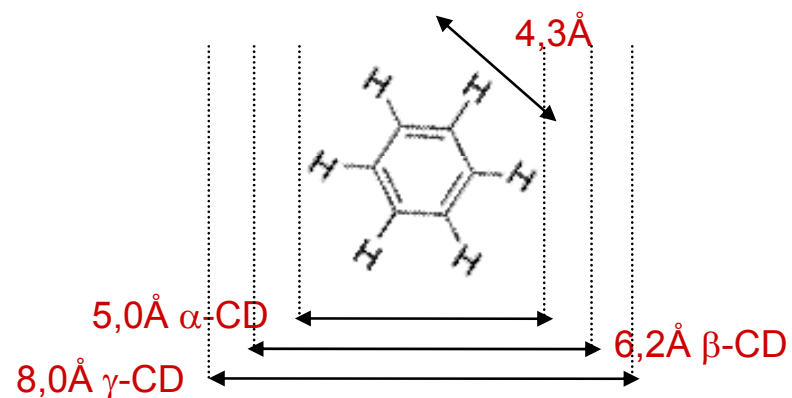
Carboxy-CD

Sulfonato-CD

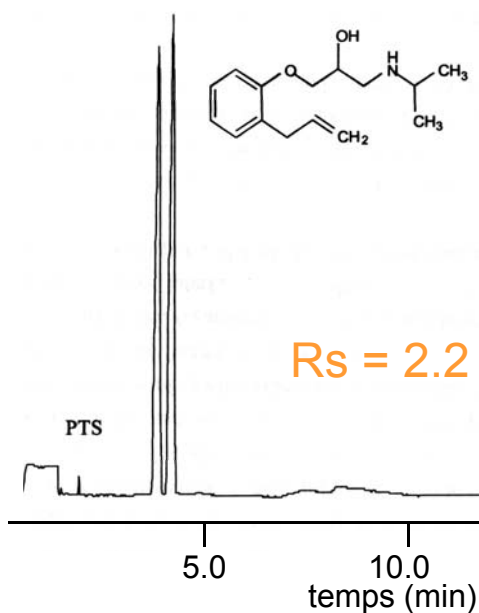


Permettent la séparation de composés neutres

# Sélecteur chiral :

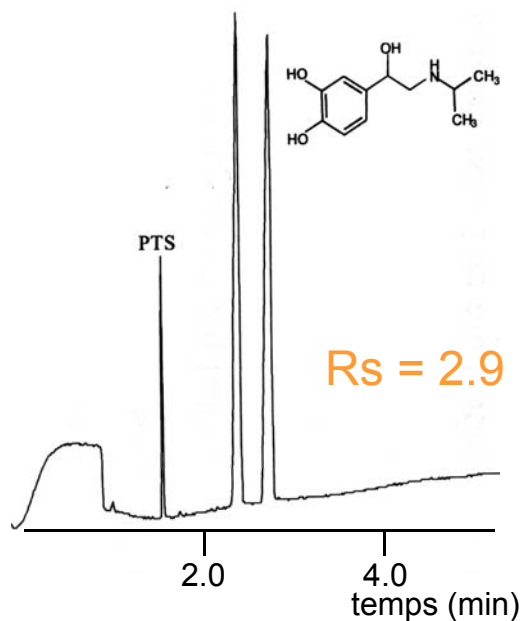


HS- $\alpha$ -CD



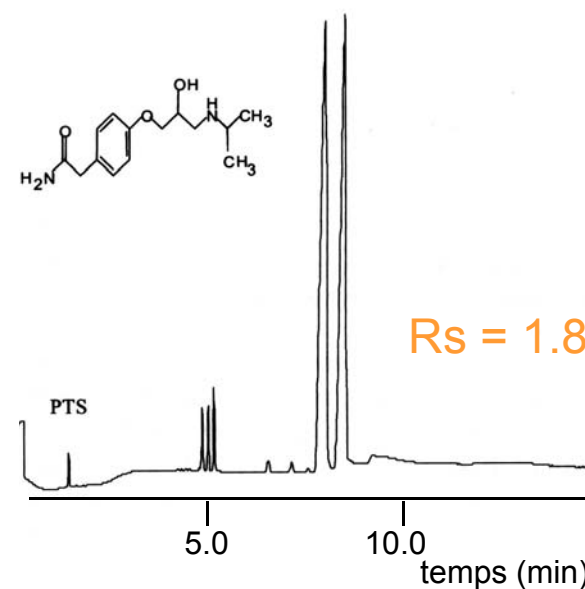
alprenolol

HS- $\beta$ -CD



isoproterenol

HS- $\gamma$ -CD



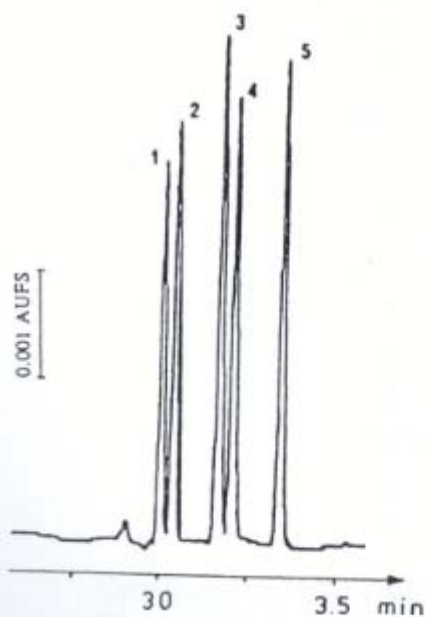
atenolol

Capillaire 50  $\mu$ m i. d. x 31.5 cm - séparation sous -15 kV, T = 22°C  
5%HS- $\gamma$ -CD dans 25mM phosphate de tétraéthylammonium, pH 2.5

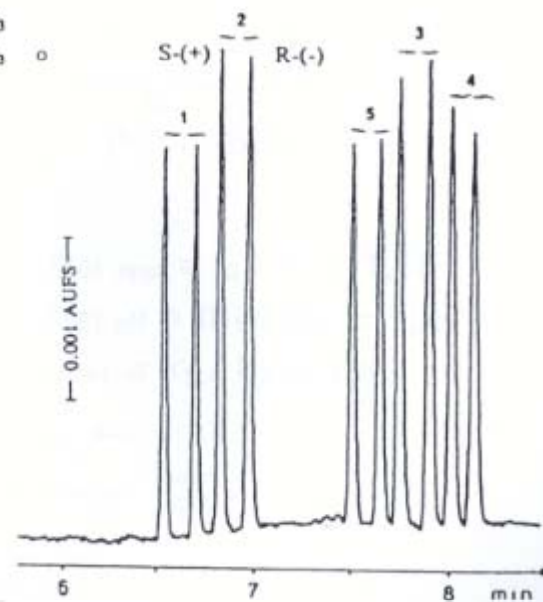
## Sélecteur chiral :

### ACHIRAL AND CHIRAL SEPARATIONS OF DIMETHINDENE AND METABOLITES

Substance	No.	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
N-demethyl-dimethindene	1	H	H	.
dimethindene	2	H	CH <sub>3</sub>	.
N-demethyl-6-methoxy-dimethindene	3	OCH <sub>3</sub>	H	.
6-methoxy-dimethindene	4	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	.
dimethindene-N-oxide	5	H	CH <sub>3</sub>	o



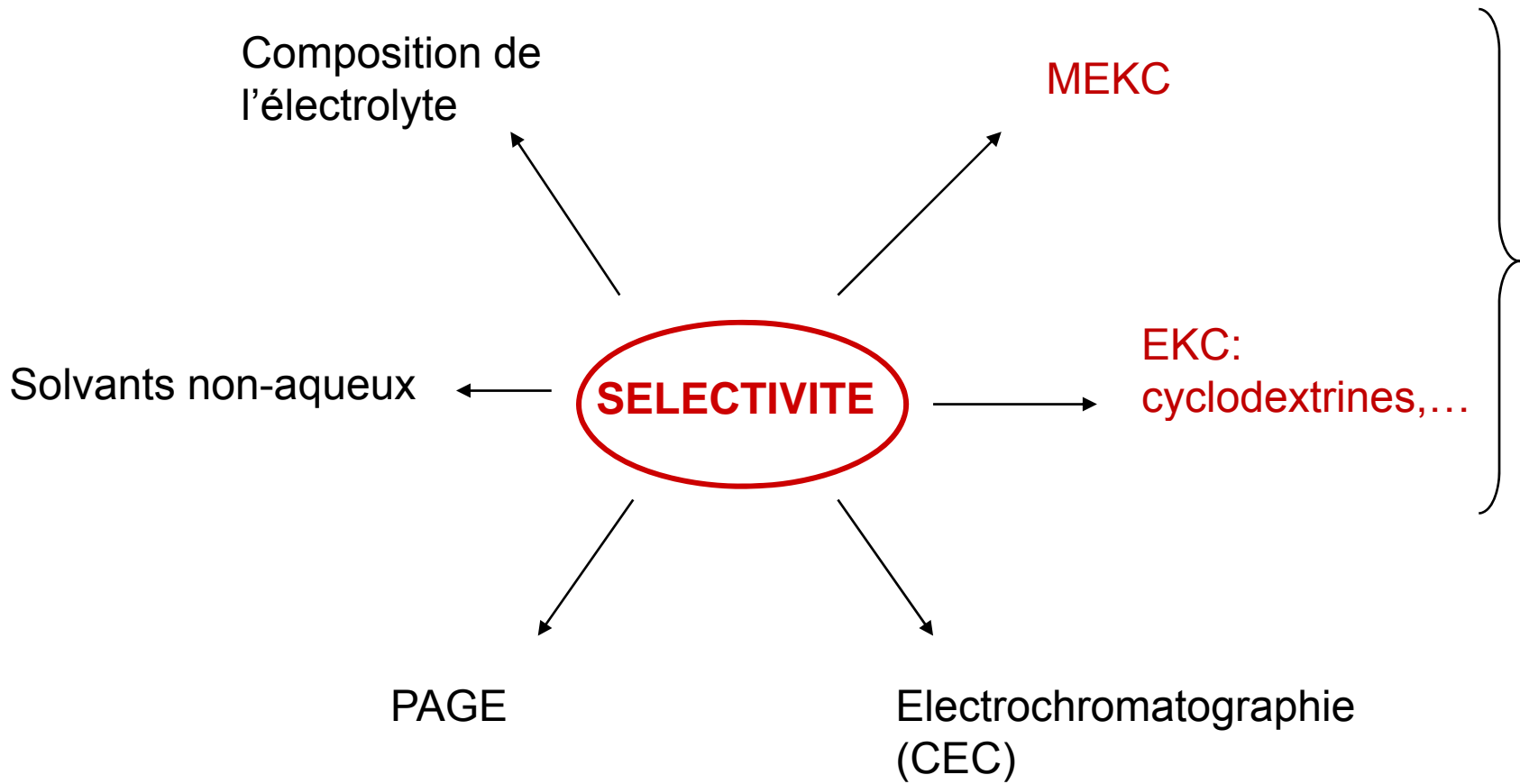
Fused silica capillary, 40 cm x 50 μm i.d.  
 50 mM phosphate buffer, pH 3.2  
 500 V/cm (98 μA), UV detection at 205 nm  
 Racemic sample concentration, 60 μg/mL



Fused silica capillary, 40 cm x 50 μm i.d.  
 50 mM phosphate buffer, pH 3.3, 30 mM HP-β-CD  
 400 V/cm (42 μA), UV detection at 205 nm  
 Racemic sample concentration, 60 μg/mL

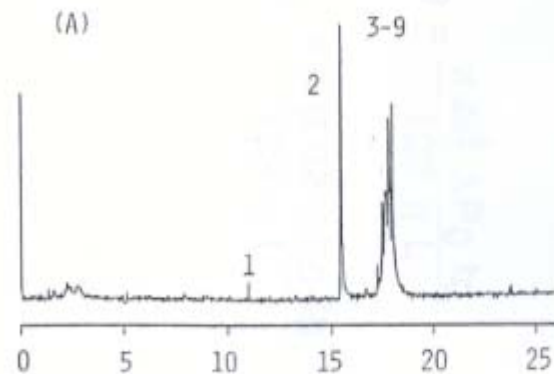
# AMELIORER LA SELECTIVITE

---

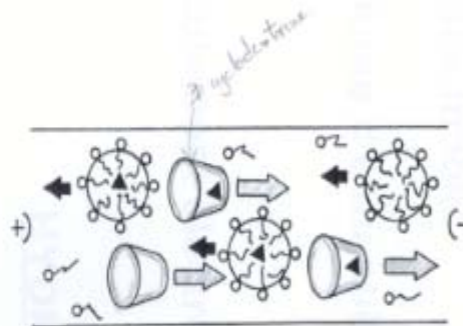


# Influence des cyclodextrines en MEKC

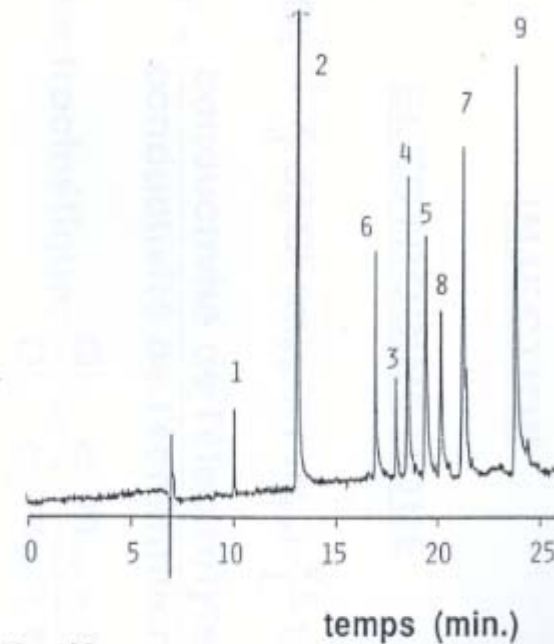
SANS  
β-CYCLODEXTRINE



PRINCIPE



AVEC  
β-CYCLODEXTRINE 30 mM.  
+ urée 4 M.

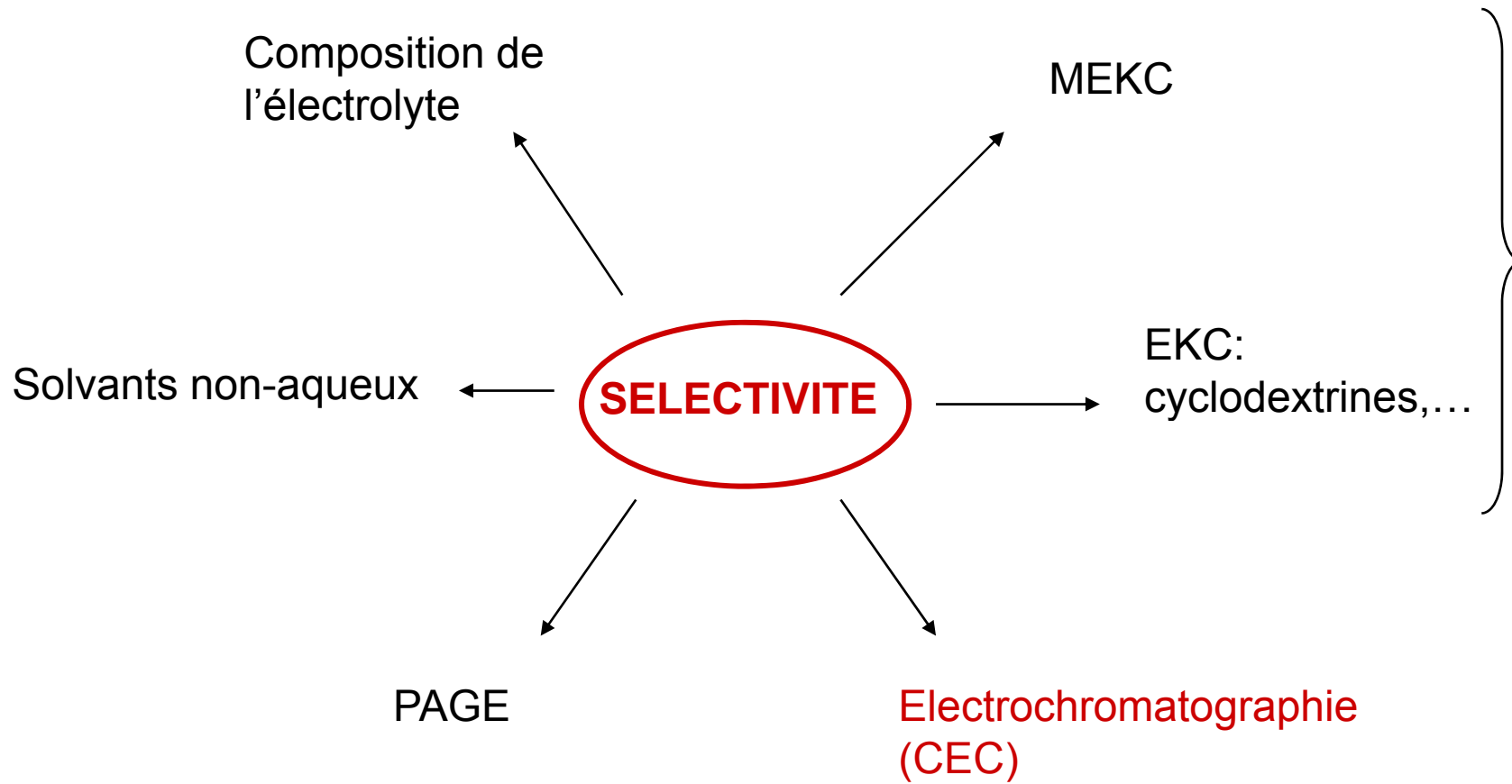


Capillaire : silice vierge, 50 μm d. i. x 50 cm  
 Electrolyte : tampon phosphate 20 mM. - borate 20 mM., pH 9 + SDS 50 mM.  
 Tension appliquée : + 20 kV. Détection UV 220 nm  
 Identification :

1 toluène	4 fluorène	7 phénanthrène
2 naphtalène	5 xanthène	8 trans-stilbène
3 9-fluorenone	6 dibenzyle	9 fluoranthène

# AMELIORER LA SELECTIVITE

---



# L'électrochromatographie

---

= technique séparative qui allie des phénomènes de type :

- électroosmose
- électrophorèse
- chromatographie



Partage phase mobile/ phase stationnaire du soluté



Mécanismes engendrés par la présence d'une phase stationnaire dans le capillaire



Pas de développement instrumental différent, mais modification du capillaire



Séparation des molécules neutres



# L'électrochromatographie

---

## INTERET

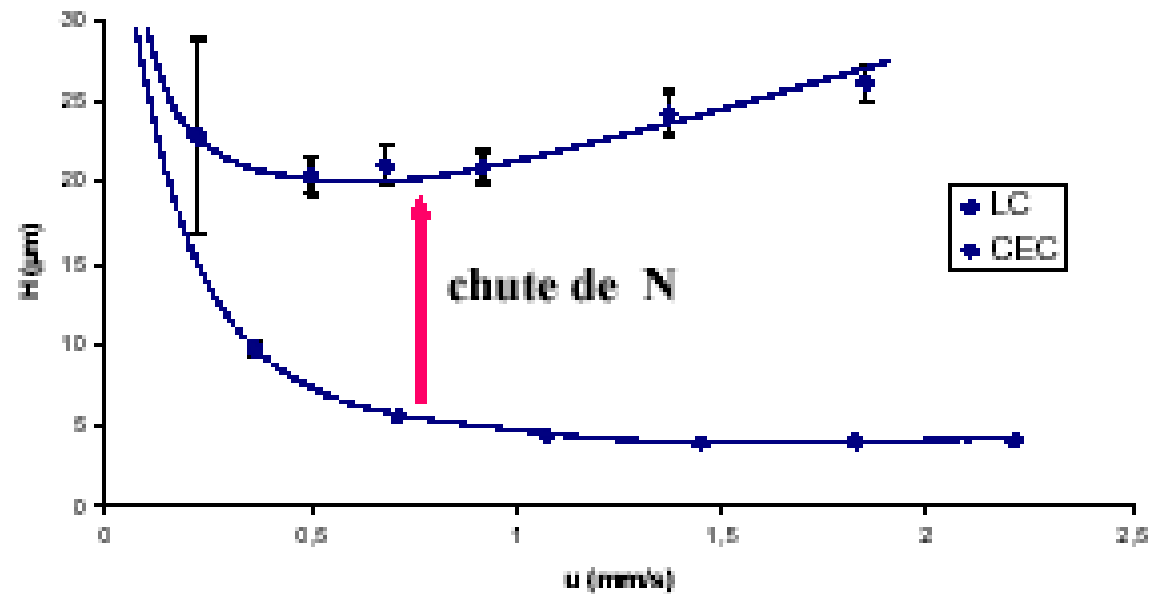
- Sélectivité
- Capacité d'injection
- Très faible dispersion en phase mobile
- Très faible (absence de) perte de charge
- Utilisation de très fines particules
- Faible dispersion en phase stationnaire
- Très grande efficacité  $h < 2$  pour  $d_p < 5 \mu\text{m}$   
 $N > 100\ 000 / \text{m}$
- Couplage avec la spectrométrie de masse

## INCONVENIENTS

- Fabrication des colonnes
- Fragilité des colonnes
- Difficulté de contrôle du débit de la phase mobile
- Contraintes de composition de la phase mobile
- Difficultés de réalisation d'un gradient d'élution
- Temps d'analyse assez élevés

## Comparaison LC/CEC

---



*Monolithe butyl. Phase mobile, tampon phosphate 5 mM pH 6,8 – acétonitrile (2/8). Composé, naphthalène.*

# L'électrochromatographie

---

## HPLC

Rétention

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

$t_R$  : temps de rétention du soluté

$t_0$  : temps d'élution d'un soluté **non-retenu**

## CEC

$$k_{CEC} = \frac{t_m - t_{eof}}{t_{eof}}$$

$t_m$  : temps de migration du soluté

$t_0$  : temps de migration d'un soluté **neutre et non-retenu**

$$k_{CEC} \left\{ \begin{array}{l} \text{Facteur de rétention: } k_C = \frac{t_m(1 + \kappa_e) - t_{eof}}{t_{eof}} \\ \text{Facteur de vélocité } \kappa_e = \frac{\mu_{ep}}{\mu_{eo, rempli}} \end{array} \right.$$

obtenue par expérience  
en CE dans les mêmes  
conditions d'électrolyte

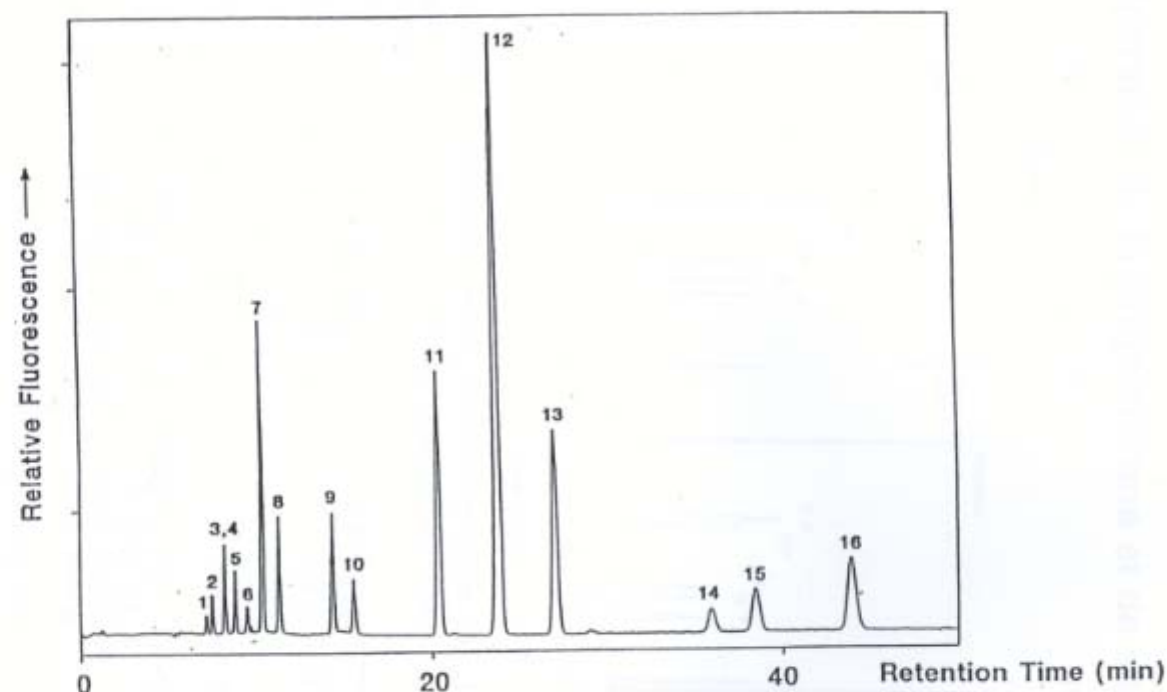
## Comparaison HPLC/ CE :

---

	HPLC	CE
Volumes de colonne classiques	4 mL	2 $\mu$ L
Volumes d'injection classiques	1-10 $\mu$ L	1-10 nL
Limites de détection	$10^{-7}$ - $10^{-8}$ M	$10^{-5}$ - $10^{-6}$ M

# L'électrochromatographie

## ELECTROCHROMATOGRAPHIE colonne capillaire remplie



Colonne : silice vierge, 75  $\mu\text{m}$  d.i. x 33 cm (partie remplie)

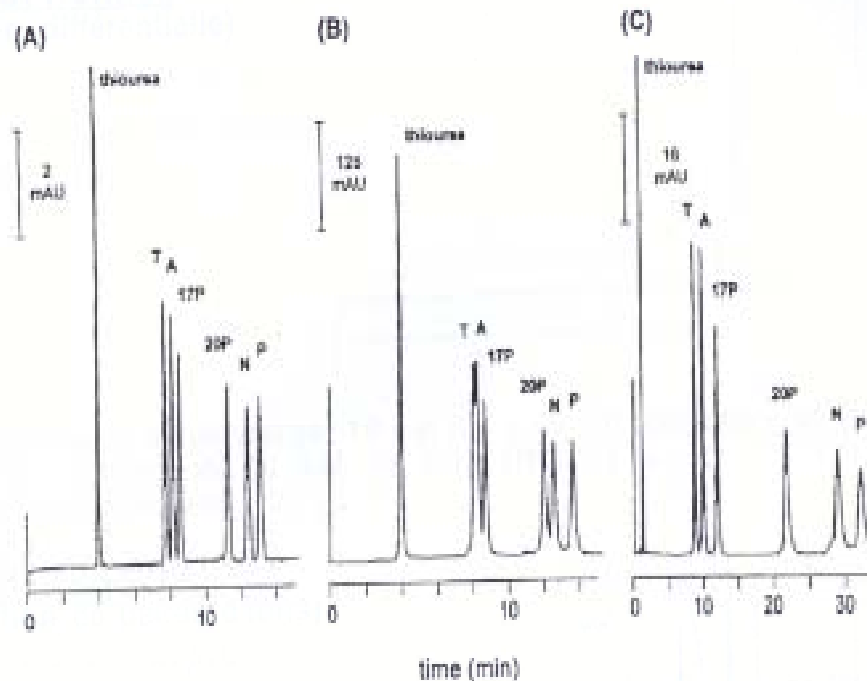
Phase stationnaire : silice C18, 3  $\mu\text{m}$ . Phase mobile : ACN / NaBO<sub>2</sub> 4 mM (80 : 20) (v/v)

Tension appliquée : 15 kV. Détection : fluorescence laser, 257 / 400 nm. Injection électrocinétique : 5 kV, 5 s. Identification : 1 : naphthalène ; 2 : acénaphtylène ; 3 : acénaphène ; 4 : fluorène ; 5 : phénanthrène ; 6 : anthracène ; 7 : fluoranthène ; 8 : pyrène ; 9 : benz[a]anthracène ; 10 : chrysène ; 11 : benzo[b]fluoranthène ; 12 : benzo[k]fluoranthène ; 13 : benzo[a]pyrène ; 14 : dibenz[a,h]anthracène ; 15 : benzo[ghi]pérylène ; 16 : indéno[1,2,3-cd]pyrène

C. Yan et al., 1995

# Comparaison HPLC et CEC

## Séparation de la progestérone et de ses métabolites



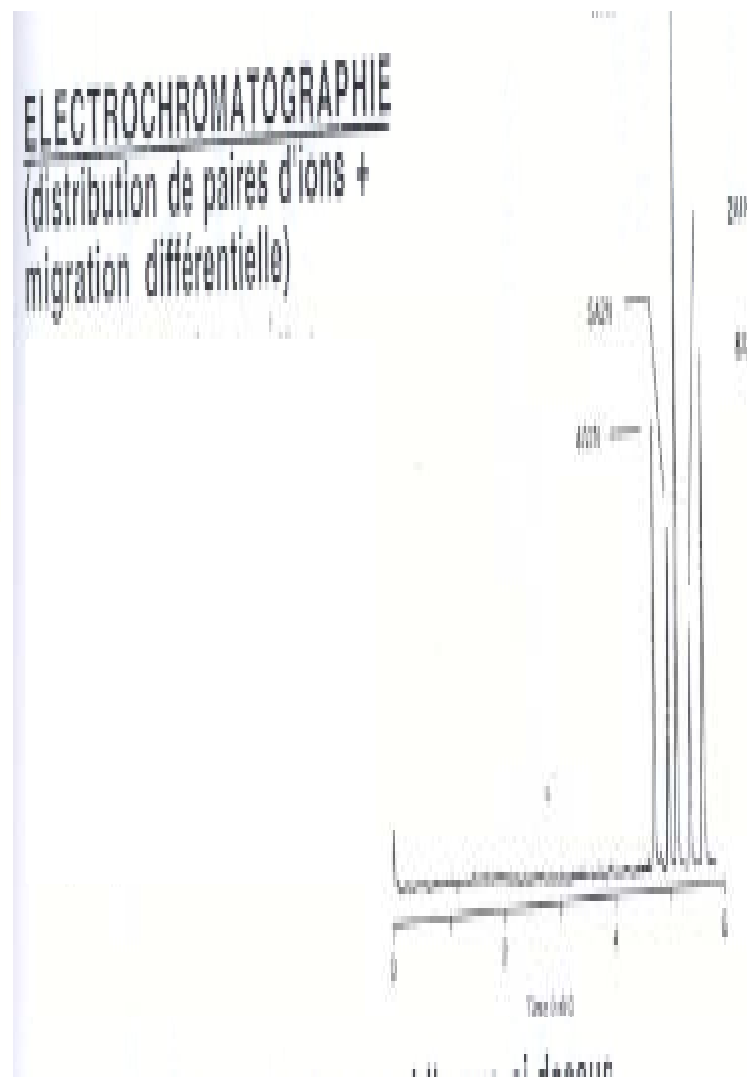
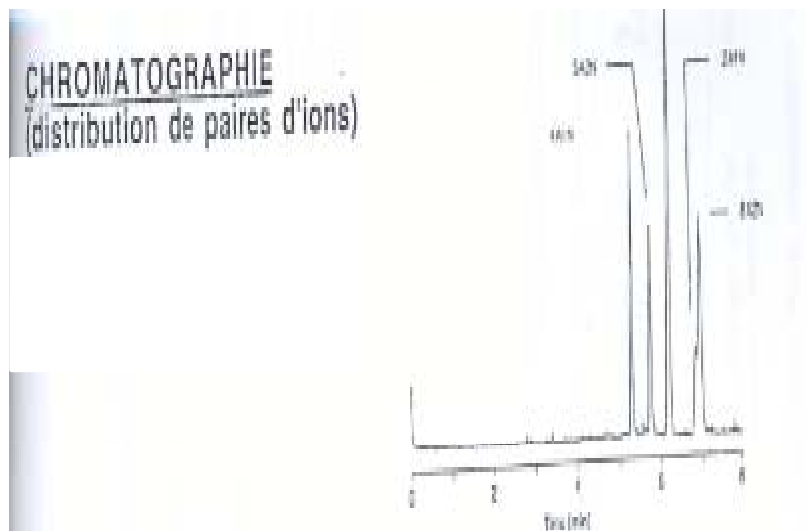
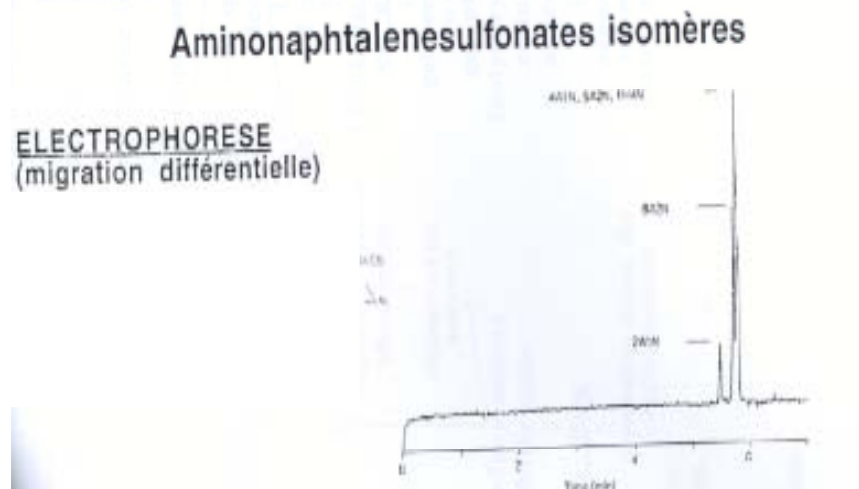
Identification : testostérone (T), androstènedione (A), 17 $\alpha$ -hydroxyprogèstèrone (17P), 20 $\alpha$ -hydroxyprogèstèrone (20P), noréthindrone (N), progèstèrone (P)

	CEC (A)	LC (B)	LC (C)
Colonne	0,1 mm d.i. x 20 cm (total. 35 cm)	4,6 mm d.i. x 20 cm	
Phase stationnaire	Hypersil ODS 3 $\mu$ m		
Phase mobile	ACN/MeOH/Tris-HCl 20 mM (37,5:37,5:25), pH 8	ACN/MeOH/Tris-HCl 20 mM, pH 8 (37,5:37,5:25)	ACN/MeOH/Tris-HCl 20 mM, pH 8 (30:20:50)
Vitesse linéaire	0,83 mm.s <sup>-1</sup>	0,83 mm.s <sup>-1</sup>	2,9 mm.s <sup>-1</sup>
Débit	0,3 $\mu$ L.min <sup>-1</sup>	0,6 mL.min <sup>-1</sup>	2,1 mL.min <sup>-1</sup>
Volume injecté	25 nL (5 s sous 15 kV) 2 % du volume mort	20 $\mu$ L 0,8 % du volume mort	
Echantillon	20 $\mu$ g.mL <sup>-1</sup> dans la phase mobile		
Détection	240 nm, 0,02 UA	240 nm, 1,28 UA	240 nm, 0,16 UA

*voir exemple*

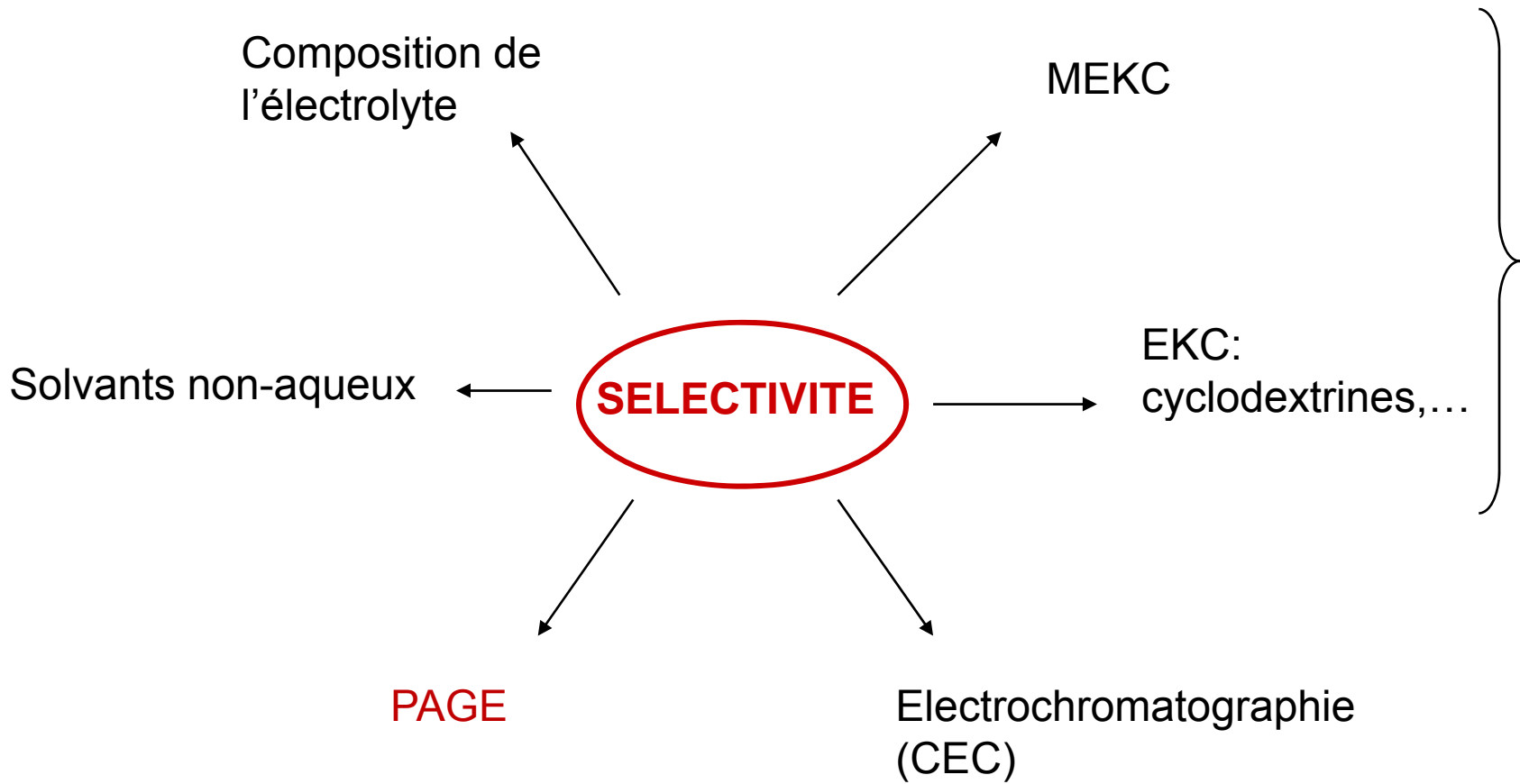
D. A. Stead et coll., 1998.

# Séparation en CEC de composés anioniques de mobilités voisines



# AMELIORER LA SELECTIVITE

---





# Electrophorèse en gel de polyacrylamide

---

= technique séparative qui allie des phénomènes de type :

- électroosmose
- électrophorèse



Principe reposant sur le « tamisage » de l'électrolyte à l'aide d'un polymère



Mécanismes engendrés par l'ajout dans l'électrolyte d'un polymère



Pas de développement instrumental différent



Séparation par exclusion stérique

# Electrophorèse en gel de polyacrylamide

---



Ajout d'un polymère dans l'électrolyte pour créer un tamis dont on peut contrôler les mailles



Séparation des composés qui ont une répartition uniforme de la charge

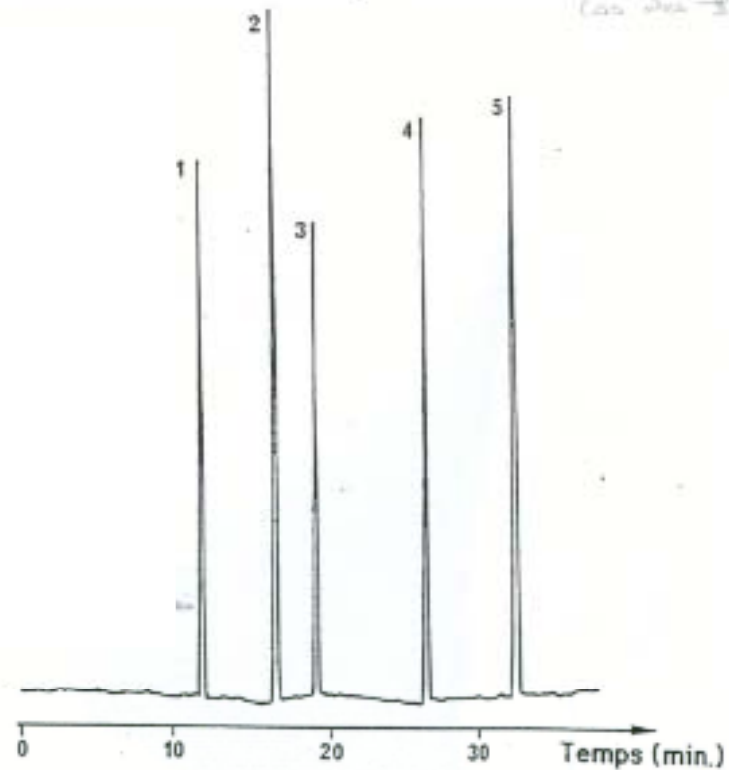


Séparation suivant la masse → gain en sélectivité

# Electrophorèse en gel de polyacrylamide

---

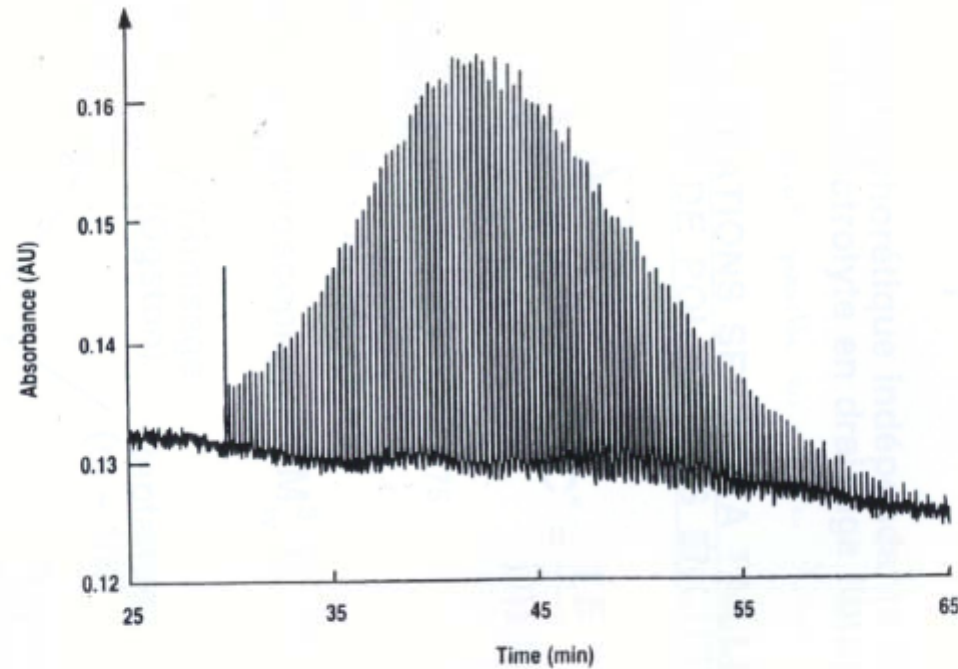
## SEPARATION DE LA MYOGLOBINE ET DE SES FRAGMENTS



Capillaire: 75  $\mu\text{m}$  d.i. x 20 cm; caractéristiques du gel: T=12,5%, C=3,3%.  
Electrolyte: tampon TRIS-phosphate 0,1 M., pH 6,9, SDS 3,5 mM. (0,1%),  
urée 8 M. V = -8 kV (I = 34  $\mu\text{A}$ ). Détection UV.  
Identification: 1: fragment III (PM=2510); 2: fragment II (PM=6210); 3:  
fragment I (PM=8160); 4: fragments I et II (PM=14400); 5: myoglobine  
(PM=17000)

# Electrophorèse en gel de polyacrylamide

## SEPARATION DE POLYNUCLEOTIDES.



**Capillaire :**  $\mu$ PAGE-5, 75  $\mu$ m d.i. x 75 cm (détection, 50 cm), rempli de gel de polyacrylamide, 5% T, 5% C  
**Electrolyte :** tampon Tris-borate 100 mM., pH 8,3 + urée 7 M.  
**Tension appliquée :** 18 kV. **Détection** UV 260 nm  
**Echantillon :** acide polydéoxyadénylique pd(A), 20-150 bases.

(K. A. Turner, 1991)

# Caractéristique des gels permanents et non permanents

---

## CAPILLAIRES REMPLIS DE GELS PERMANENTS DE POLYACRYLAMIDES RETICULES

- Préparation délicate
- Hétérogénéités
- Contraintes d' utilisation  
( électrolyte, stockage )
- Faible durée de vie
- Coût élevé
- Absorbance UV
- Excellente résolution des  
fragments d' ADN légers et lourds

## CAPILLAIRES REMPLIS DE SOLUTIONS DE POLYMERES HYDROPHILES NON-CHARGES ( CELLULOSES, AGAROSES )

- Préparation simple
- Grande homogénéité
- Souplesse d' utilisation
- Renouvellement aisé
- Faible coût
- Transparence UV
- Bonne résolution des fragments légers d' ADN

# Plan du cours

---

## 1. La migration en électrophorèse capillaire

1.1 Mobilité électrophorétique

1.2 Phénomène d'électroosmose

## 2. La séparation en électrophorèse capillaire

2.1 Efficacité

2.2 Résolution

## 3. L'amélioration de la sélectivité

## 4. L'analyse quantitative

4.1 Injection

4.2 Détection

4.3 Mesure des surfaces de pics

## 5. La Focalisation isoélectrique (CIEF)

# INJECTION

---

Modes d'injection les plus courants : par injection directe dans le capillaire

- injection hydrodynamique
- injection électrocinétique

La quantité d'échantillon injectée  $Q$  est définie comme suit :

$$Q = l \cdot \pi r^2 \cdot C$$

avec  $l$ , la longueur de la zone échantillon  
 $r$ , le rayon du capillaire  
 $C$ , la concentration du soluté

# Injection hydrodynamique

---

par siphonnage ou gravité,

réalisé en plaçant une extrémité du capillaire dans la solution-échantillon et en plaçant celle-ci à une hauteur supérieure à l'autre extrémité.

La longueur  $l$  du segment injecté est proportionnelle :

au temps d'injection  $t_{inj}$ ,

à la vitesse hydrodynamique  $v_{hd}$ , définie par la loi de Poiseuille

$$v_{hd} = \frac{\rho \cdot g \cdot r^2 \cdot \Delta h}{8\eta \cdot L}$$

$$Q_{inj} = \frac{\rho \cdot g \cdot \pi r^4 \cdot \Delta h \cdot C \cdot t_{inj}}{8\eta \cdot L}$$



# Injection hydrodynamique

---

par différence de pression,

réalisé en appliquant aux extrémités du capillaire une différence de pression  $\Delta P_0$

La longueur  $l$  du segment injecté est proportionnelle :  
au temps d'injection  $t_{inj}$ ,

Le volume d'échantillon injecté

$$V_{inj} = \frac{\pi r^4 \cdot \Delta P_0 \cdot t_{inj}}{8 \eta \cdot L}$$

# Injection électrocinétique

---

ou injection par électromigration

réalisée en plaçant une extrémité du capillaire dans la solution-échantillon et en appliquant une différence de potentiel.

$$I = t_{inj} (v_{eo} + v_{ep})$$

$$Q_{inj} = \frac{(\mu_{eo} + \mu_{ep})V.\pi r^2.C.t_{inj}}{L}$$

La mobilité électrophorétique intervenant dans l'équation, la **quantité injectée sera différente** pour tous les composés du mélange.

L'équation n'est valable que si la **conductivité de l'échantillon et celle du tampon sont identiques**.

Ce mode d'injection est particulièrement utile en **électrophorèse capillaire sur gel**.

# Plan du cours

---

## 1. La migration en électrophorèse capillaire

1.1 Mobilité électrophorétique

1.2 Phénomène d'électroosmose

## 2. La séparation en électrophorèse capillaire

2.1 Efficacité

2.2 Résolution

## 3. L'amélioration de la sélectivité

## 4. L'analyse quantitative

4.1 Injection

4.2 Détection

4.3 Mesure des surfaces de pics

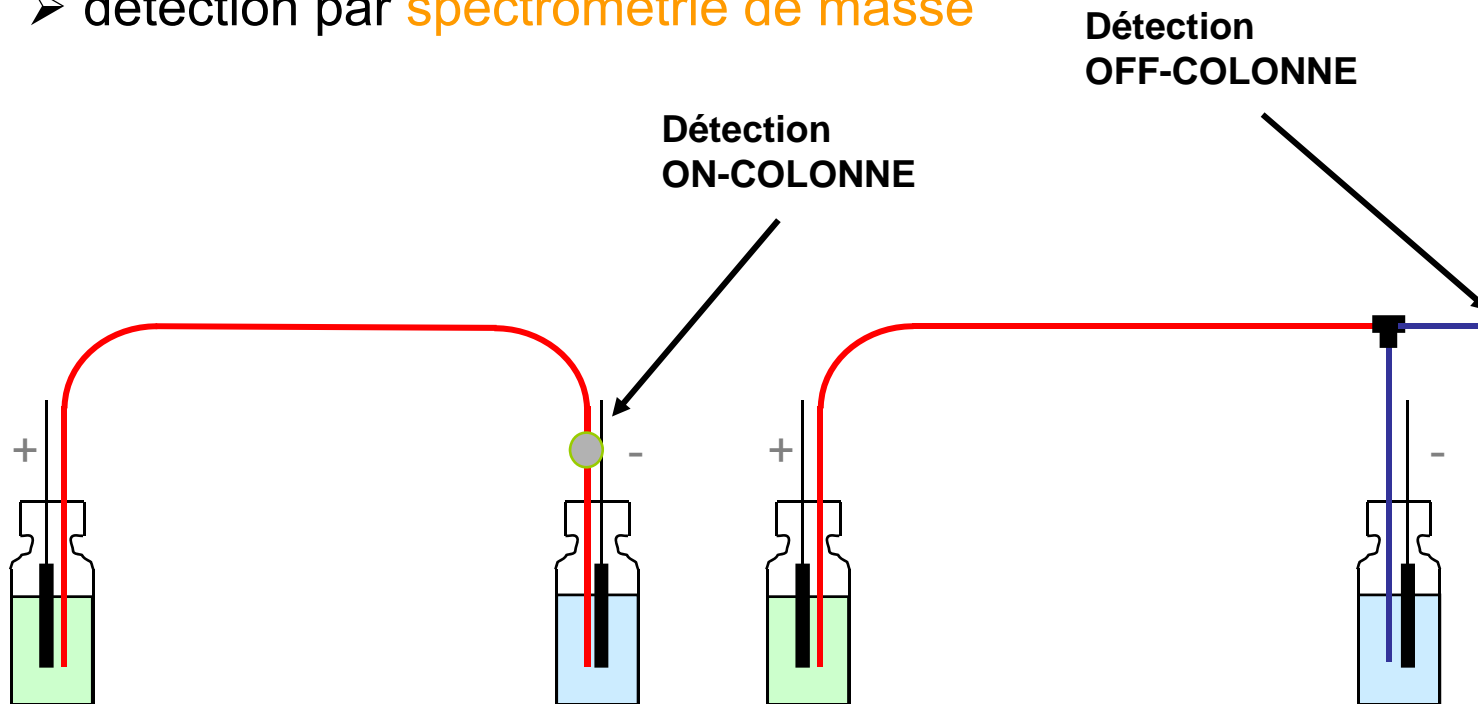
## 5. La Focalisation isoélectrique (CIEF)

# DETECTION

---

## LES PLUS COURANTS:

- détection **UV**
- détection par **fluorescence**
- détection par **spectrométrie de masse**



# ON-COLONNE : MODE DIRECT

---

## Détection directement sur le capillaire, à proximité d'une des extrémités

↘ opérée à travers une fenêtre réalisée par enlèvement de la gaine protectrice du capillaire.

### ➤ Détection UV

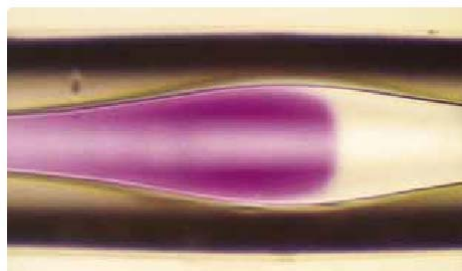
↘ nécessite l'utilisation de capillaires transparents jusqu'à 170nm si possible

équipe la plupart de appareils commerciaux

❖ sensibilité limitée à cause de la faible capacité de chargement des capillaires et de leur faible diamètre :  $\sim 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$

ex : phénol, LOD = 67 fmol

❖ développement de capillaires à bulle, en Z pour augmenter le trajet optique



# ON-COLONNE : MODE DIRECT

---

## Détection directement sur le capillaire, à proximité d'une des extrémités

↘ opérée à travers une fenêtre réalisée par enlèvement de la gaine protectrice du capillaire.

### ➤ Détection par fluorescence

↘ généralement bien adaptée aux capillaires de silice fondue qui présentent une faible luminescence

généralement réalisée par dérivatisation préalable des solutés :

❖ dérivés dansyl/fluorescein-thiocarbamyl des acides aminés

❖ fluorescamine pour les acides aminés, les peptides

ex :  $\alpha$ -chymotrypsinogène, LOD = 2 fmol

domaine dynamique linéaire :  $10^{-3}$  -  $10^{-7}$  M

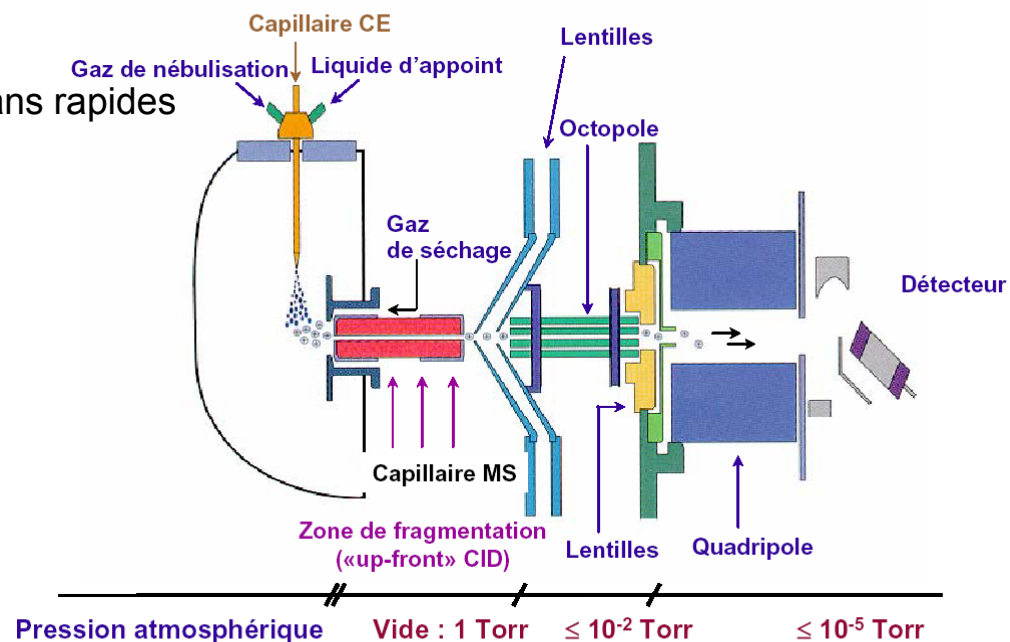
CE-LIF commercialisée avec un laser argon à 488nm

# OFF-COLONNE

## ➤ Détection par spectrométrie de masse

### 👉 nécessite de concevoir une interface adaptée

- ⊙ assurer le maintien du champ électrique
- ⊙ diminuer les effets d'aspiration
- ⊙ utiliser des analyseurs permettant des scans rapides



Interface basée sur le mode ESI/MS

appliquée aux sels d'ammonium, amines, dipeptides

ex : pour les ions simples, LOD = 10 amol

Méthode	LDD (mol)	LDD (M)	Avantages/ inconvénients
UV- Vis	$10^{-13}$ - $10^{-16}$	$10^{-5}$ - $10^{-8}$	Universel Possibilité d'information spectrale
Fluorescence	$10^{-15}$ - $10^{-17}$	$10^{-7}$ - $10^{-9}$	Sensible Requiert souvent une dérivatisation
Fluorescence induite par laser	$10^{-18}$ - $10^{-20}$	$10^{-14}$ - $10^{-16}$	Extrêmement sensible Requiert souvent une dérivatisation Cher
Ampérométrie	$10^{-18}$ - $10^{-19}$	$10^{-10}$ - $10^{-11}$	Sensible Sélective mais seulement pour analytes électroactifs Requiert une électronique spéciale et des modifications du capillaire
Conductivité	$10^{-15}$ - $10^{-16}$	$10^{-7}$ - $10^{-8}$	Universel Requiert une électronique spéciale et des modifications du capillaire
Spectrométrie de masse	$10^{-16}$ - $10^{-17}$	$10^{-8}$ - $10^{-9}$	Sensible Informations structurales
Détection indirecte (UV, fluorescence, ampérométrie)	10 - 100 moins qu'en direct		Universel Plus faible sensibilité qu'en direct



# Optimisation de la sensibilité

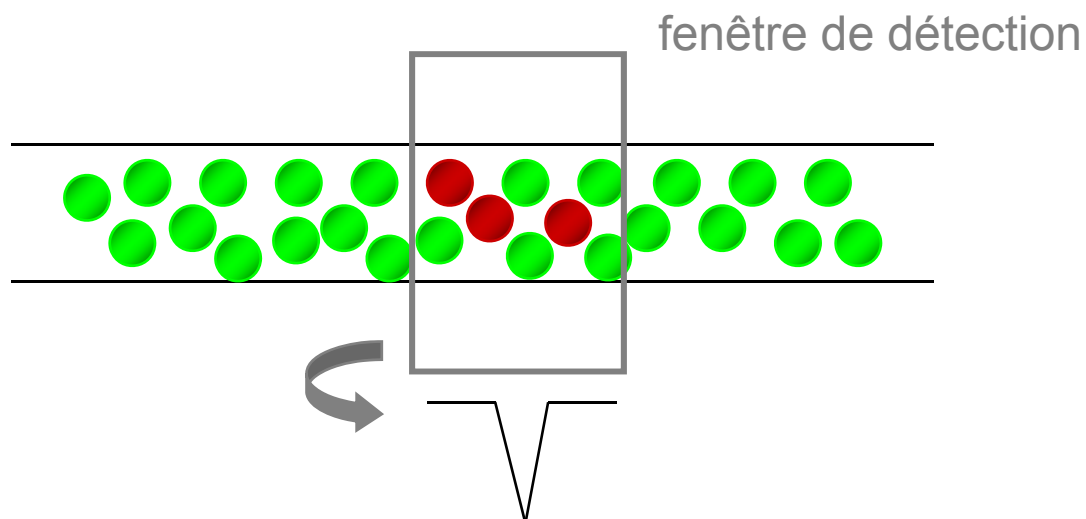
---

1. Détection par absorbance indirecte
2. Préconcentration en ligne avant séparation
3. Isotachophorèse (ITP)

# ON-COLONNE : MODE INDIRECT

---

Déplacement d'une substance ionique (co-ion) du tampon par l'ion à analyser



**Co-ion :**

**Charge:** de même signe que les analytes

**Mobilité:** voisine de celle des analytes

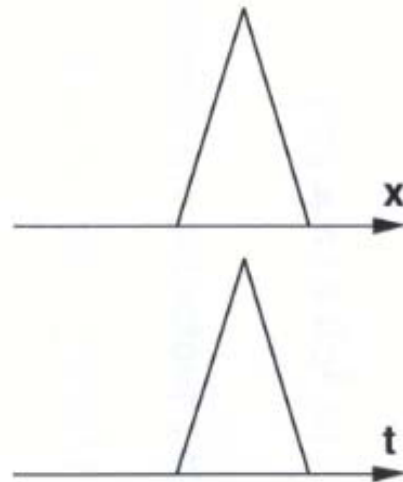
**Absorbance:** forte

**Concentration:** ne doit pas induire une absorbance hors du domaine de linéarité du détecteur

## INFLUENCE DE LA MOBILITE DU CO-ION SUR L'EFFICACITE DISPERSION ELECTROCINETIQUE

$$m_i = m_A$$

électrolyte co-ion  
Profil symétrique  
indépendant de la  
quantité injectée



i : soluté  
A : co-ion de l'électrolyte

# ON-COLONNE : MODE INDIRECT

---

## Détection UV indirecte des cations

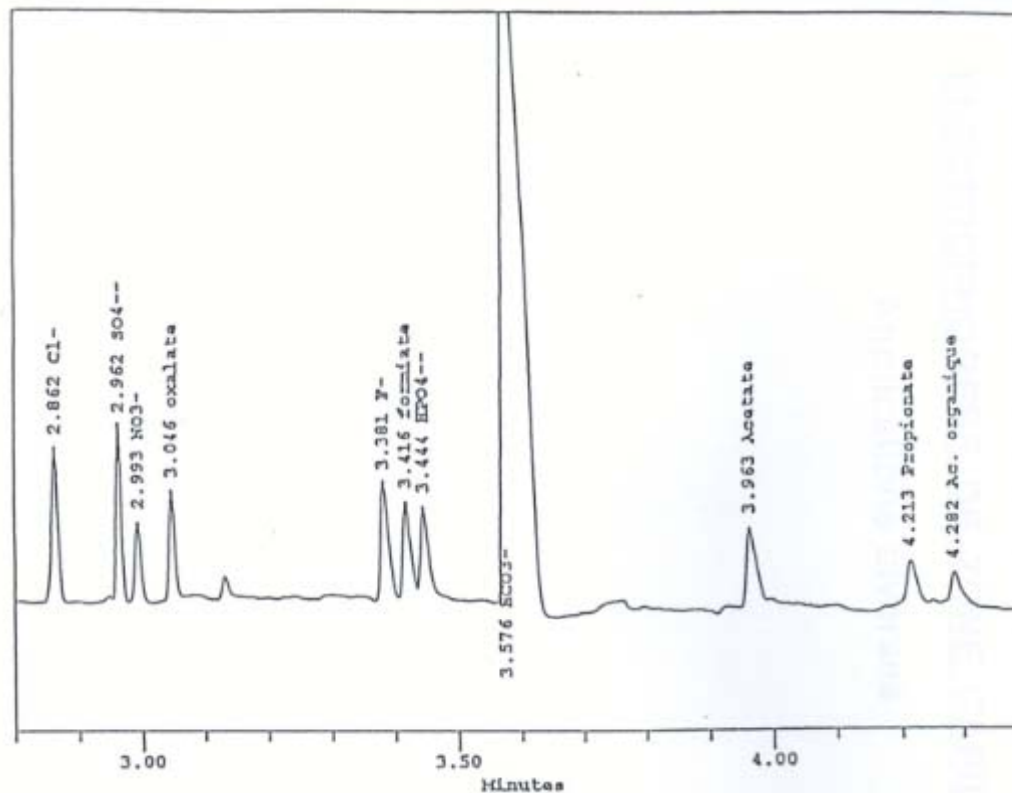
chromophore	pK <sub>A</sub>	m <sub>ep</sub> (10 <sup>-5</sup> cm <sup>2</sup> /V.s)	ε <sub>214</sub> (L/mol.cm)
Imidazole	7,15	52	5000
Pyridine	5,25	51	1800
Créatinine	4,83	37,2	9200
Éphédrine	9,54	30	7000
Naphtyl-1-amine	3,92	17	50000

## Détection UV indirecte des anions

chromophore	m <sub>ep</sub> (10 <sup>-5</sup> cm <sup>2</sup> /V.s)	λ (nm)	ε <sub>214</sub> (L/mol.cm)
Chromate	-56,7	254	5000
Pyromellitate	-52,8	214	23900
Sorbate	-33,3 (à pH6)	253	25000
Phtalate	-41,2	196	37160
Benzoate	-26,7	194	44480

# ON-COLONNE : MODE INDIRECT

## ANALYSE DE TRACES D'ANIONS ORGANIQUES ET INORGANIQUES



	ppb
chlorure:	3,5
sulfate:	4,8
nitrate:	6,2
oxalate:	5,0
fluorure:	1,9
formiate:	5,0
phosphate:	3,2
acétate:	5,0
propionate:	5,0

Capillaire en silice vierge, 75  $\mu\text{m}$  x 60 cm (détection, 52 cm)  
Electrolyte: chromate de sodium 10 mM, modificateur de flux, pH 8  
Tension appliquée: - 20 kV. Détection UV indirecte, 254 nm  
Injection électrocinétique (5 kV, 45 s)  
Echantillon additionné d'octanesulfonate 75  $\mu\text{M}$

G. Bondoux, 1995.

## Préconcentration en ligne avant séparation électrocinétique

---

### ESPECES NEUTRES HYDROPHOBES

- **Extraction en phase solide**
  - (capillaires remplis, capillaires non-remplis)
  - Elution hydrodynamique ou électro-osmotique
  - Séparation sous forme ionisée par électrophorèse de zone
- **Amplification du champ électrique**
  - En milieu de faible conductivité
  - Séparation sous forme neutre par chromatographie électrocinétique micellaire
- **Amplification inverse du champ électrique**
  - En milieu de forte conductivité
  - Séparation sous forme neutre par chromatographie électrocinétique micellaire

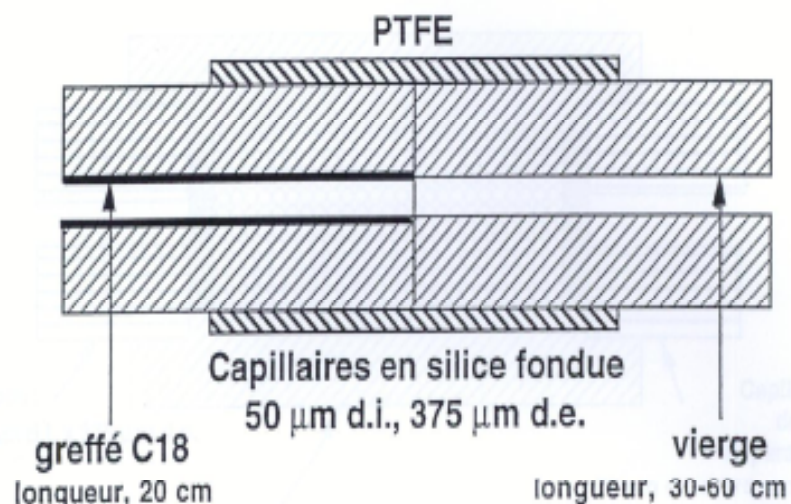
### ESPECES IONIQUES

- **Amplification du champ électrique**
  - En milieu de faible conductivité
  - Séparation par électrophorèse de zone
- **Isotachophorèse**
  - En milieu de conductivité moyenne ou élevée
  - Séparation par électrophorèse de zone

## Préconcentration en ligne : extraction phase solide

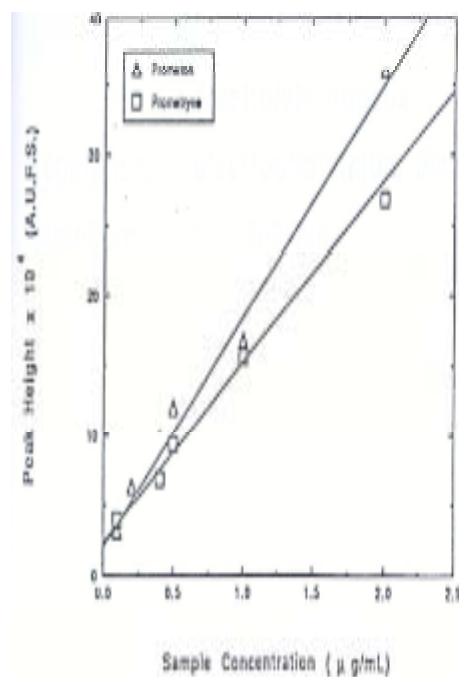
### PAROI INTERACTIVE HYDROPHOBE

Application aux herbicides



### PROTOCOLE

- Lavage :** acétonitrile, eau
- Injection :** hydrodynamique, échantillon dans eau ou électrolyte, volume introduit : 100-120 nL
- Lavage :** tampon phosphate 10 mM, pH 6
- Elution :** hydrodynamique, 50 % acétonitrile dans tampon phosphate 10 mM, pH 6
- Séparation :** électrophorétique, tampon phosphate, V = 15 kV
- détection :** UV 220 nm



→ facteur de  
préconcentration : 15-35

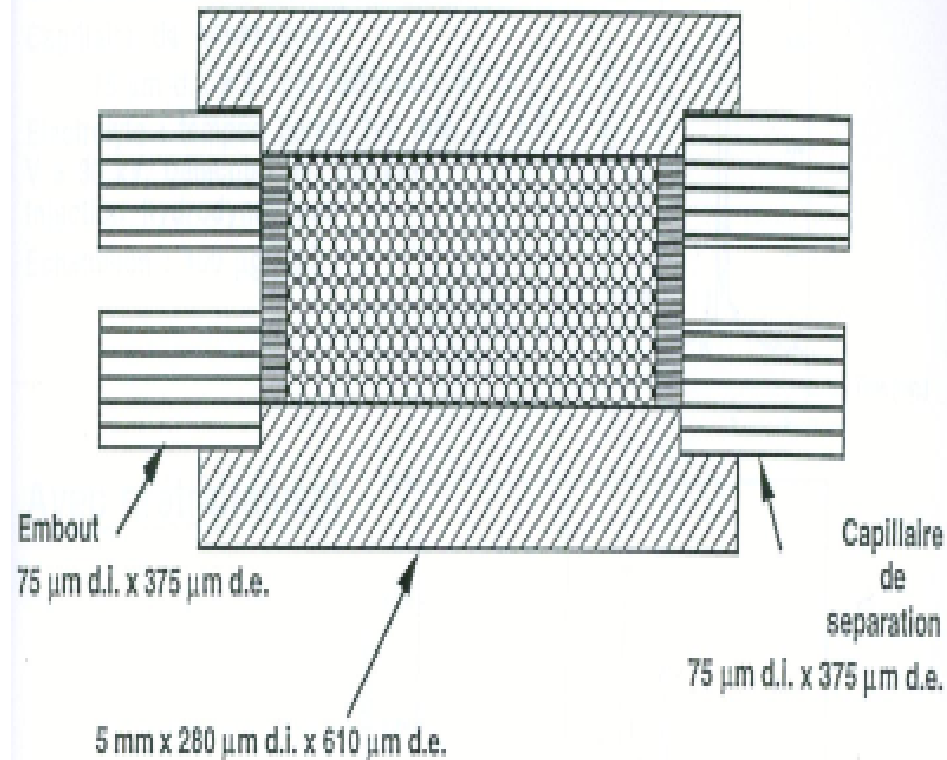
Z. El Rassi et coll., 1992.



## Préconcentration en ligne : extraction phase solide

### EXTRACTION EN PHASE SOLIDE APOLAIRE

#### Application aux protéines



### PROTOCOLE

- Lavage: acétonitrile, eau
- Injection: hydrodynamique, échantillon (milieu aqueux)
- Lavage: électrolyte aqueux
- Elution: hydrodynamique, 30-50 % acétonitrile dans électrolyte aqueux
- Séparation: électrophorétique, électrolyte aqueux
- détection: UV, 200 nm

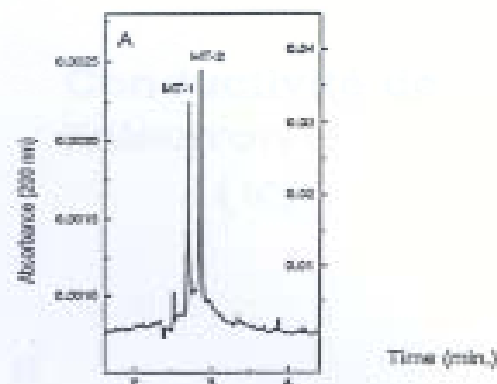
## Préconcentration en ligne : extraction phase solide, application

### SEPARATION DES ISOFORMES MT1 ET MT2 DE LA METALLOTHIONEINE

Extraction en phase solide apolaire en ligne

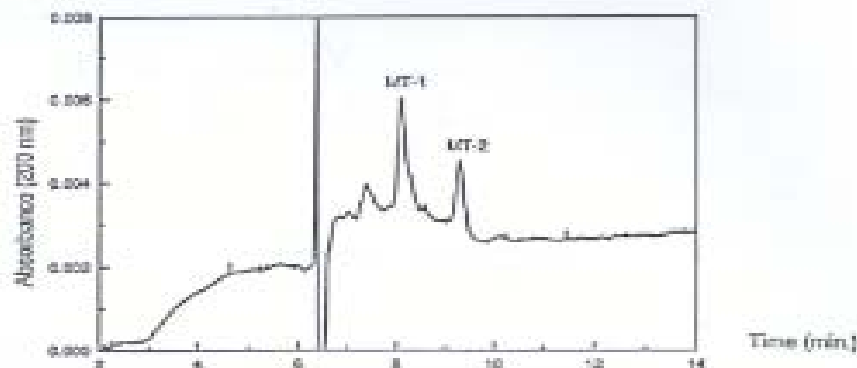
#### En absence de prétraitement

Capillaire de séparation,  
75  $\mu\text{m}$  d.i. x 57 cm (détection, 50 cm)  
Electrolyte : tampon borate 100 mM, pH 8,4  
V = 30 kV. Détection UV, 200 nm  
Injection hydrodynamique  
Echantillon : 100  $\mu\text{g}$  / mL



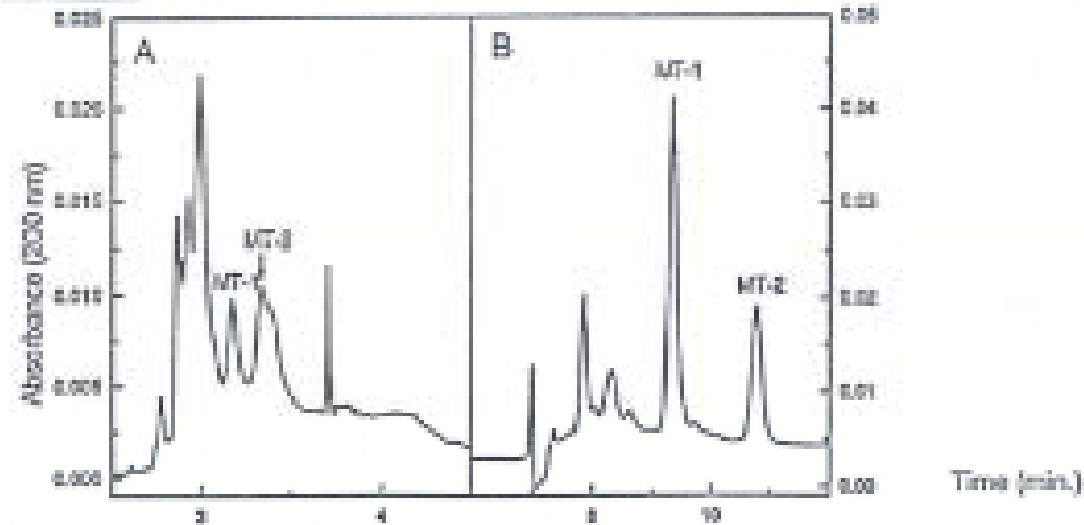
#### Avec prétraitement

Echantillon : 1  $\mu\text{g}$  / mL  
Injection hydrodynamique, 27  $\mu\text{L}$   
Elution : hydrodynamique, 33 % acétonitrile dans tampon phosphate 15 mM, pH 2,5. Séparation : tampon phosphate 30 mM, pH 7



## Préconcentration en ligne : extraction phase solide, application

Extrait de foie de mouton  
en absence de prétraitement                      avec prétraitement



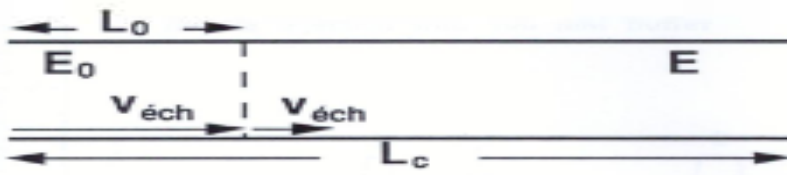
Injection hydrodynamique, 5,4  $\mu$ L ; élution et séparation : comme ci-dessus

J. H. Beattie, 1995.

## Préconcentration en ligne : amplification du champ électrique

Conductivité de la zone échantillon ( $\kappa_0$ ) < Conductivité de l'électrolyte ( $\kappa$ )

Champs électriques

$$E_0 > E$$
$$\Delta E = \frac{V}{L_0 + \frac{\kappa_0}{\kappa - \kappa_0} L_c}$$

$$\frac{E_0}{E} \sim \frac{\kappa}{\kappa_0}$$

**Limitations**

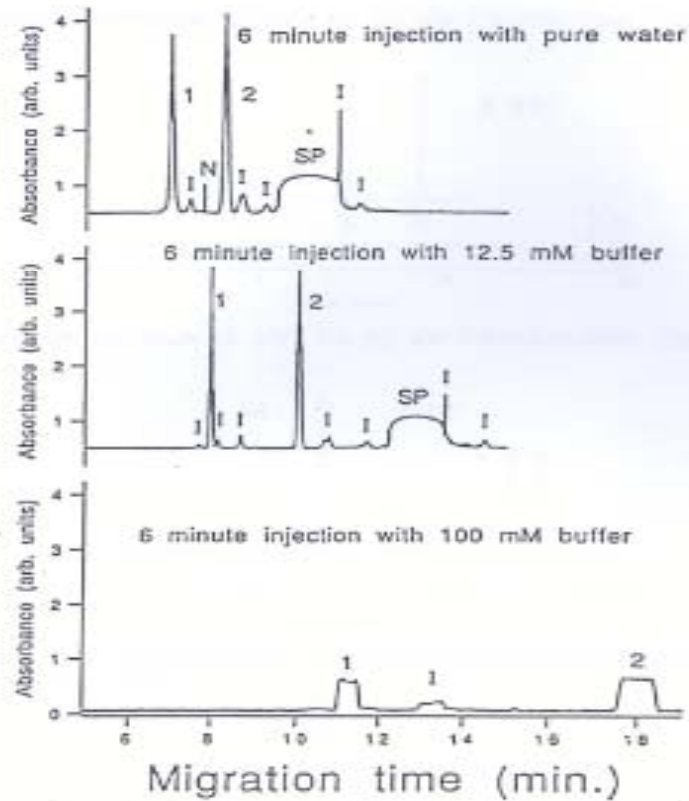
- Dispersion axiale (en présence d'électroosmose)
- Effet Joule

**Conditions optimales (injection hydrodynamique)**

- Tension faible
- $8 < \kappa / \kappa_0 < 10$
- Volume injecté : x 8 à 10

→ facteur de préconcentration: 8 à 10

## Préconcentration en ligne : amplification du champ électrique



Capillaire : 75  $\mu\text{m}$  d.i. x 100 cm (détection, 65 cm)

Electrolyte : tampon MES-His 100 mM, pH 6,1

$V = 30$  kV. Détection UV, 265 nm

Injection hydrodynamique par gravité ( $\Delta h = 15$  cm), volume ~ 100 nL

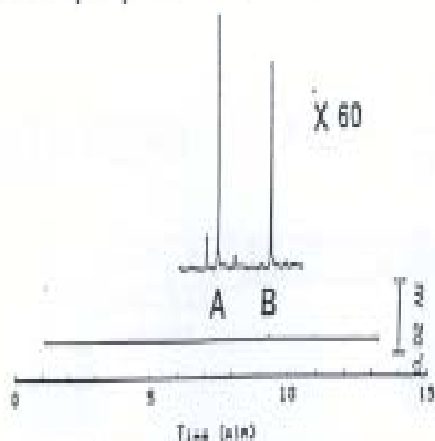
Echantillon : 1 : PTH-Arg  $3,6 \cdot 10^{-5}$  M ; 2 : PTH-His  $3,6 \cdot 10^{-5}$  M ;

I : impuretés ; SP : solvant échantillon

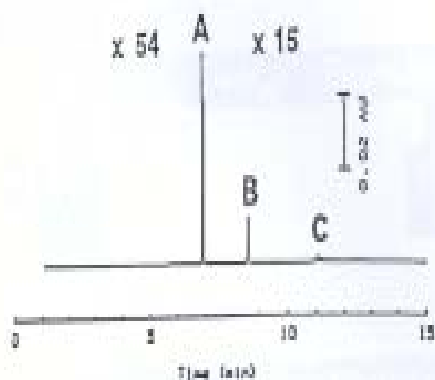
# Préconcentration en ligne : amplification du champ électrique

## Injection électrocinétique

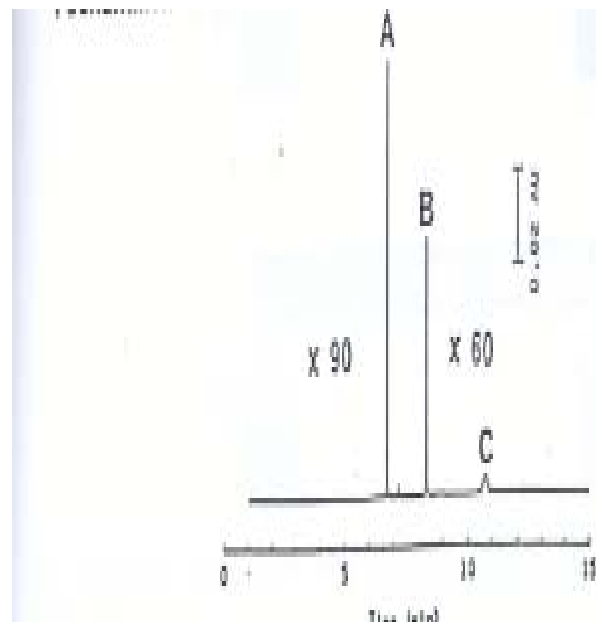
- Injection électrocinétique (5 kV, 10 s) de l'échantillon dans l'électrolyte



- Injection électrocinétique (5 kV, 10 s) de l'échantillon dans l'eau



- Injection d'eau par gravité puis Injection électrocinétique (5 kV, 10 s) de l'échantillon dans l'eau



Capillaire: silice vierge, 75  $\mu\text{m}$  d.l. x 100 cm (détection, 75 cm)

Electrolyte: tampon MES-HIS 100 mM, pH 6,2

Tension appliquée: + 30 kV ; détection UV 254 nm

Identification: A: PTH-Arg  $5 \cdot 10^{-5}$  M ; B: PTH-His  $5 \cdot 10^{-5}$  M ; C: marqueur neutre

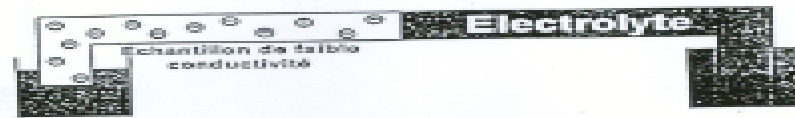
(R.-L. Chien et coll., 1991)

# PRECONCENTRATION EN LIGNE DE GRANDS VOLUMES PAR AMPLIFICATION DU CHAMP ELECTRIQUE

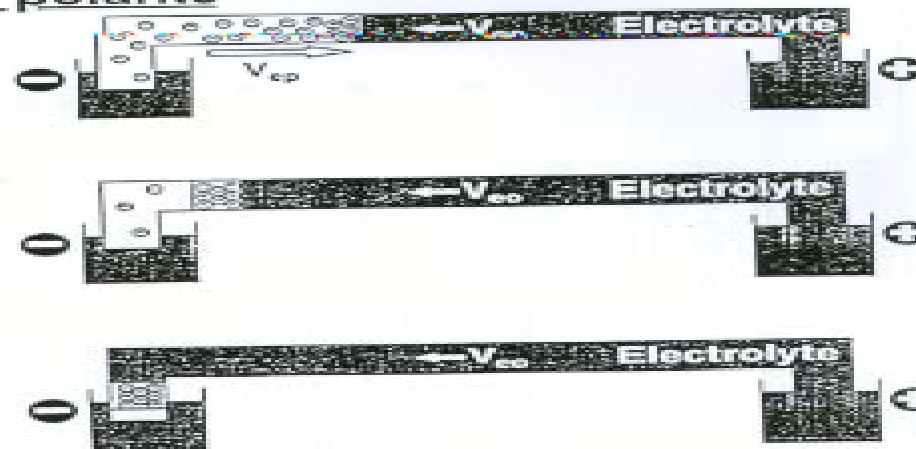
(solutés anioniques, capillaire en silice vierge)

Injection hydrodynamique

$$x_{\max} = - \frac{m_{ep_i}}{m_{eo} r(\gamma)}$$



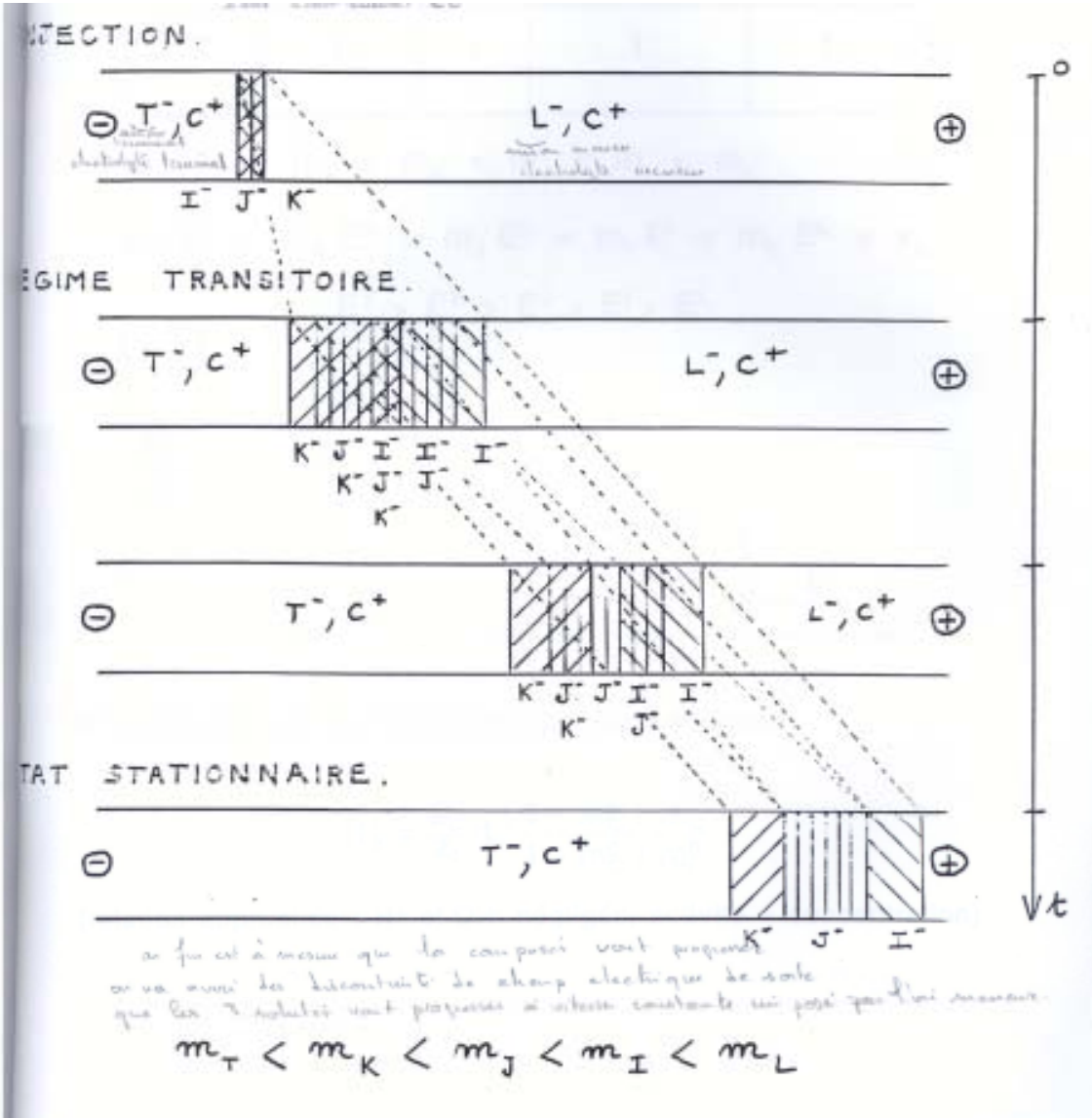
Elimination de la zone de faible conductivité par inversion de polarité



Séparation dans les conditions classiques



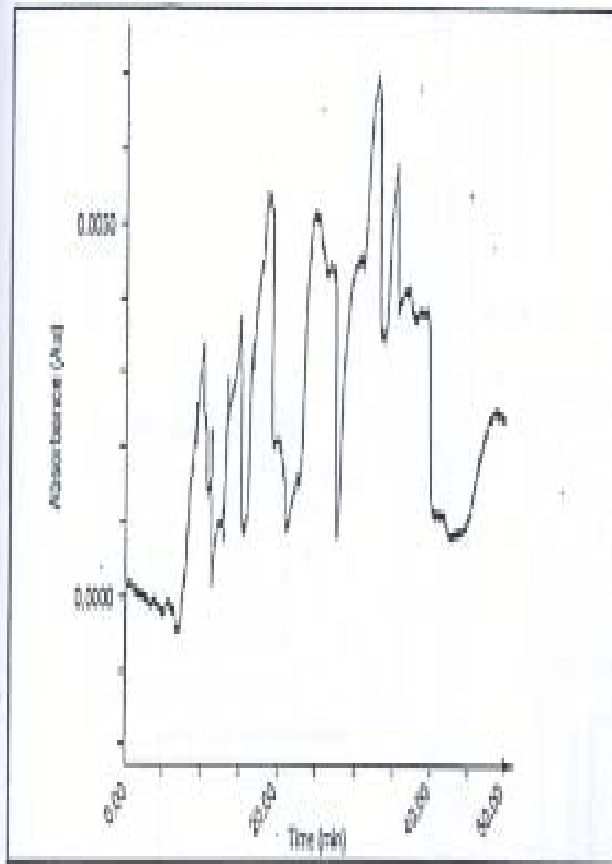
# L'Isotachophorèse (ITP)





# L'Isotachophorèse (ITP)

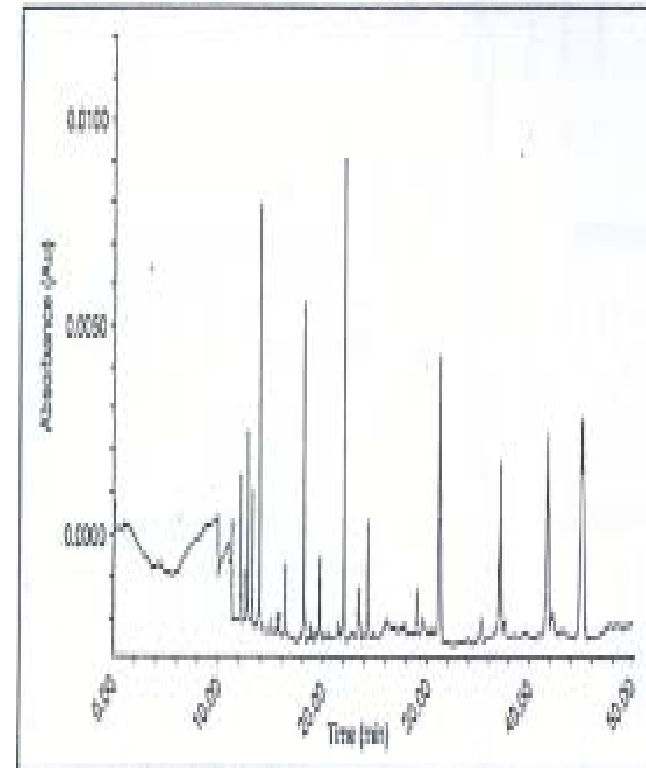
## Electrophorèse de zone



$V_0 = 0,5 \mu\text{L}$   
 $\alpha\text{-caséine } 5 \text{ pmol / L}$

Capillaire silice vierge, modifié PEG, 100  $\mu\text{m}$  d.i. x 60 cm (détection, 50 cm)  
Electrolyte: bétaïne 50 mM - acétate 50 mM, pH 3,3  
Tension appliquée: 20 kV ; détection UV 200 nm.

## Isotachophorèse - électrophorèse de zone



$V_0 = 0,5 \mu\text{L}$   
 $\alpha\text{-caséine } 15 \text{ pmol / L}$

ITP : LE : acétate d'ammonium 50 mM  
TE : bétaïne 50 mM - acétate 50 mM, pH 3,3  
EzC : électrolyte : bétaïne 50 mM - acétate 50 mM, pH 3,3

C. Schwer, 1993.

# Plan du cours

---

## 1. La migration en électrophorèse capillaire

1.1 Mobilité électrophorétique

1.2 Phénomène d'électroosmose

## 2. La séparation en électrophorèse capillaire

2.1 Efficacité

2.2 Résolution

## 3. L'amélioration de la sélectivité

## 4. L'analyse quantitative

4.1 Injection

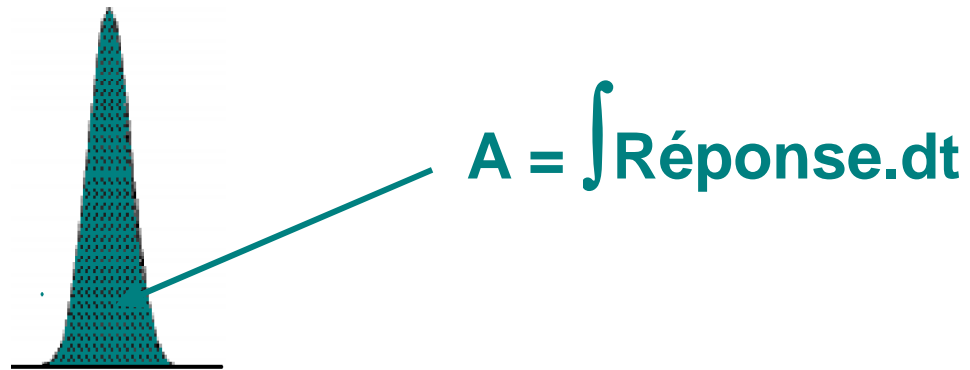
4.2 Détection

4.3 Mesure des surfaces de pics

# Analyse quantitative

---

## Détecteurs de concentration



# Analyse quantitative en CE

---

En électrophorèse capillaire,  
chaque composé aura sa propre vitesse :

$$V_{\text{composé}} = V_{\text{eo}} + V_{\text{ep,composé}}$$

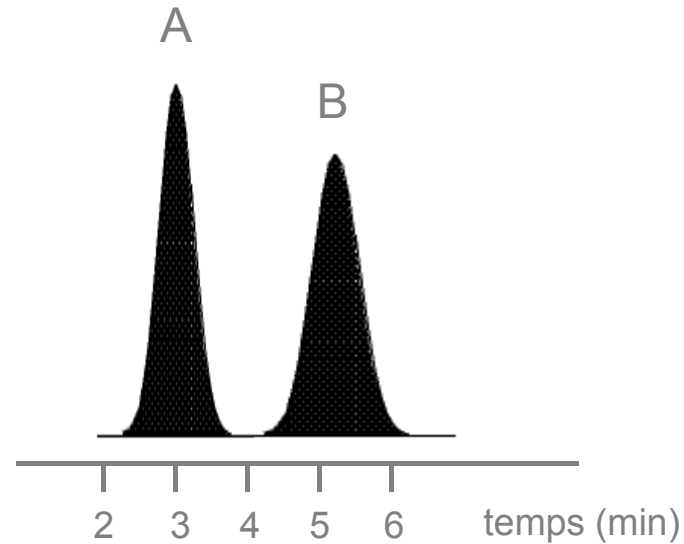
**A (Aire du pic) dépend du temps de migration  
de la géométrie du capillaire**

Nécessité de recours aux surfaces corrigées :

$$A_{\text{corrigée.composé}} = A_{\text{composé}} / t_{\text{migration.composé}}$$

Exemple de 2 composés présents de façon équimolaire dans une solution et présentant des  $\varepsilon$  très proches (énantiomères,...)

---



---

	$t_{\text{migration}}$ (min)	surface (%)	surface corrigée (%)
A	3,010	0,3065	0,5065
B	5,205	0,6935	0,4975

---

# Plan du cours

---

## 1. La migration en électrophorèse capillaire

1.1 Mobilité électrophorétique

1.2 Phénomène d'électroosmose

## 2. La séparation en électrophorèse capillaire

2.1 Efficacité

2.2 Résolution

## 3. L'amélioration de la sélectivité

## 4. L'analyse quantitative

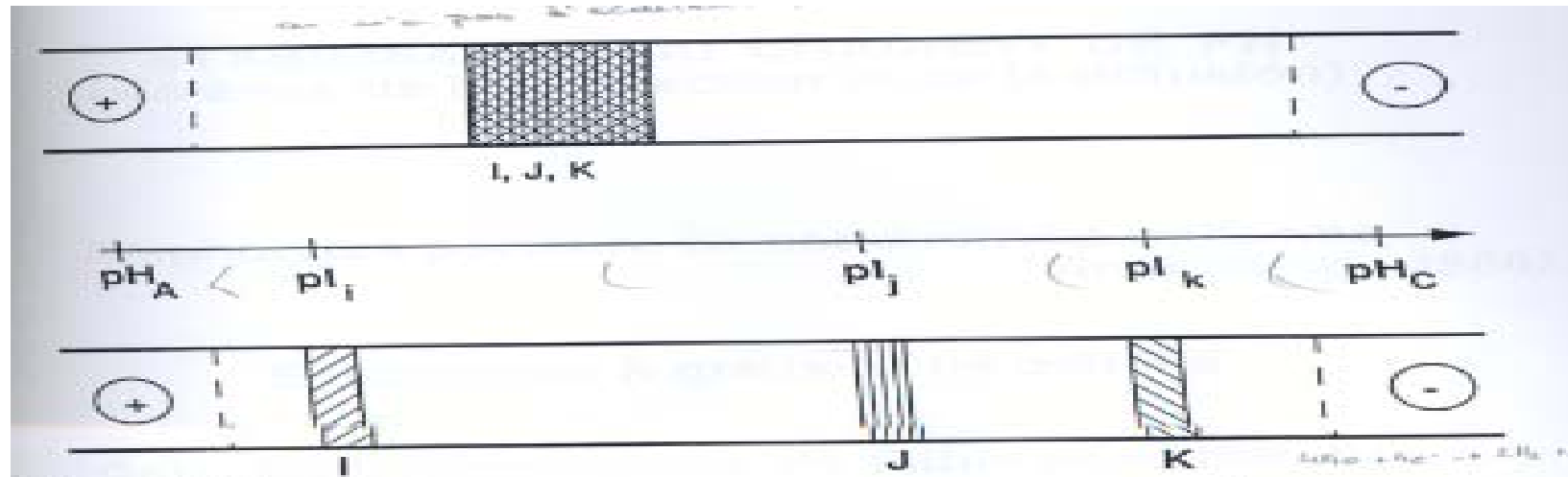
4.1 Injection

4.2 Détection

4.3 Mesure des surfaces de pics

## 5. La Focalisation isoélectrique (CIEF)

# CIEF



## CARACTERISTIQUES

Séparations d'ampholytes

Migration dans un gradient de pH, en absence d'électroosmose

Trois électrolytes différents

Vitesses de migration décroissantes

Existence d'un état stationnaire

Effet de concentration, fronts de séparation étroits

Limitations : instabilité du gradient de pH

convection

Résolution :  $\Delta(pI) \sim 0,05 \text{ pH}$

# CIEF

---

**STABILISATION DU GRADIENT DE PH**  
(vis-à-vis de la convection et de la diffusion)

**Ampholytes porteurs de conductivité uniforme**  
(*Vesterberg, 1966*)

**Electrolytes à gradient de densité**

**Gels de polyacrylamide de faible concentration**

**Gradients de pH immobilisés**  
(*Righetti, Bjellquist, 1982-85*)

**Tubes capillaires**



# CIEF

## **ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE** (couplage IEF - PAGE)

**Séparation des protéines selon  
leur point isoélectrique et leur masse moléculaire**

### **1ère dimension**

#### **IEF en gradient de pH immobilisé**

**Conditions classiques :** gel mince de polyacrylamide, 20 x 0,15 cm  
T = 3-4 %, C = 0,3 % ; pH 3-10  
urée 8 M, DTT 10 mM,  
CHAPS 1 % ou glycerol 5 %  
Quantité d'échantillon protéique : 100 µg  
(1-5 mg/mL)  
Durée de la focalisation : 16-20 h

### **Etape intermédiaire**

#### **Elimination de l'urée et des ampholytes Dénaturation**

**Conditions classiques :** tampon TRIS-phosphate pH ~ 7,  
glycerol 40 %, DTT 60 mM, SDS 3 %

### **2ème dimension**

#### **électrophorèse de zone en milieu dénaturant**

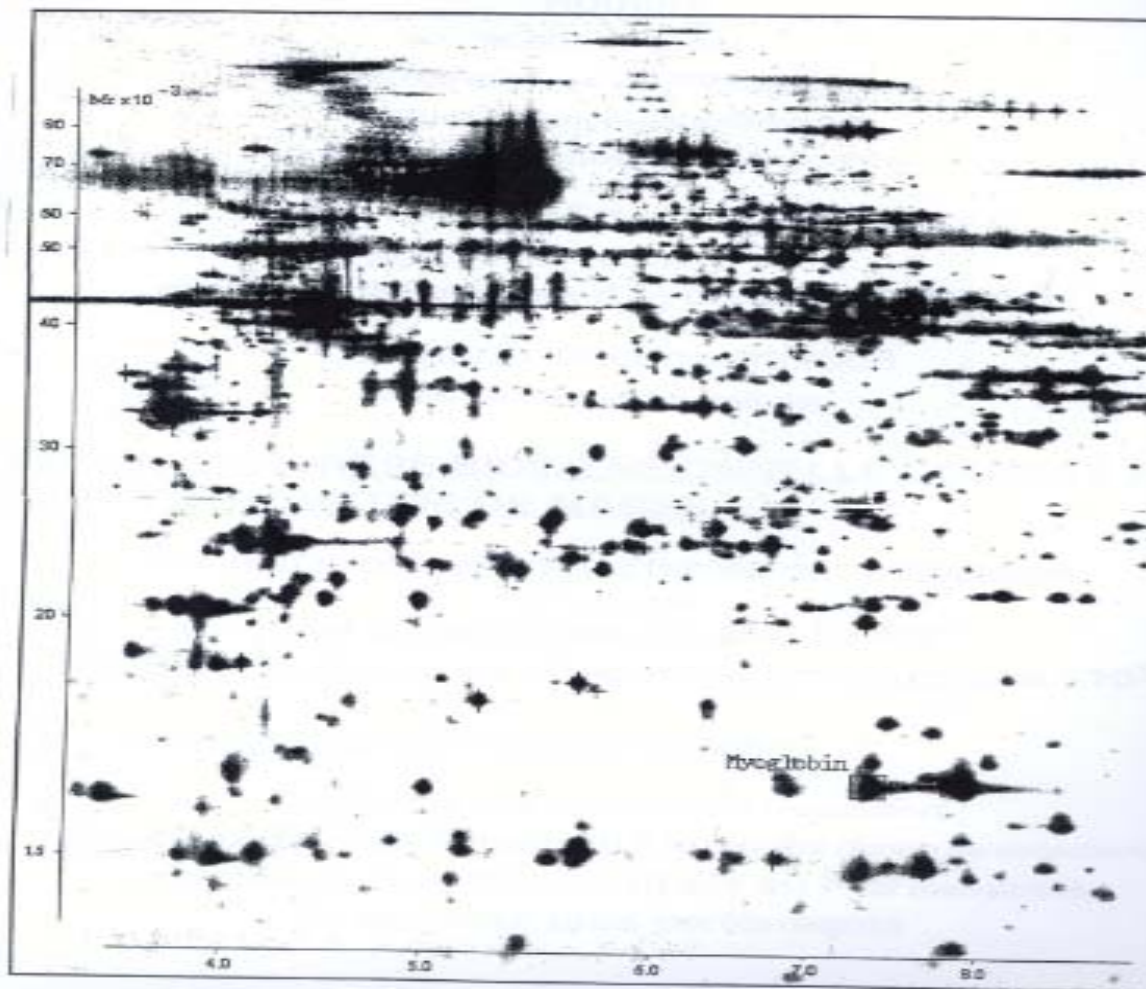
**Conditions classiques :** gel mince de polyacrylamide,  
20 x 30 x 0,15 cm  
(T = 15 %, C = 0,3 %)  
tampon TRIS-HCl, pH 8,6, SDS 0,1 %  
Durée de la migration : 7-8 h

# CIEF

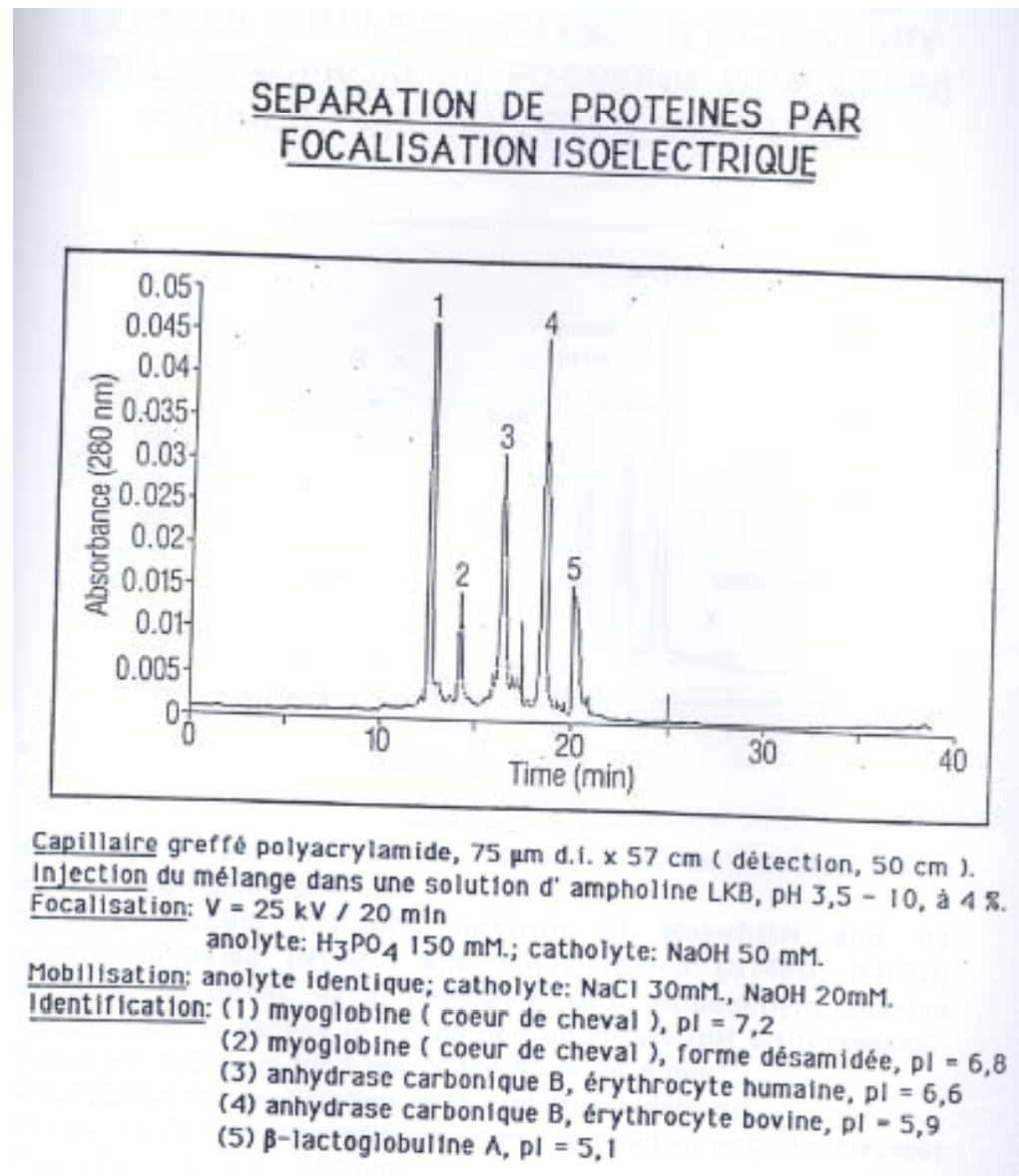
## ELECTROPHORESE 2D DE LA MYOGLOBINE

153 AA

pI = 7,4 ; Mr = 17053 Da



# CIEF



The logo of the University of Strasbourg, featuring two blue curved segments that form a stylized 'S' shape.

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

---

# **Conception des systèmes miniaturisés**

---

Contact : Yannis FRANCOIS, Lab. de Dynamique et Structure  
Moléculaire par Spectrométrie de Masse, institut de Chimie, 1  
rue Blaise Pascal, 67000 Strasbourg  
email: [yfrancois@unistra.fr](mailto:yfrancois@unistra.fr)



**Electrophorèse**

**Electrophorèse  
capillaire de zone**

**MEKC, CEC,..  
Détection: LIF,  
MS**

# EFFETS D'ECHELLE

---

**Microfluidique:** régit typiquement les écoulements dans les laboratoires sur puce.

Canaux de diamètre inférieur à la centaine de microns ou volumes inférieurs au  $\mu\text{L}$ .

## **FORCES DE SURFACE** IMPORTANTES ET SOUVENT PREDOMINANTES



Interactions de Van der Waals (associées à des surfaces chargées en présence de solutions ioniques)



Tension de surface (interactions liquide/liquide ou liquide/gaz)

On peut retourner un microsystème. L'eau reste accrochée à la surface !

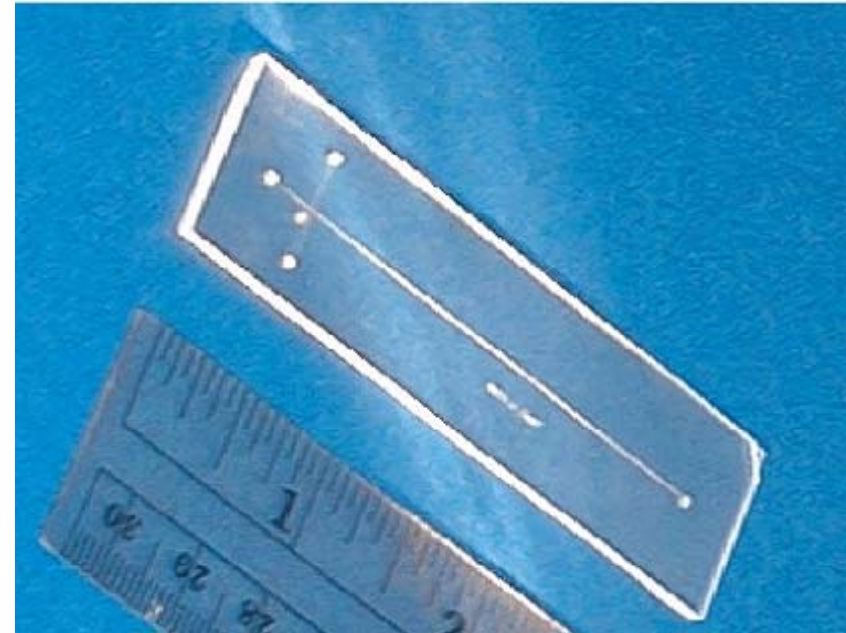
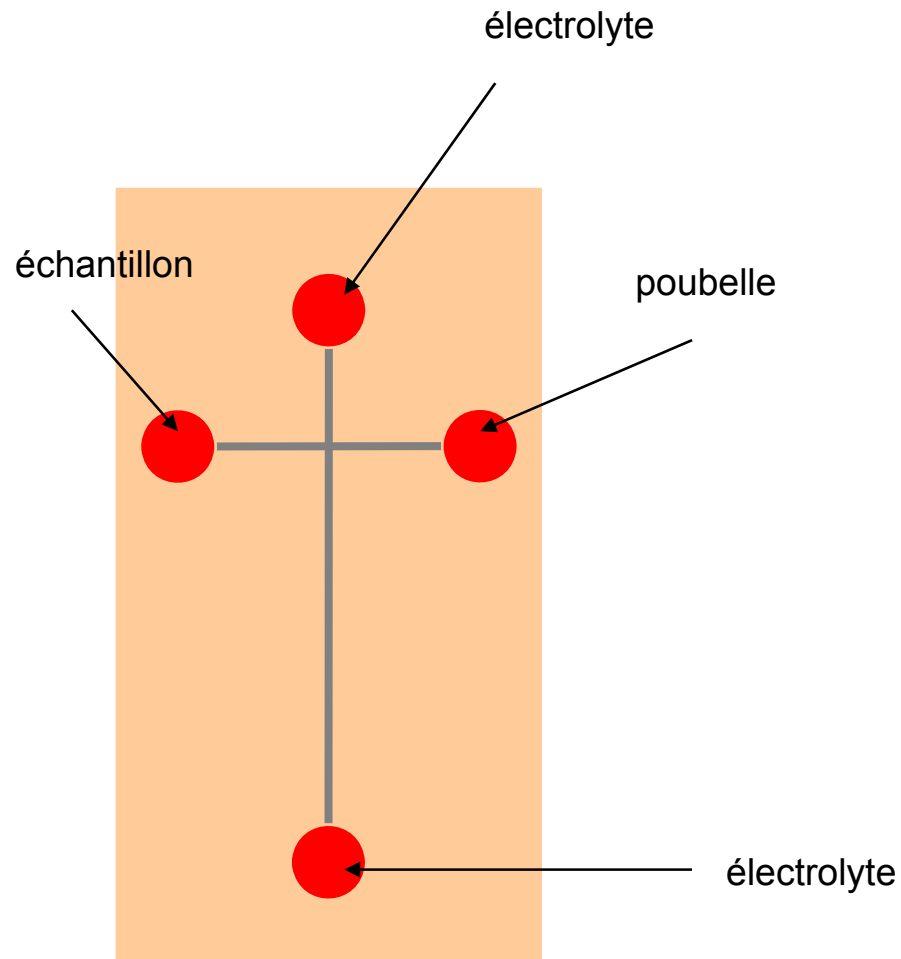
Les traitements de surface ont plus d'influence que la gravité!

Dans ces écoulements: pas de TURBULENCE et les mélanges se font par **DIFFUSION**.

Les gouttes gardent leur intégrité et les bulles se comportent comme des obstacles dans les canaux.

# MICRO-CE

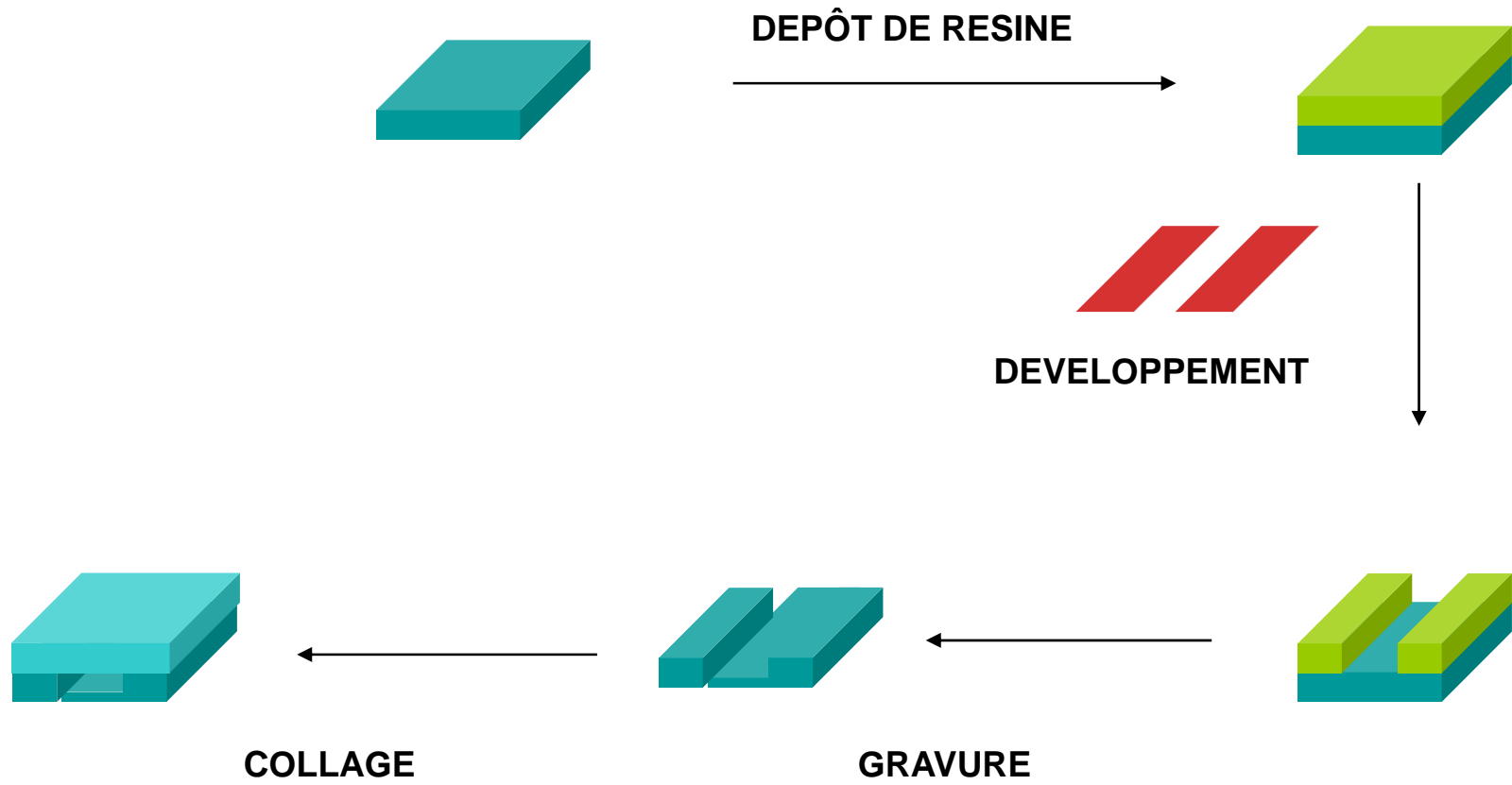
---



Dispositif en croix

# TECHNOLOGIE « DURE »: SILICIUM

---





# GRAVURE

## GRAVURE HUMIDE: Attaque chimique en phase liquide

**GRAVURE ISOTROPE:** se développe indifféremment dans les 3 directions

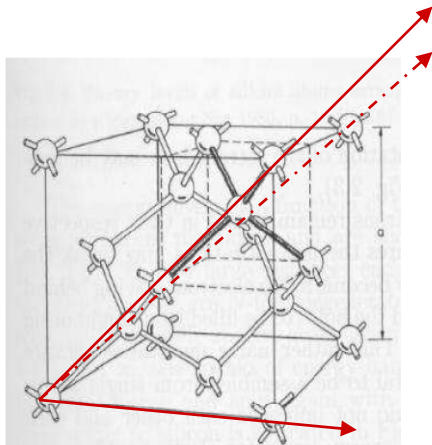


Ex: cavités sphériques

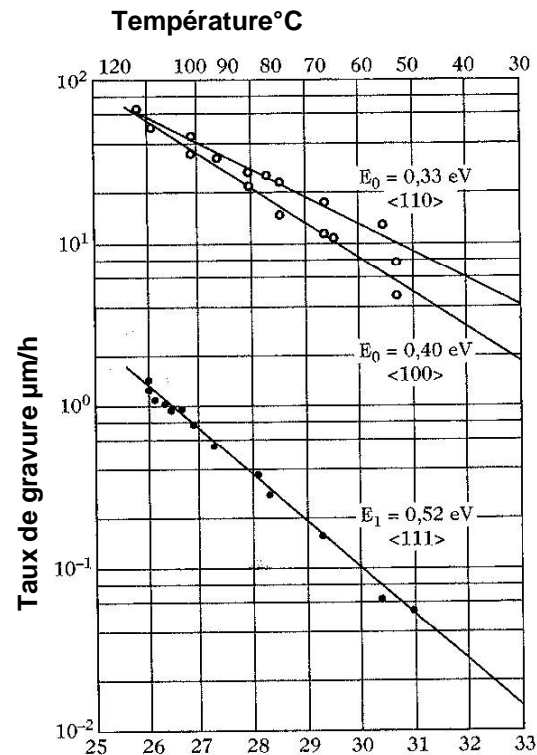
**HF/HNO<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>COOH pour le silicium**

**HF pour le verre**

**GRAVURE ANISOTROPE:** se développe préférentiellement suivant certains plans cristallins



Structure cristalline du silicium



**OH pour le silicium**

**erre = amorphe ▶ pas de gravure isotrope**

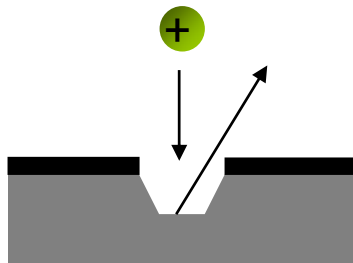


Ex: cavités à facettes

# GRAVURE

## GRAVURE SECHE:

### Pulvérisation

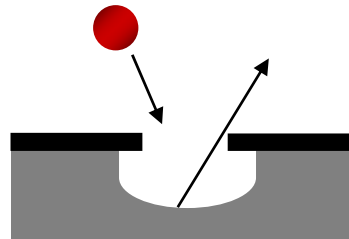


**ANISOTROPE**  
100Å/min

Gravure par action physique  
du flux d'ions incident

Cible placée sur la cathode  
Ions accélérés par un champ  
électrique

### Chimique



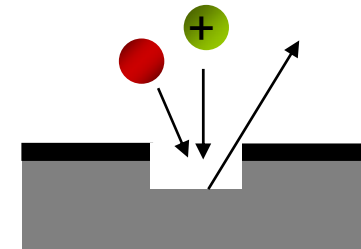
**ISOTROPE**

Gravure par action chimique  
d'espèces réactives

Diffusion des espèces réactives  
vers la cible et adsorption  
Réaction avec le matériau-cible et  
formation d'un composé volatil

$SF_6, CF_4 \rightarrow SiF_4$   
(gaz volatil)

### Physico-chimique



**ANISOTROPE**  
1000Å/min

Gravure par action chimique  
d'espèces réactives

assistée par le bombardement d'ions  
= RIE (Reactive Ion Etching)

# TECHNOLOGIE PLASTIQUE : PDMS (polydiméthylsiloxane)

---

Polyméthylméthacrylate (PMMA)

Polycarbonate

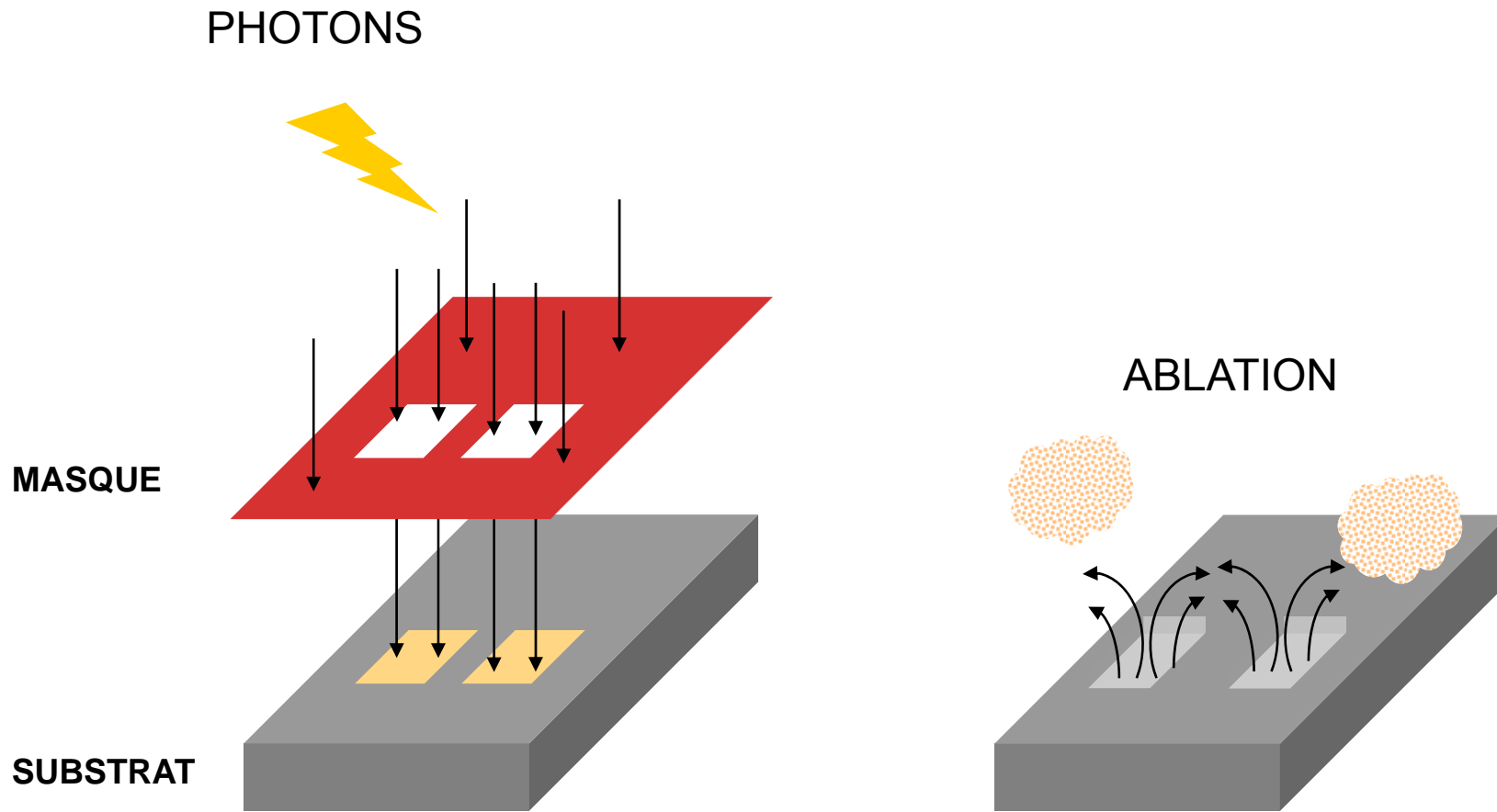
Polydiméthylsiloxane (PDMS)

Polytetrafluoroéthylène

# MICRO-USINAGE

---

## ABLATION LASER



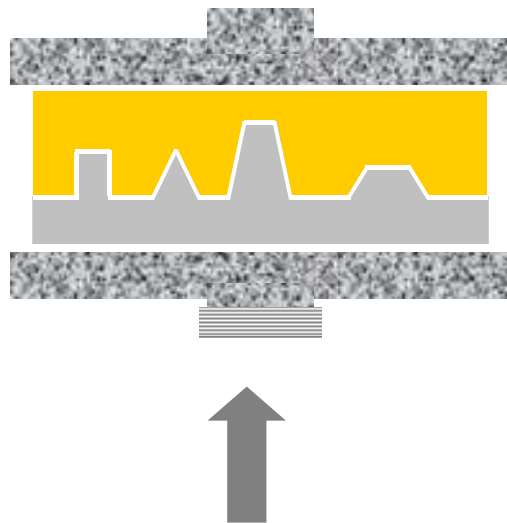
# REPLICATION

---

**MOULAGE**  
(ex : PDMS)



← Agent réticulant  
+ T (70°C)



Pression + T (170°C)

**MATRICAGE** (ex : PMMA)

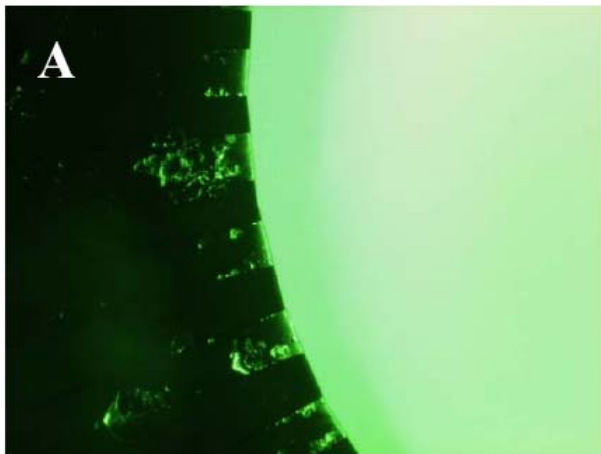


← Pression + T  
(>T° de transition  
vitreuse)

**MICRO-INJECTION**

## PDMS : matériau hydrophobe

- Plasma d'O<sub>2</sub>
- Traitement de surface (polyvinylpyrrolidone, poly-L-lysine,...)



Sans traitement de surface



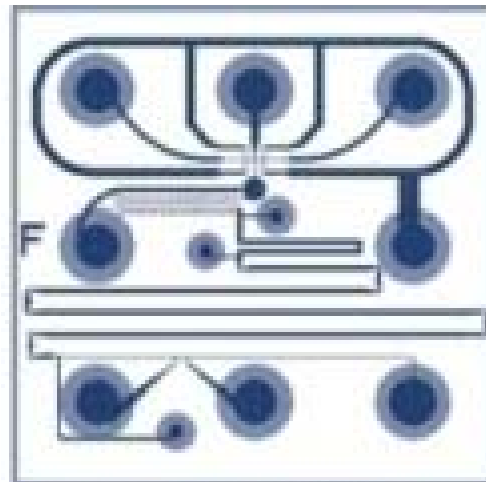
Avec traitement de surface



# Intégration des différentes étapes de la chaîne analytique

---

Echantillon

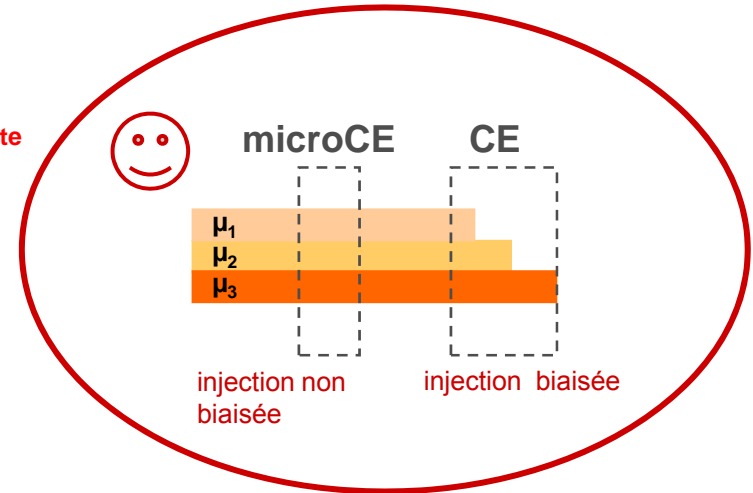
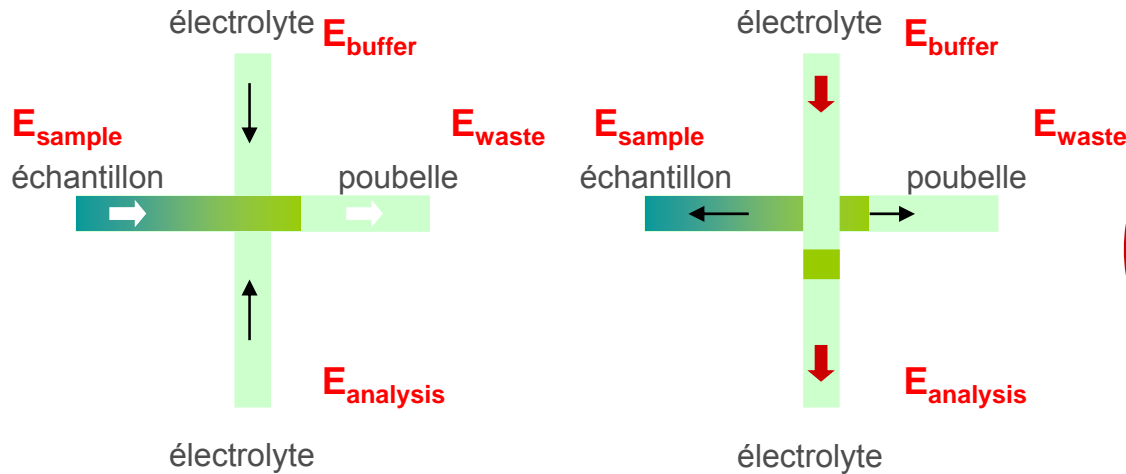




# MICRO-Chip: Injection

Volume fixe = volume de l'intersection

## « Pinched » injection



Loi de Kirchhoff (loi des nœuds):

A une intersection, la somme des courants est nulle

Chargement

$$E_{\text{sample}} + E_{\text{buffer}} + E_{\text{analysis}} = E_{\text{waste}}$$

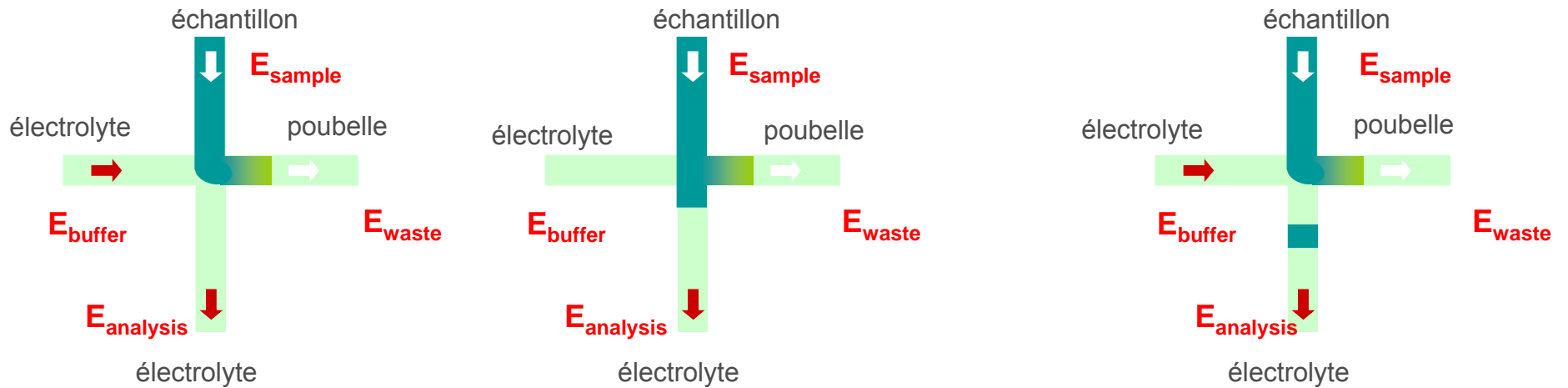
Injection + Analyse

$$E_{\text{sample}} + E_{\text{waste}} + E_{\text{analysis}} = E_{\text{buffer}}$$

# MICRO-Chip: Injection

Volumes entre 10 et 400 pL

## « Gated » injection



$$E_1 + E_2 = E_3 + E_4$$

Chargement

$$E_{\text{sample}} \leq E_{\text{waste}} \text{ ou } E_{\text{buffer}} \geq E_{\text{analysis}}$$

Injection

$$E_{\text{sample}} \geq E_{\text{waste}} \text{ ou } E_{\text{buffer}} \leq E_{\text{analysis}}$$

Analyse

$$E_{\text{sample}} + E_{\text{waste}} + E_{\text{analysis}} = E_{\text{buffer}}$$

# MICRO-Chip: Injection

---

**Contributions extérieures:**  $\sigma_{\text{tot}}^2 = \sigma_{\text{col}}^2 + \sigma_{\text{ext}}^2$

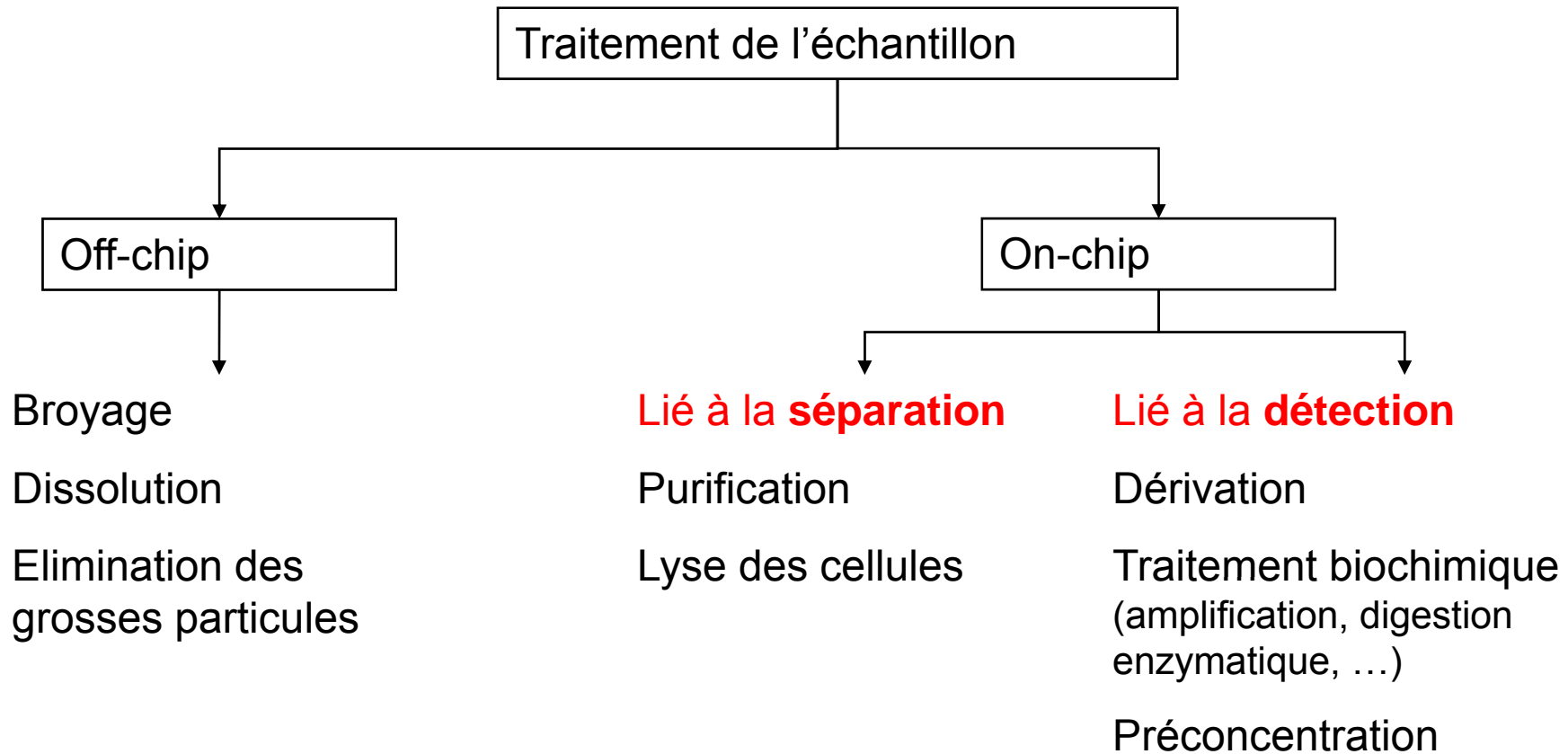
Dispersion qui dépend du volume injecté

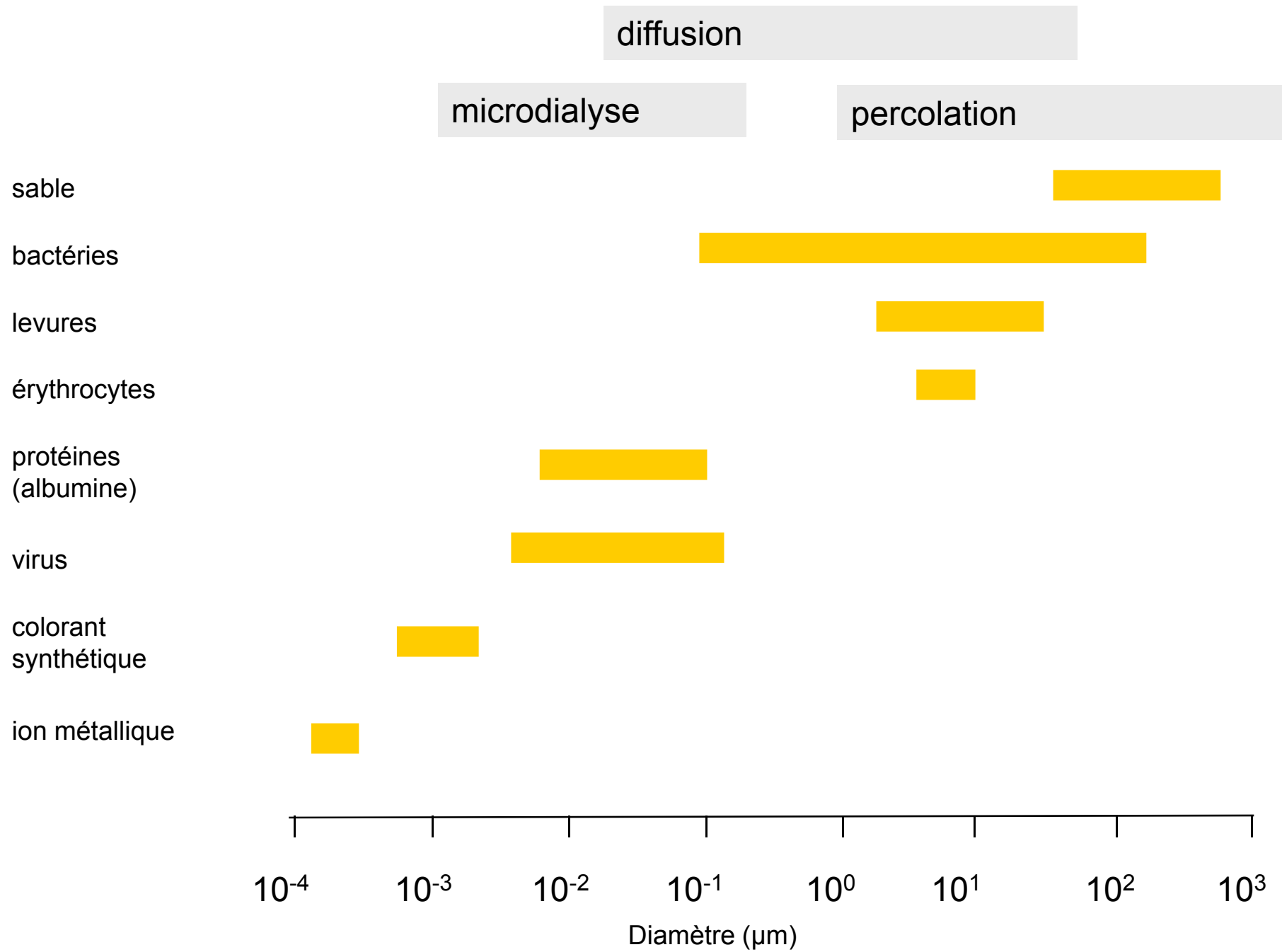
Injection:  $\sigma_{\text{inj}}^2 \sim V_{\text{inj}}^2$

Source de dispersion non significative sauf dans le cas de séparations extrêmement rapides

# Préparation de l'échantillon

---



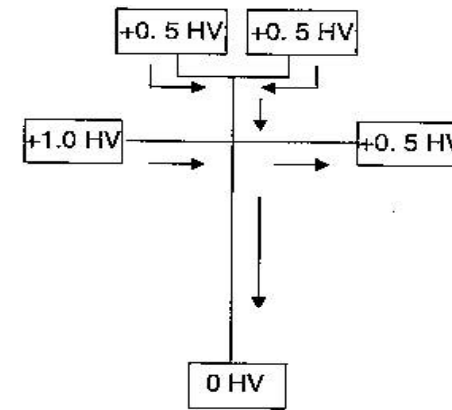
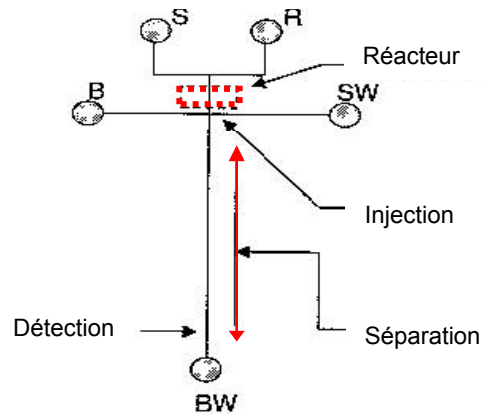


# Dérivation de l'échantillon

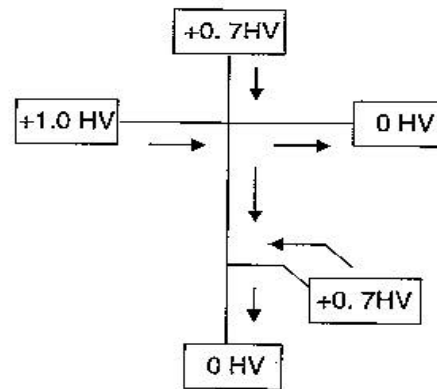
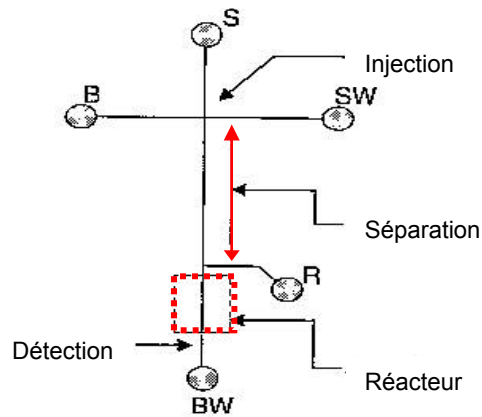
Conception de la puce

Voltages de la puce

Dérivation pré-colonne  
(« gated » injection)



Dérivation post-colonne  
(« gated » injection)



# Les limites actuelles: Détection

Les détections optiques:  $A = \varepsilon l c$

$$\sigma_{\text{cell}}^2 = V_{\text{cell}}^2$$

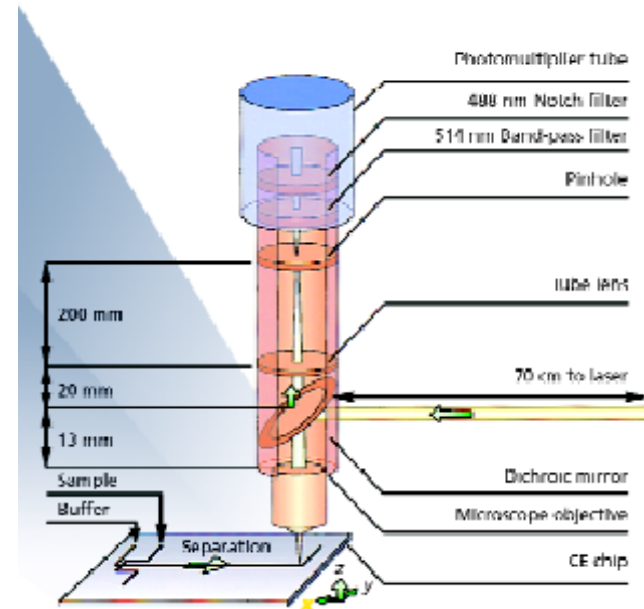
Fluorescence induite par laser



Permet de focaliser la détection sur une largeur de 5-20µm voire inférieure à  $l_{inj}$

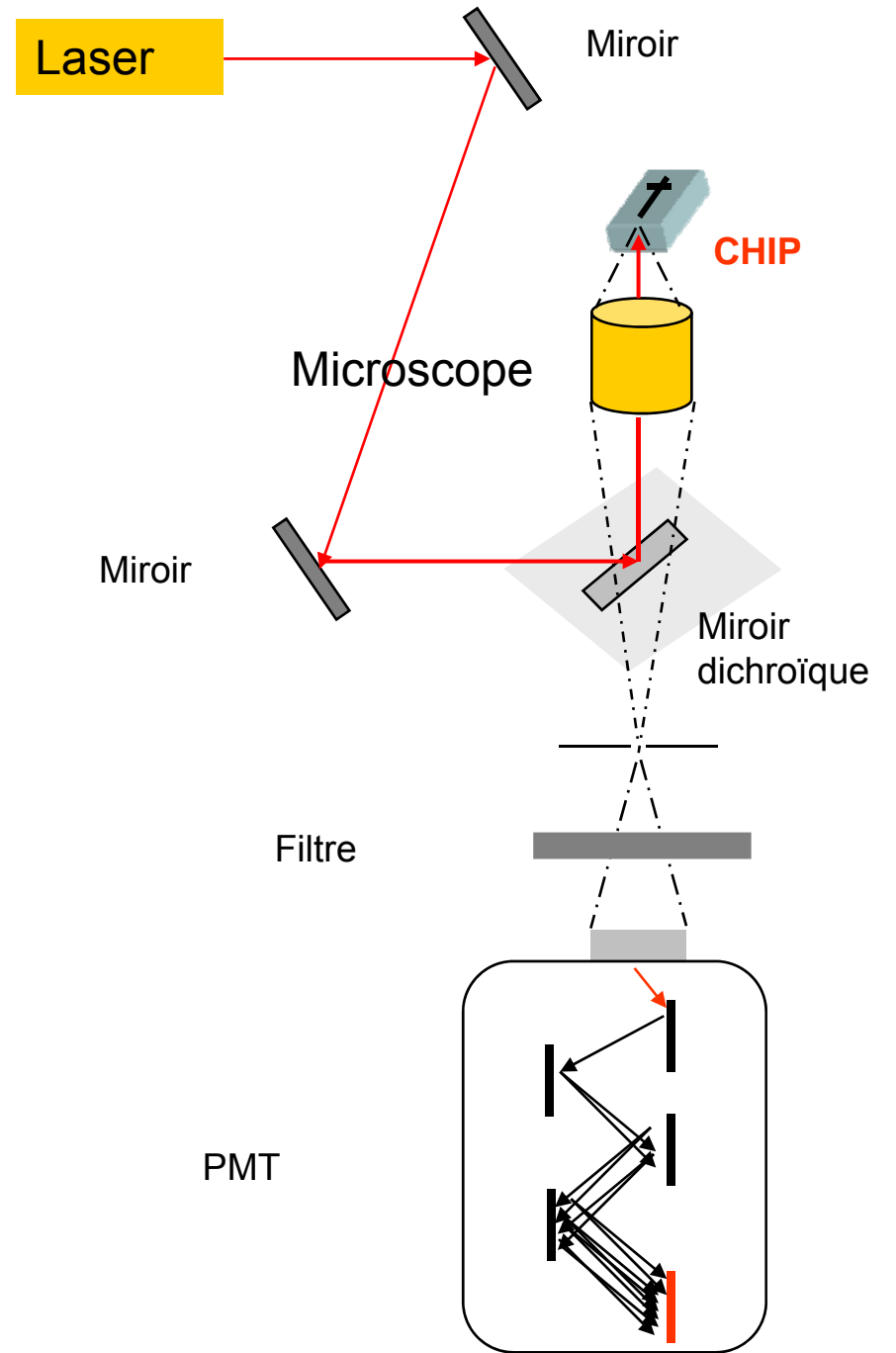
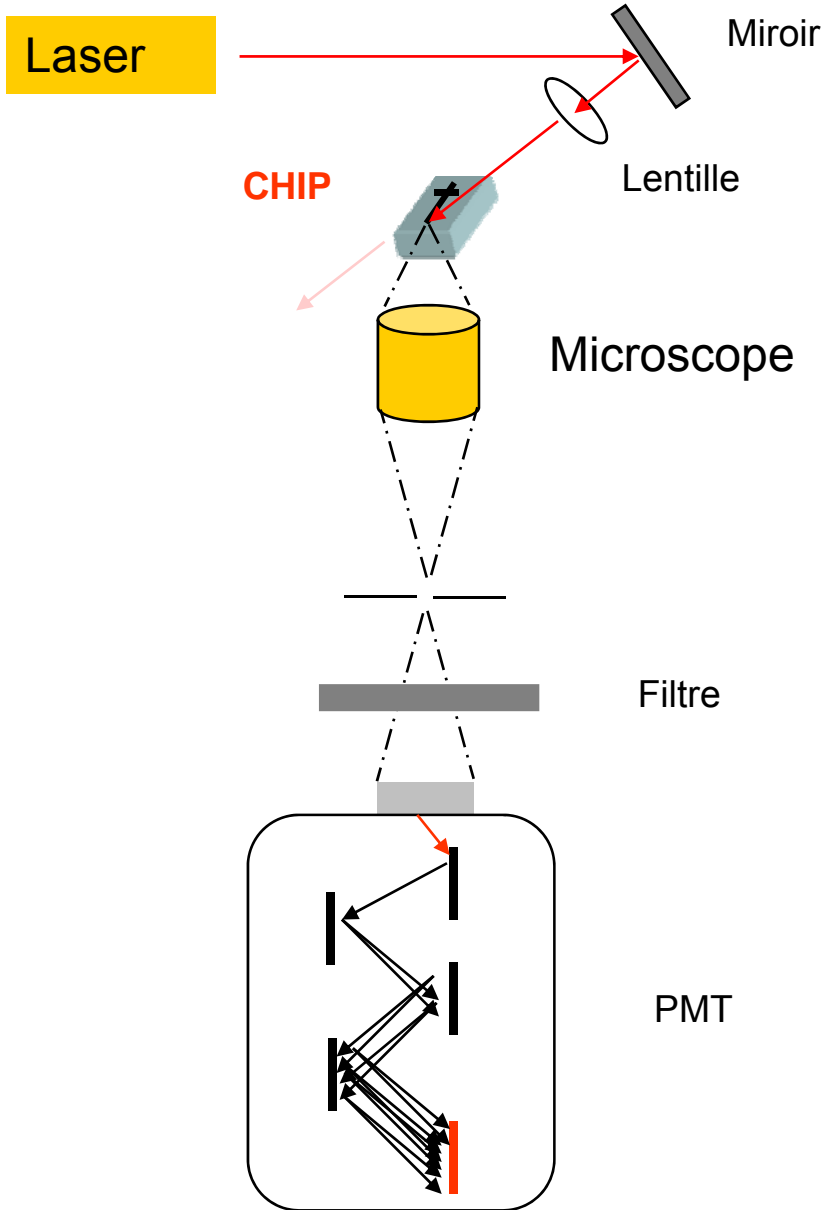
Ar<sup>+</sup>:  $\lambda_{exc} = 488\text{nm}$

He-Cd:  $\lambda_{exc} = 350/ 442\text{nm}$



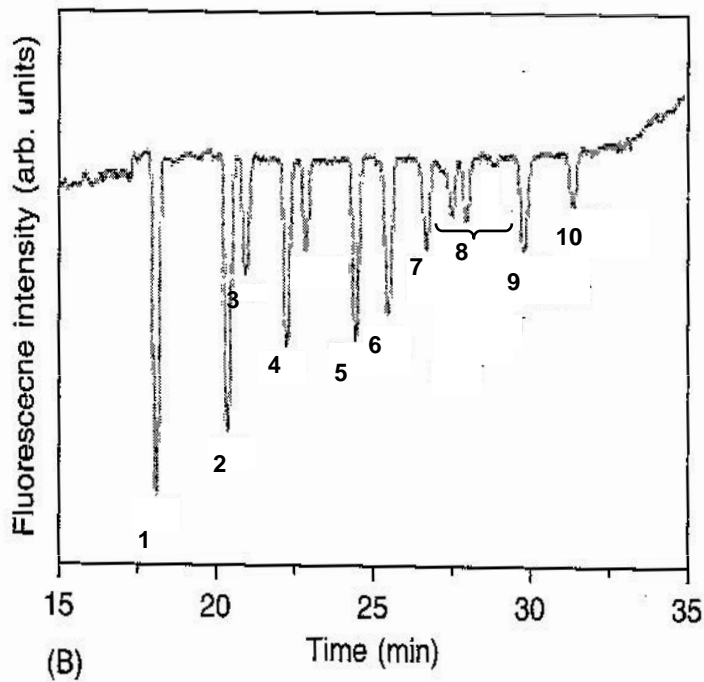
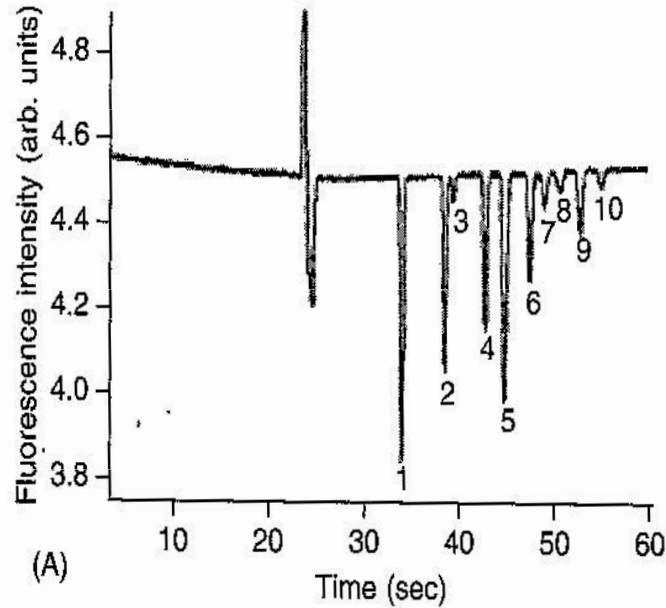
Nécessite des substrats optiquement transparents : verre, quartz, qques plastiques

# Détection par fluorescence





Séparation de nitroaromatiques  
et de nitrosamines en MEKC



$\mu$ -Chip L=65mm

Capillaire L=50cm

Electrolyte: 10mM borate de sodium,  
50mM SDS

Détection: Fluorescence inverse

1=TNB, 2=DNB, 3=NB, 4=TNT, 5=tetryl, 6=2,4-DNT, 7=2,6-DNT,  
8=2-,3-,5-NT, 9=2-Am-4,6-DNT, 10=4-Am-2,6-DNT

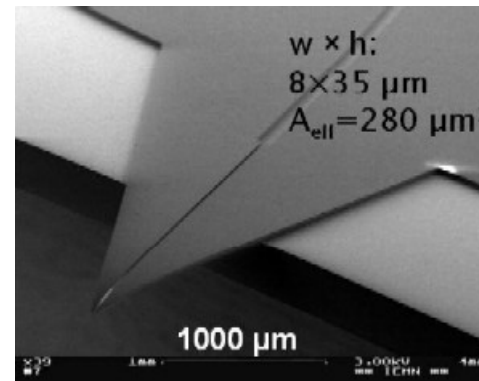
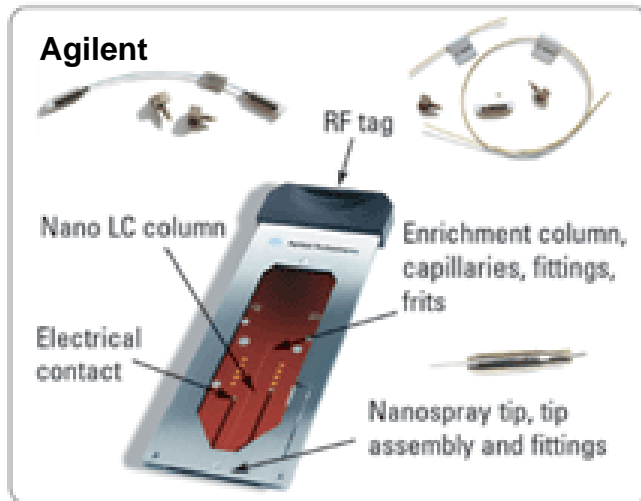
Wallenborg S. R. *et al. Anal.Chem.* 2000, **72**, 1872-1878.

Wallenborg S. R. *et al., Electrophoresis* 2000, **21**, 3257-3263.

# Les limites actuelles: Détection

## Spectrométrie de masse

### ESI-MS



### MALDI-MS

Moins populaire

En développement : ROACHE « Rapid Open-Access Channel Electrophoresis »



Les analytes sont séparés dans des canaux ouverts.

La matrice est ajoutée à l'électrolyte avant la séparation.

A la fin de la séparation, un pulse laser conduit à l'ionisation des analytes qui sont alors directement dirigés vers le MS

# Les limites actuelles : Mélanger!

**FAIBLES NOMBRES DE REYNOLDS: ECOULEMENTS LAMINAIRES**

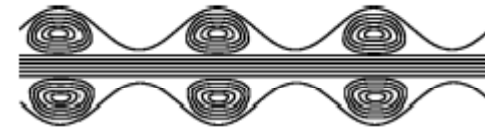


**Mélangeage** par diffusion moléculaire

Contradictoire avec la notion de miniaturisation!

Séparation de flux

Création de recoins

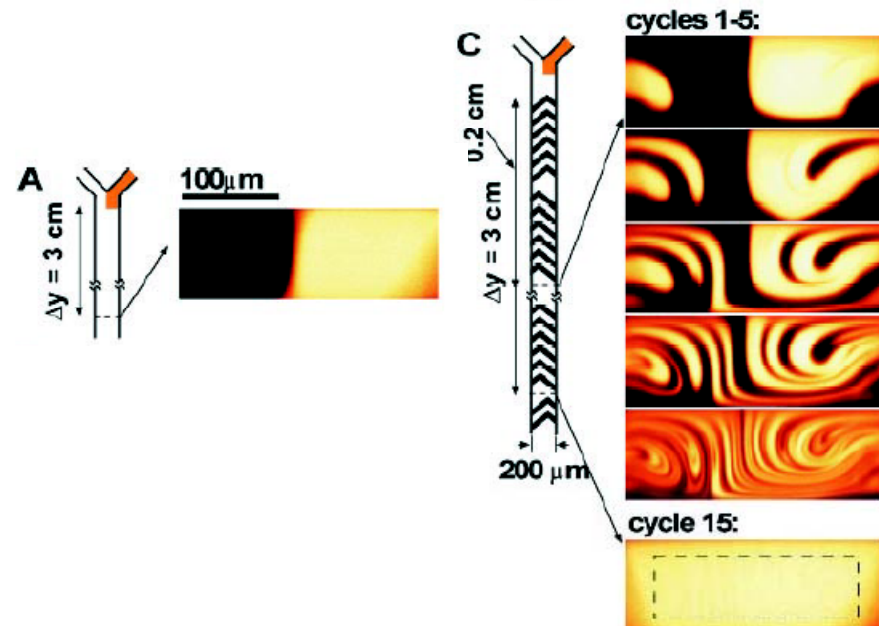


Focalisation hydrodynamique



Advection chaotique

Création d'un écoulement chaotique



Division et recombinaison de flux

