

2m11.2986.4

Université de Montréal

Construction et contrôle informatique d'un potentiostat comme détecteur  
ampérométrique des hydrates de carbone suivant leur séparation par électrophorèse  
capillaire

Par

Eric Villiard

Département de chimie

Faculté des arts et sciences

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.Sc.) en chimie

Avril 2002



© Eric Villiard

Q11

3

U54

2002

V.021

Ce mémoire est intitulé :

Construction et contrôle informatique d'un potentiostat comme détecteur  
ampérométrique des hydrates de carbone suivant leur séparation par électrophorèse  
capillaire

Présenté par

Eric Villiard

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Monsieur Michel Bertrand, Président du jury

Monsieur Tom Ellis, membre du jury

Madame Karen Waldron, co-directeur de recherche

Monsieur Dónal Leech, directeur de recherche

Mémoire accepté le : .....

## Sommaire

L'électrophorèse capillaire (CE) est une technique de séparation très puissante. Découverte il y a plusieurs années mais rendue disponible depuis seulement 20 ans par Jorgenson [1], la CE est souvent comparée à une technique très utile comme l'HPLC. Le chimiste analyste des années 2000 devra savoir tirer le meilleur de ces deux méthodes. Ayant chacune des avantages et des inconvénients, elles deviendront complémentaires. La CE avec détection spectroscopique présente un parcours optique extrêmement petit et l'un de ses défis sera de trouver des détecteurs plus sensibles.

La détection électrochimique (ED), par exemple, est une solution pour surmonter le problème de la détection spectroscopique. Les ED sont sensibles et la réponse ne dépend pas du parcours optique. Le but de ce mémoire est d'étudier la création d'une interface entre le mode de séparation CE et le détecteur électrochimique. L'alignement entre l'électrode et le capillaire a été une des étapes déterminantes lors de l'étude de ce couplage (CE/ED).

L'électrochimie est une branche de la chimie analytique assez complexe. Les détecteurs électrochimiques couplés aux méthodes analytiques de séparation posent un défi. Le détecteur utilisé pour ce couplage s'appelle un détecteur ampérométrique (AD).

La première étape pour réaliser ce projet était de fabriquer un circuit électronique basé sur un logiciel scientifique, permettant d'envoyer aux électrodes un potentiel connu via la carte analogue/digitale et, ensuite, d'amplifier la réponse pour la retransmettre à la même carte qui communique avec un programme d'acquisition des données. Le logiciel est en fait un appareil virtuel agissant comme détecteur

ampérométrique et table traçante. Ces deux étapes ont été réalisées en collaboration avec monsieur Pascal Pérusse.

La deuxième étape était de vérifier le logiciel informatique ainsi qu'une des étapes de la manipulation soit l'alignement entre l'électrode et le capillaire. Pour ce faire, nous avons fait la comparaison entre nos résultats et ceux de la littérature pour la détection des sucres en utilisant l'électrode de cuivre. Nous avons utilisé une macro électrode avec une détection «end column». Ce mode de détection enlève le problème de découpler le courant provenant de la séparation par CE au courant de diffusion mesuré comme signal analytique. De plus, ces macro électrodes sont plus faciles à aligner donc, potentiellement commercialisables.

La troisième et dernière étape était l'utilisation d'une nouvelle électrode de  $\text{RuO}_2$  comme outil de détection pour la séparation par CE des sucres. La fabrication des électrodes de ruthénium est un défi en soi. Il n'existe malheureusement pas de fil de ruthénium comme le fil de cuivre. Deux types d'électrodes de ruthénium sont principalement étudiés : premièrement, une électrode de carbone badigeonnée avec du  $\text{RuO}_2$  et deuxièmement, une électrode faite de pâte de ruthénium.

Le système ainsi développé servira pour la séparation et la détection des acides aminés et des hydrates de carbone. Cette méthode sera ainsi envisagée pour le séquençage des glycoprotéines.

---

Mots Clés : Electrophorèse Capillaire, Détection Electrochimique, Détection Ampérométrique, Hydrates de Carbone, Électrode de Cuivre, Électrode de Ruthénium

## Summary

Capillary electrophoresis (CE) is a very powerful separation technique. Electrophoresis has existed for almost 100 years but CE was only introduced by Jorgenson [1] 20 years ago, and is often compared to the better known separation method, HPLC. Analytical chemists of this generation now have the opportunity to make the best of these two methods. Since these two techniques possess different mechanisms of separation, they are considered complementary to one another. Usually, capillary electrophoresis must rely on an extremely short optical path for absorbance-based detection and one of its challenges is therefore to develop more sensitive detectors.

Since electrochemical detectors (ED) are very sensitive and do not rely on an optical path or sample absorbance, they may be considered as a solution for sensitive CE detection. The goal of this thesis was to create an interface between the separation technique of capillary electrophoresis and electrochemical detection (CE/ED) for the analysis of carbohydrates. Alignment of the capillary and the electrode has been one of the most important determining factors during the studies of the coupled CE/ED system.

Electrochemistry is a complex branch in analytical chemistry. The use of electrochemical detectors with analytical separation methods is regarded as a challenge. An amperometric detector (AD) was used for this combination.

The first step of this project was to build a homemade electronic circuit based on scientific software enabling us to send a known potential to the electrodes. This was achieved through an analog/digital interface card that amplified the response, which was retransmitted to the same card and directly connected to the data acquisition software. The software developed in our laboratory, in collaboration with Mr. Pascal Pérusse, is actually a virtual device that works as an amperometric detector and a strip chart recorder.

The second step was to verify the software and optimize the alignment of the working electrode and the capillary outlet. To do so, we had to compare our observed data to known literature results for the detection of carbohydrates using a copper electrode. A macroelectrode for end-column detection was used. With this mode of detection, there was no need to decouple the current associated with the CE separation from the diffusion current measured as the analytical signal in the ED cell. Nevertheless these types of macroelectrodes are marketable products since they are fairly easy to align.

Finally, the third and last step was to try a new electrode material,  $\text{RuO}_2$ , for the detection of carbohydrates. Unfortunately, since ruthenium wires are not available like copper wires, the creation of a ruthenium electrode was quite challenging. Two types of ruthenium electrodes were primarily studied: first, a carbon electrode paste with ruthenium added and then a second, made with ruthenium paste.

The system that we developed will be essentially used for the separation and detection of amino acids and carbohydrates. Future applications of this technique will be examined for use in glycoprotein sequence analysis.

---

Key words: Capillary Electrophoresis, Electrochemical Detection, Amperometric Detection, Carbohydrates, Copper Electrode, Ruthenium Electrode.

## Table des matières

Sommaire.....	i
Summary .....	iii
Table des matières .....	v
Liste des tableaux .....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des Abréviations .....	xi
Remerciements .....	xii
1 Introduction .....	1
1.1 Le mode de séparation : l'électrophorèse capillaire (CE) .....	2
1.1.1 Le fonctionnement de l'électrophorèse capillaire de zone (CZE) .....	3
1.1.1.1 Le flux électroosmotique (EOF).....	5
1.1.1.2 La mobilité électrophorétique ( $\mu_{ep}$ ) .....	8
1.1.1.3 L'effet de chaleur .....	10
1.1.1.4 Aspects quantitatifs en électrophorèse capillaire .....	10
1.1.1.5 La détection en électrophorèse capillaire .....	13
1.2 L'électrochimie .....	15
1.2.1 Concepts de base de l'électrochimie.....	15
1.2.2 Courant faradaïque et courant de charge .....	17
1.2.3 Transfert de masse .....	18
1.2.4 Voltampérométrie cyclique et détection ampérométrique.....	19
1.3 Objectifs de projet.....	22
2 Partie Expérimentale .....	24
2.1 Choix de la dimension de l'électrode de travail.....	24
2.2 La cellule électrochimique .....	24
2.3 L'électrode de travail .....	33
2.3.1 L'électrode de cuivre .....	33
2.3.2 L'électrode de dioxyde de ruthénium .....	34

2.4 Les appareils d'analyse .....	35
2.4.1 La voltampérométrie cyclique .....	35
2.4.2 Le détecteur ampérométrique .....	36
2.4.3 Le système de séparation CE .....	37
2.4.4 L'ordinateur .....	37
2.5 Les capillaires .....	37
2.6 L'électrolyte de support et solutions analytiques.....	38
3 Réalisation d'un détecteur ampérométrique maison contrôlé par ordinateur.....	39
3.1 Potentiostat maison .....	39
3.2 Détection ampérométrique et système d'acquisition des données.....	41
3.3 Système d'analyse des données .....	42
3.4 Vérification du système d'acquisition/traitement des données et de notre circuit .....	44
4 Séparation et détection ampérométrique des sucres par CE avec une électrode de cuivre .....	53
4.1 Choix du voltage de détection.....	54
4.2 Paramètres affectant le signal et/ou la séparation .....	58
4.2.1 Potentiel de séparation.....	58
4.2.2 L'effet de la concentration de l'électrolyte sur le système.....	64
4.2.3 L'effet du diamètre interne du capillaire sur le système.....	66
4.2.4 L'effet de la longueur du capillaire sur le système.....	67
4.2.5 L'effet du diamètre de l'électrode de travail sur le signal.....	67
4.3 L'effet de l'alignement entre l'électrode et le capillaire sur le signal et les conditions optimum trouvées .....	68
4.4 Conclusion .....	70
5 L'électrode de dioxyde de ruthénium (RuO <sub>2</sub> ).....	71
5.1 Le choix de la méthode de fabrication de l'électrode de dioxyde de ruthénium .....	73
5.2 La voltampérométrie cyclique .....	73
5.3 Détection ampérométrique du glucose avec une électrode RuO <sub>2</sub> couplé à l'électrophorèse capillaire .....	75

5.4 Choix du potentiel optimum pour la détection du glucose .....	76
5.5 Limite de détection du glucose .....	77
5.6 Conclusion .....	78
6 Conclusions générales et études futures.....	79
Références .....	81

## Liste des tableaux

Tableau 3.1 : Comparaison du signal entre les données acquises avec la table traçante, le logiciel virtuel et le traitement des données par Origin.....	46
---	----

## Liste des figures

Figure 1.1 : Schéma d'un système d'électrophorèse capillaire. ....	4
Figure 1.2 : Profil du flux électroosmotique dans le capillaire .....	6
Figure 1.3 : L'effet du pH sur le EOF avec une solution ayant une force ionique constante ( $I = 0,06$ ) [18]. ....	7
Figure 1.4 : Ordre d'élution des molécules pour une direction du flux électroosmotique de l'anode à la cathode. ....	9
Figure 1.5 : Onde utilisée pour la détection ampérométrique. ....	20
Figure 1.6 : Onde utilisée pour la voltampérométrie cyclique .....	20
Figure 1.7 : Exemple d'identification des potentiels d'oxydoréduction lors d'un balayage cyclique du potentiel pour la CV .....	21
Figure 2.1 : Première cellule de détection élaborée. ....	26
Figure 2.2 : Deuxième modèle de cellule, (a) vue de dessus, (b) vue de côté, (c) électrode de travail .....	28
Figure 2.3 : Troisième modèle de cellule. ....	30
Figure 2.4 : Schéma de la cellule utilisée pour le système de détection électrochimique. ....	32
Figure 3.1 : Schéma du circuit.....	40
Figure 3.2 : Interface de l'appareil virtuel combiné au système d'acquisition des données. ....	42
Figure 3.3 : Panneau de l'instrument virtuel pour l'analyse des données. ....	43
Figure 3.4 : Voltampérogramme typique de l'oxydo-réduction d'une solution de ferricyanure .....	48
Figure 3.5 : Vérification du coefficient de diffusion du ferricyanure dans le KCl 0,1 M avec le potentiostat virtuel .....	49
Figure 3.6 : Vérification de la loi de Randles-Sevcik .....	50

Figure 3.7 : Signal de fond électrophorétique avec le système maison montrant la différence dans le signal avec (A) et sans (B) potentiel de séparation appliqué .....	51
Figure 3.8 : Électrophérogramme réalisé en couplant notre circuit et notre système d'acquisition des données .....	52
Figure 4.1 : Voltamérométrie cyclique du glucose avec une électrode de cuivre. 55	
Figure 4.2 : Potentiel optimum pour l'oxydation du glucose à une électrode de cuivre .....	56
Figure 4.3 : Linéarité de l'oxydation du glucose à une électrode de cuivre pour la voltampérométrie cyclique .....	57
Figure 4.4 : Courant électrophorétique résultant du potentiel de séparation.....	59
Figure 4.5 : Importance du potentiel de séparation sur le rapport signal sur signal de fond.....	60
Figure 4.6 : Tentative de séparation d'un mélange de 4 sucres avec un potentiel de séparation de 20 kV.....	62
Figure 4.7 : Séparation d'un mélange de 4 sucres avec un potentiel de séparation de 15 kV. ....	63
Figure 4.8 : Séparation d'un mélange de 4 sucres avec un potentiel de séparation de 10 kV .....	64
Figure 4.9 : Droite d'étalonnage pour le glucose avec une électrode de cuivre de 100 $\mu\text{m}$ .....	69
Figure 5.1 : Voltampérogramme avec une électrode de dioxyde de ruthénium.....	74
Figure 5.2 : Oxydation du glucose à une électrode de dioxyde de ruthénium .....	75
Figure 5.3 : Relation entre le potentiel d'oxydation du glucose et le rapport signal sur signal de fond avec une électrode de pâte de carbone contenant du dioxyde de ruthénium .....	77

## Liste des Abréviations

AD.....	Détection ampérométrique
CE.....	Electrophorèse capillaire
CE/ED.....	Electrophorèse capillaire/Détection électrochimique
CGE.....	Electrophorèse capillaire sur gel
CV.....	Voltampérométrie cyclique
CZE.....	Electrophorèse capillaire de zone
E.....	Champ électrique
ED.....	Diamètre externe
EOF.....	Flux électroosmotique
ESI.....	Ionisation à électrospray
HPLC.....	Chromatographie liquide à haute pression
ID.....	Diamètre interne
$i_{p,o}$ .....	Courant au pic d'oxydation
$i_{p,r}$ .....	Courant au pic de réduction
LC.....	Chromatographie liquide
LOD.....	Limite de détection
MS.....	Spectroscopie de masse
OA.....	Amplificateur opérationnel
$\mu_{ep}$ .....	Mobilité électrophorétique

## Remerciements

J'aimerais d'abord remercier mon père et ma mère qui m'ont encouragé à terminer ce que j'ai entrepris. Ils ont toujours été présents, disponibles mais discrets tout en me faisant confiance. Merci maman de nous avoir continuellement valorisé moi et Isabelle. Merci à vous deux pour notre belle éducation et le sain climat dans lequel vous nous avez élevés.

Merci à tout le personnel de l'atelier pour leur disponibilité et le soutien technique qu'ils m'ont fourni pendant les deux dernières années.

Merci à Mike et Patrice pour leur amitié tout au long de nos études.

Merci à tous mes collègues de travail : Eric, Francis, Alexandra, Maryse, Dominique et Marjie pour leur bonne humeur et l'atmosphère agréable qu'ils ont su créer.

Merci à Pascal Pérusse pour le système informatisé, un outil bien construit qui m'a été très utile.

Merci à Marie-Claude m'a fiancée, pour sa patience et son soutien.

Merci au professeur Karen Waldron pour sa gentillesse, sa grande disponibilité et surtout son rire toujours franc.

Finalement, un grand merci au professeur Dónal Leech pour sa confiance en m'acceptant dans son groupe de recherche. J'ai apprécié son intégrité et aussi sa disponibilité malgré l'éloignement.

## 1 Introduction

La recherche grandissante sur les molécules reliées aux hydrates de carbone génère un intérêt accru pour les techniques de détection analytique. Cet intérêt nous fait découvrir une grande variété de problèmes associés à la détection et quantification de ces analytes. Par exemple, l'analyse des hydrates de carbone et des glycoconjugués est extrêmement complexe à cause du nombre possible de formes isomériques dues aux multiples configurations des monosaccharides et à leurs formes variables d'enchevêtrement. Par exemple, l'assemblage de 3 différents acides aminés résulte en seulement 6 formes de tripeptides tandis que 3 différents hydrates de carbone peuvent donner plus de 700 trisaccharides [2,3]. De plus, la nature très polaire et non-volatile de ces molécules, l'absence de groupement chromophore ou fluorophore et l'absence de groupement spécifique fonctionnel pour leurs modifications chimiques compliquent grandement leurs analyses.

L'électrophorèse capillaire (CE) peut aider à combattre quelques unes de ces difficultés. Elle nous a déjà démontré ses capacités pour la haute efficacité des séparations de peptides, protéines et acides nucléiques [4,5]. La CE est aussi une alternative intéressante pour l'analyse des mono et oligo saccharides et leurs fragments [6,7].

Le manque de groupements chromophores sur les hydrates de carbone cause un problème de détection. Une solution pouvant être exploitée pour contrevenir à cette embûche est l'utilisation de l'électrochimie. Le détecteur ampérométrique est considéré comme étant très sensible et sélectif pour la détection des sucres non-dérivés [8,9]. Le détecteur ampérométrique n'est pas dépendant du parcours optique, donc, son utilisation jumelé aux capillaires de diamètres internes (ID) très petits est possible.

Plusieurs groupes de recherches travaillent à l'élaboration de ce type de détecteur. Le groupe de Zare a réussi la séparation de 15 hydrates de carbone à pH 13 avec une efficacité de plus de 200 000 plateaux théoriques. La détection a été accomplie à l'aide d'une électrode de cuivre cylindrique avec un potentiel constant [10].

Le groupe de Baldwin travaille eux aussi avec une électrode de cuivre (diamètre > 100  $\mu\text{m}$ ). Ce groupe utilise la technique appelée «wall-jet», c'est-à-dire, une électrode en forme de disque (un fil de cuivre avec seulement sa surface exposée) est positionnée immédiatement devant un capillaire de diamètre interne de 25  $\mu\text{m}$ . L'électrolyte, contenant aussi les analytes, est éjecté du capillaire pour se diriger directement sur la face de l'électrode. Des détections de  $10^{-6}$  M pour des mono et disaccharides ont été réalisées sans élargissements significatifs des pics et de perte d'efficacité pour la séparation [11].

### **1.1 Le mode de séparation : Électrophorèse Capillaire (CE)**

L'électrophorèse capillaire (CE) permet la séparation d'un mélange d'analytes basée sur leur migration différentielle sous l'influence d'un champ électrique. Durant ces quinze dernières années, la CE est devenue un des modes de séparation analytiques le plus étudié. Au cours de ces années, la CE s'est élevée comme étant une technique complémentaire à la chromatographie liquide à haute performance (HPLC). L'électrophorèse a connu un essor marquant lorsqu'il fut découvert que les séparations électrophorétiques étaient possibles à l'intérieur de capillaires. Avant cette découverte, les tubes servant à la séparation possédaient des diamètres internes macroscopiques. Il en découlait un courant et une chaleur très élevés. L'effet de chaleur dans un capillaire sans gel rendait la séparation des analytes difficiles. Plus précisément, c'est en 1979 que Mikkers *et al.* publiaient

un article sur l'électrophorèse de zone à haute performance démontrant que la dispersion pouvait être contrôlée avec l'utilisation de tubes étroits [12].

Grâce à cette révolution, la technique de CE s'est taillée une place majeure parmi les méthodes de séparation. Un des atouts de CE est le faible volume d'analytes requis pour effectuer les analyses. Ceci devient très important lorsqu'il est question de traiter des échantillons provenant du milieu biologique où les quantités sont souvent minimales et très précieuses. La CE devient une méthode de choix pour l'analyse à haute efficacité de biomolécules. Par conséquent, c'est un domaine que l'industrie pharmaceutique et les recherches médicales ne peuvent ignorer pour demeurer compétitives vis-à-vis leurs concurrents. La CE a certainement une place de premier plan parmi les techniques de séparation modernes et cette place prendra de plus en plus d'importance avec l'amélioration des détecteurs. La faiblesse de CE est le manque de détecteur d'absorbance sensible dans le UV/visible. Les capillaires utilisés en électrophorèse possèdent un parcours optique excessivement petit ce qui amène une contrainte majeure pour la détection spectrophotométrique. Les détecteurs d'aujourd'hui sont acceptables mais les exigences des chercheurs des années 2000 seront de plus en plus grandes. C'est pourquoi toutes recherches en vue d'améliorer les limites de détection aident la CE à devenir une méthode de choix pour les années à venir.

### **1.1.1 Le fonctionnement de l'électrophorèse capillaire de zone (CZE)**

La CE est une technique de séparation puissante comportant plusieurs modes dont : l'électrophorèse capillaire en solution libre, typiquement appelé électrophorèse capillaire de zone (CZE), l'électrophorèse capillaire en milieu micellaire [13,14], l'électrophorèse sur gel (CGE) [15], la focalisation capillaire isoélectrique et l'isotacophorèse capillaire [16]. Le mode qui nous intéresse pour

les besoins de ce mémoire est l'électrophorèse capillaire de zone ou CZE. C'est en 1937 [17] que la littérature fait mention pour la première fois de l'électrophorèse de zone mais, bien sur, pas dans un capillaire.

La séparation par CZE résulte de deux composantes : le flux électroosmotique (EOF) et la mobilité électrophorétique ( $\mu_{\text{ép}}$ ). Premièrement, le EOF est l'écoulement d'une solution électrolytique dans un capillaire dû à la mobilité électroosmotique. Ce phénomène est régi par la double couche électrique et l'électrolyte dans le capillaire qui, lorsque solvate, est attiré par un champ électrique variant entre 100 et 500 V/cm. Ce champ électrique provient d'un générateur de puissance qui confère une borne positive (anode) et négative (cathode) au capillaire (fig. 1.1) (voir la section 1.1.1.1). Deuxièmement, la mobilité électrophorétique dépend de la charge et de la masse d'un composé (section 1.1.1.2).

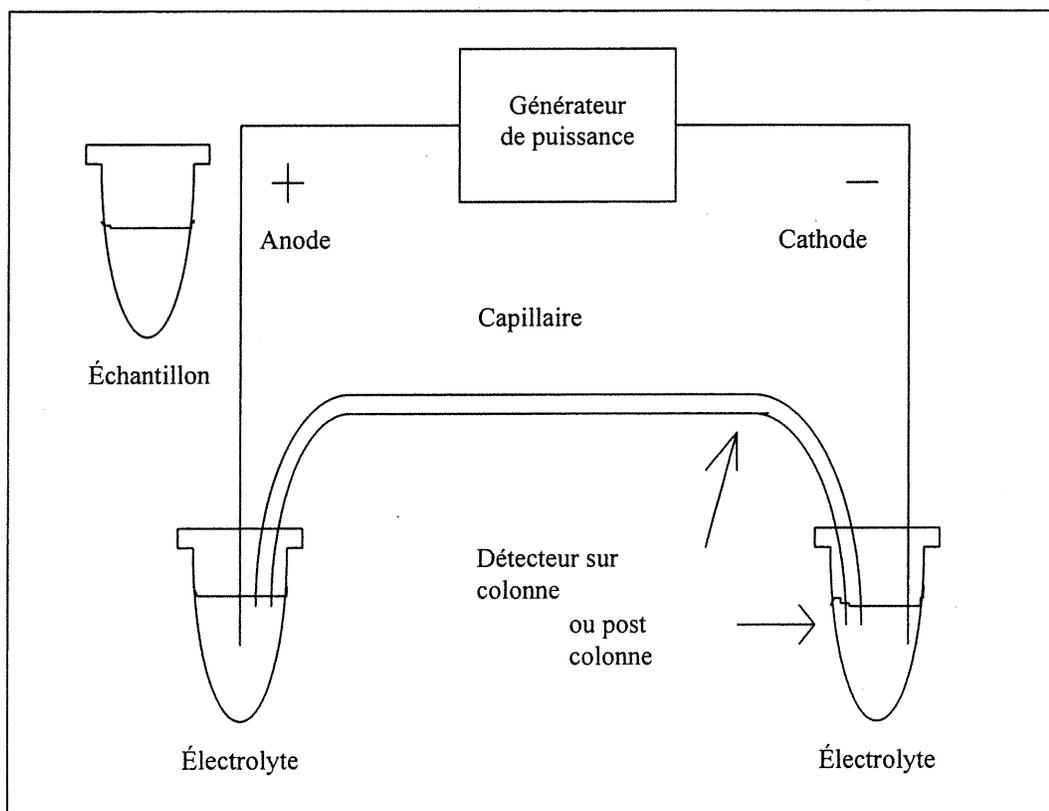


Figure 1.1 : Schéma d'un système d'électrophorèse capillaire.

### 1.1.1.1 Le flux électroosmotique (EOF)

Nos capillaires sont constitués de silice fondue (quartz). La silice fondue confère une charge négative aux silanols ( $\text{Si}-\text{O}^-$ ) à un  $\text{pH} > 2$ . Cette couche négative attire les ions positifs de l'électrolyte. Il se forme une couche adsorbée et une diffusée de l'ion positif provenant du tampon. Tous ces ions sont solvatés. Lorsque le champ électrique externe est appliqué, ces ions positifs et fortement solvatés provenant de la couche diffuse sont attirés vers la borne négative (cathode) provoquant un flux appelé flux électroosmotique (EOF). Tous les analytes, peu importe leurs charges, sont amenés vers la cathode. La détection se fait parfois à même le capillaire ou à la sortie de ce capillaire «post column detection» comme pour la détection électrochimique qui est décrite aux chapitres 4 & 5 de cet ouvrage.

Le capillaire est ceint d'une couche de poly imide qui amène une certaine durabilité au capillaire et l'empêche de se rompre à la moindre flexion.

Le flux électroosmotique observé lors de l'application du potentiel de séparation est défini comme suit :

$$v = \frac{\varepsilon \zeta E}{4\pi\eta} \quad (1.1)$$

où :  $v_{\text{eo}}$  : *vélocité électroosmotique ou EOF (cm/s)*

$\varepsilon$  : *constante diélectrique du milieu*

$\zeta$  : *potentiel zêta (V)*

$E$  : *force du champ électrique (V/cm)*

$\eta$  : *viscosité du milieu (cP)*

La beauté de ce EOF est son profil d'écoulement. Le profil du EOF possède une distribution linéaire (fig. 1.2) par rapport à la chromatographie liquide dont le profil du flux hydrodynamique est parabolique. Ceci confère une efficacité de séparation supérieure au CE par rapport à la chromatographie liquide. En chromatographie liquide, nous observons un gradient de vitesse radiale de la phase mobile à travers la colonne. La vitesse du soluté est plus grande au milieu de la colonne et est nulle près des parois. Faute de flux laminaire, la diffusion latérale des solutés cause l'élargissement des pics et, il y a perte d'efficacité de séparation en chromatographie liquide (LC). L'absence de phase stationnaire en CE annule les chances d'observer d'autres mécanismes de dispersion comme la diffusion d'Eddy. En LC la principale cause de diffusion des pics est la résistance au transfert de masse entre la phase stationnaire et la phase mobile, un phénomène qui n'existe pas en CE.

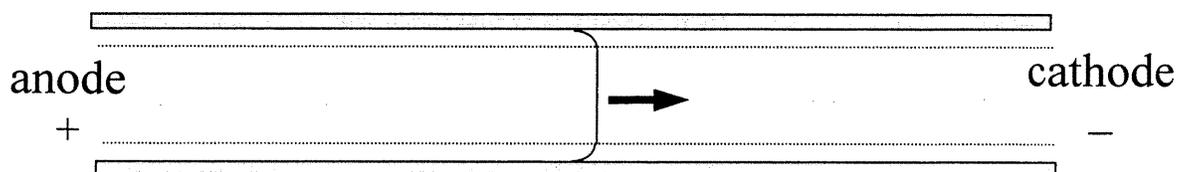


Figure 1.2 : Profil du flux électroosmotique dans le capillaire.

Le EOF est fonction de deux facteurs : le champ électrique,  $E$  (équation 1.1), et l'électrolyte dont le pH et la viscosité affectent grandement ce EOF. Il est démontré que plus le pH est bas, moins les parois interagissent avec les cations de l'électrolyte amenant un faible EOF, car le pKa des silanols est d'environ 6 (dans une solution aqueuse). Un pH élevé augmentera le nombre de silanols déprotonés, cette charge négative attire les molécules positives provenant de l'électrolyte et ainsi augmente significativement le potentiel zêta,  $\zeta$ , et donc le EOF.

Selon Jorgenson *et al.* [18], qui ont étudié le phénomène de l'électroosmose, l'évolution du EOF avec une augmentation du pH suit la courbe de la figure (1.3). Cette allure est fonction, bien entendu, de l'acidité des silanols (composant majeur de la silice fondue).

La gamme de travail la plus utile pour l'analyse des bio molécules est entre un pH de 5 à 8, où la variation du EOF pour la silice fondue est la plus importante. Malgré cela, la stabilité du pH lors d'une expérience ne doit pas varier si l'on veut obtenir des mobilités électroosmotiques et des temps de migration reproductibles. Travailler à haut pH élimine une partie du problème de reproductibilité des temps de migration.

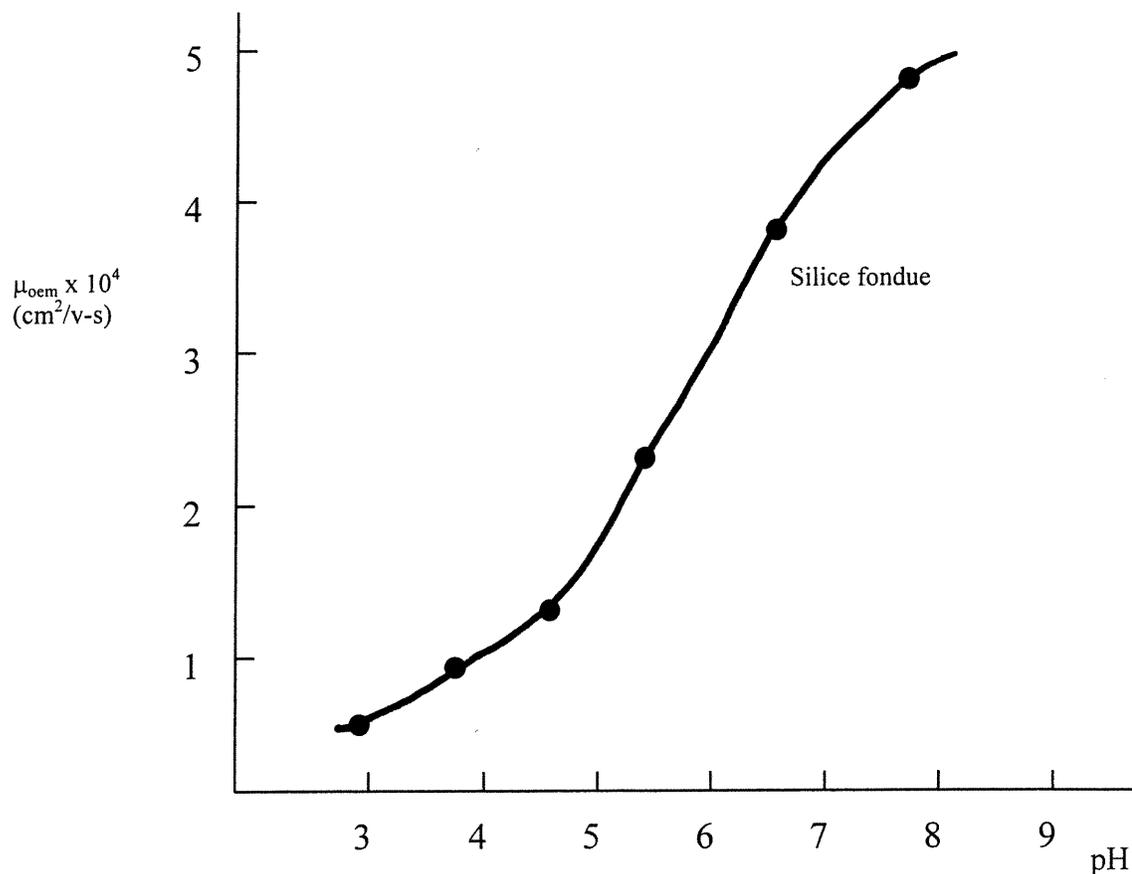


Figure 1.3 : L'effet du pH sur le EOF avec une solution ayant une force ionique constante ( $I = 0,06$ ) [18].

### 1.1.1.2 La mobilité électrophorétique ( $\mu_{ep}$ )

Le EOF est créé en appliquant le potentiel de séparation en présence d'un électrolyte. Il force les analytes au détecteur sans se soucier de leurs charges. La séparation surviendra avec l'apport d'une autre force : la mobilité électrophorétique. La solution électrolytique, dépendant de son pH, ionisera les analytes qui sont des acides ou bases faibles. Ces analytes possèdent une charge soit négative, positive ou neutre. Un analyte chargé négativement sera attiré vers l'anode, un analyte chargé positivement sera attiré vers la cathode et un analyte neutre ne sera pas attiré vers une borne en particulier. La mobilité électrophorétique (éq. 1.2), qui est la mobilité de la molécule seule sans influence du système du CE, est fonction de la charge de la molécule et du rayon hydrodynamique (rayon de Stokes) :

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta R} \quad (1.2)$$

où :  $\mu_{ep}$  : *mobilité électrophorétique*

$q$  : *charge net*

$\eta$  : *viscosité*

$R$  : *rayon de Stokes*

Étant donné que  $6\pi\eta$  est une constante lors de conditions expérimentales constantes et que le rayon de Stokes est proportionnel à la masse de la molécule ( $M_r$ ), l'équation (1.2) peut être réécrite de la façon suivante pour la plupart des acides faibles :

$$\mu_{ep} \propto \frac{q}{m} \quad (1.3)$$

La  $\mu_{ep}$  permet donc la séparation directe des molécules chargées selon leur rapport charge sur masse différentielle. La vitesse électrophorétique est donnée

par :  $v_{ep} = \mu_{ep}E$ . Pour réussir les séparations en CZE, les deux phénomènes sont combinés selon l'équation suivante :

$$v_{app} = v_{eo} + v_{ep} \quad (1.4)$$

où  $v_{app}$  : la vitesse apparente

$v_{eo}$  : la vitesse électroosmotique de l'électrolyte

$v_{ep}$  : la vitesse de l'analyte chargé

Les analytes doivent obligatoirement posséder une charge non nulle pour être séparés directement. La mobilité électroosmotique est normalement plus grande que les mobilités électrophorétiques, c'est-à-dire que même si l'on est en présence d'une  $\mu_{ep}$  négative, la mobilité finale et totale est en direction de la cathode. Les molécules neutres ne seront pas séparées avec cette méthode et parviendront toutes à la vitesse du EOF au détecteur.

L'ordre à laquelle les molécules feront leur apparition au détecteur est démontré à la figure 1.4. Notez l'impossibilité, ici, de séparer les molécules neutres.

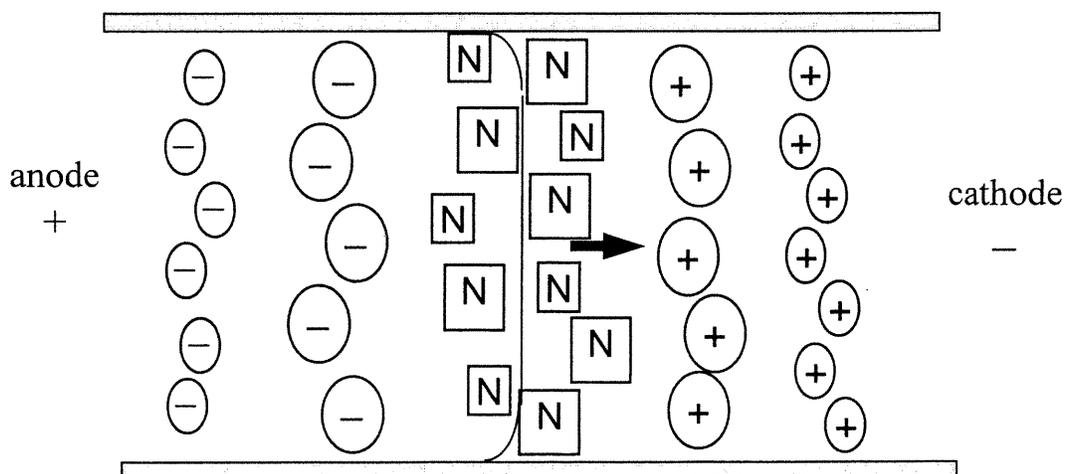


Figure 1.4 : Ordre d'élution des molécules pour une direction du flux électroosmotique de l'anode à la cathode.

### 1.1.1.3 L'effet de chaleur

L'effet de chaleur (appelé «Joule heating») dans le capillaire est directement relié au courant circulant dans le capillaire. Il y a dégagement de chaleur lorsqu'un courant électrique passe au travers un matériel résistif. Ce dégagement de chaleur est proportionnel à l'intensité du voltage et inversement proportionnel à la longueur du capillaire [19] selon l'équation 1.5.

$$\frac{dH}{dt} = \frac{iV}{LA} \quad (1.5)$$

où :  $dH/dt$  : *taux de génération de chaleur*

$i$  : *courant (A)*

$V$  : *voltage (V)*

$L$  : *longueur du capillaire (m)*

$A$  : *aire interne du capillaire (m<sup>2</sup>)*

### 1.1.1.4 Aspects quantitatifs en électrophorèse capillaire

#### Limite de détection (LOD)

Un des aspects importants en chimie analytique est sans contredit la limite de détection (LOD) [20]. La valeur trouvée comme LOD doit être précise et reproductible, c'est-à-dire qu'elle peut être réessayé plusieurs jours plus tard et donnée sensiblement le même résultat. Par définition, la LOD est la concentration de notre analyte qui émet un signal trois fois plus grand que l'écart type du bruit sur le signal de fond du blanc (en absence d'analytes). La LOD est aussi réalisable avec l'aide d'une droite d'étalonnage. Selon l'équation 1.6 [21] :

$$LOD = \frac{3\sigma}{s} \quad (1.6)$$

où :  $\sigma$  : écart-type du bruit sur le signal de fond  
 $s$  : pente de la droite d'étalonnage, signal vs concentration

## La résolution

La résolution est l'habilité d'un système à séparer deux produits. La résolution en CZE est définie par l'équation 1.7 :

$$R = \frac{1}{4} \frac{\Delta\mu_{ep} N^{1/2}}{\bar{\mu}_{ep}} \quad (1.7)$$

où :  $\Delta\mu_{ep}$  : différence entre les mobilités électrophorétiques des espèces  
 $\bar{\mu}_{ep}$  : mobilité électrophorétique moyenne des 2 espèces  
 $N$  : nombre de plateaux théoriques

Le nombre de plateaux théoriques,  $N$ , aussi appelé l'efficacité du système est donné par :

$$N = \frac{(\mu_{ep} + \mu_{eo})V}{2D} \quad (1.8)$$

où :  $\mu_{eo}$  : mobilité électroosmotique  
 $V$  : voltage de séparation  
 $D$  : coefficient de diffusion du soluté

Pour un pic Gaussien, on peut calculer  $N$  tout simplement en utilisant l'équation 1.9 :

$$N = 5,54 \left( \frac{t_m}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (1.9)$$

où :  $t_m$  : temps de migration

$w_{1/2}$  : largeur du pic à la mi-hauteur

Expérimentalement, on calcule la résolution à l'aide de l'équation suivante :

$$R = 2 \left( \frac{t_i - t_j}{w_i + w_j} \right) \quad (1.10)$$

où :  $t_i, t_j$  : temps de migration du pic  $i$  et  $j$

$w_i, w_j$  : largeur des pics  $i$  et  $j$

### Modes d'injection :

Plusieurs modes d'injection sont mis à la disposition des utilisateurs en CZE :

- injection électrostatique, c'est-à-dire l'application d'un potentiel pendant un temps donné,
- injection hydrodynamique,  $\Delta P$ , avec pression négative appliquée à la sortie ou pression positive appliquée à l'entrée du capillaire,
- injection hydrostatique,  $\Delta P$ , où l'on utilise la gravité pour injecter l'analyte.

Le mode d'injection utilisé dans cet ouvrage est l'injection hydrostatique. Elle est régie par l'équation 1.11 :

$$V_{inj} = \frac{\rho g \pi r^4 \Delta h t_{inj}}{8 \eta L_t} \quad (1.11)$$

où :  $\rho$  : densité de l'électrolyte de support (907,05  $\text{Kg m}^{-3}$  pour l'eau à 25 °C)

$g$  : indice de gravité ( $9,8 \text{ms}^{-2}$ )

$r$  : rayon du capillaire (m)

$\Delta h$  : hauteur de l'injection par rapport au niveau de l'électrolyte de support à la cathode

$t_{inj}$  : temps de l'injection (s)

$\eta$  : viscosité de l'électrolyte de support ( $10^{-3} \text{Kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$  pour l'eau à  $25^\circ \text{C}$ )

$L_t$  : longueur totale de la colonne (cm)

### 1.1.1.5 La détection en électrophorèse capillaire

Plusieurs détecteurs peuvent être couplés à un système de CE. Les détecteurs les plus populaires sont : le détecteur spectrophotométrique par absorbance ou fluorescence, le détecteur par indice de réfraction, le détecteur avec la spectrométrie de masse et le détecteur électrochimique.

Un des problèmes majeurs rencontré avec la détection spectrophotométrique est le petit parcours optique. La loi de Beer-Lambert (équation 1.12) démontre l'importance du parcours optique,  $l$ , qui est normalement de l'ordre de 10 à 50  $\mu\text{m}$  dans les capillaires de silice fondue.

$$A = \log (I_0 / I) = \varepsilon l c \quad (1.12)$$

où :  $A$  : absorbance

$I_0$  : intensité de la lumière incidente

$I$  : intensité de la lumière transmise

$\varepsilon$  : coefficient d'absorptivité molaire ( $\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )

$l$  : parcours optique (cm)

$c$  : concentration de l'analyte ( $\text{mol l}^{-1}$ )

La LOD est améliorée en augmentant les paramètres  $\varepsilon$ ,  $l$  ou  $c$ . Lorsque  $c$  est limité et l'analyte a un faible  $\varepsilon$  (sans dérivation avec un chromophore), il ne reste

que la longueur du parcours optique qui peut être modifiée. Trois méthodes intéressantes ont vu le jour pour contrer ce problème. Tout d'abord, il y a les capillaires rectangulaires dans lesquels  $l$  est d'environ de 200  $\mu\text{m}$ . Le bruit des capillaires rectangulaires est plus important mais l'augmentation du signal prédomine. Deuxièmement, il y a eu l'invention de la bulle à l'intérieur du capillaire appelé «bubble cell capillary», malheureusement, ces capillaires sont très fragiles et ne sont pas disponibles facilement. Le capillaire est soufflé en un point et le parcours optique du capillaire est par surcroît augmenté de trois fois plus que le diamètre interne du capillaire, i.e. de 30 à 150  $\mu\text{m}$ . Finalement, on retrouve les cellules de détection de forme «Z» où le chemin optique est 16 fois le diamètre interne du capillaire donnant une amélioration du rapport signal sur bruit de 10. Par contre, cette cellule ne fonctionne qu'avec un appareil commercial très dispendieux.

Les détecteurs de fluorescence sont extrêmement sensibles mais la majorité des molécules ne fluorescent pas. Il faut donc greffer par dérivation un groupement fluorophore aux analytes, une technique qui nécessite de longues manipulations et des concentrations d'analytes relativement élevées.

Le couplage de la CE et de la spectroscopie de masse (MS) présente certains avantages. Tout d'abord, la MS permet d'obtenir l'information structurale des composés séparés mais l'utilisateur doit être expérimenté et le prix d'un tel appareil est très élevé. De plus, si l'on prend l'exemple d'une séparation peptidique, certaines sources d'ionisation et certains analyseurs de masse permettent d'obtenir la séquence des protéines.

Une autre méthode pour contrer ces problèmes de petit parcours optique est d'utiliser une autre sorte de détecteur comme par exemple, un détecteur électrochimique. Le détecteur ampérométrique peut s'avérer une alternative intéressante. Cependant, ce type de détecteur n'est pas disponible commercialement pour la CE. Un exemple d'un tel détecteur est décrit dans la

section 3 (partie expérimentale) et une brève théorie est expliquée dans la section 1.2 qui suit.

## 1.2 L'électrochimie

Une partie importante de la chimie utilise la mesure de courant électrique pour des fins analytiques. En fait, l'électrochimie est l'étude des solutions d'électrolytes et des changements chimiques associés aux courants électriques aux électrodes immergées dans ces solutions [24]. Nous ne traiterons que des facettes de l'électrochimie nous concernant, c'est-à-dire la voltampérométrie cyclique (CV) et à la détection ampérométrique (AD). Une brève explication de la théorie sera décrite mais pour de plus amples informations, il est recommandé de consulter le livre de Bard & Faulkner [25].

L'électrochimie n'a pas encore percé le domaine du détecteur de routine pour l'électrophorèse capillaire. En fait, il n'existe à ce jour aucun détecteur ampérométrique commercial pour la CE. Le problème majeur rencontré est l'alignement entre l'électrode et le capillaire. Cet alignement a un effet important sur le signal analytique. Les chercheurs doivent construire eux-mêmes leurs détecteurs pour réussir à étudier la détection électrochimique. Les principes de bases de l'électrochimie sont présentés dans les sections suivantes.

### 1.2.1 Concepts de base de l'électrochimie

Un exemple de réaction hétérogène lors du processus de transfert de charge entre la solution et l'interface de l'électrode peut se traduire en une série d'étapes suivant l'exemple ci-dessous :



où *Ox* : espèce oxydée

*Réd* : espèce réduite

*a*, *n* et *b* : sont respectivement les nombres de moles

L'espèce oxydée (*Ox*) est transformée en une espèce réduite (*Red*) selon les étapes suivantes :

- a) Venant du cœur de la solution, il y a diffusion de l'espèce oxydée vers la surface de l'électrode.
- b) À la surface de l'électrode, il y a transfert des électrons pour former l'espèce réduite.
- c) Finalement, il y a diffusion de l'espèce réduite vers le cœur de la solution.

Cette réduction suit l'équation de Nernst.

$$E = E^{\circ} - \left( \frac{RT}{nF} \right) \ln \frac{A_{red}^b}{A_{ox}^a} \quad (1.14)$$

où : *E* : potentiel de ce système (V)

*E*<sup>0</sup> : potentiel normal apparent (V)

*R* : constante des gaz parfait : 8,3143 V C/Kmol

*T* : température (K)

*n* : nombre d'électrons dans la demi-réaction

*F* : constante de Faraday : 96 485 C/mol

*A* : activité (= 1 pour un solide, pour un liquide et un solvant pur, exprimé en mol/l pour des solutés et en atm pour des gaz)

Les courants d'oxydoréduction sont proportionnels à la concentration des analytes en solution. Une analyse qualitative et quantitative est possible. En

voltampérométrie, les courants observés proviennent de deux sources : le courant de charge et le courant faradaïque.

### 1.2.2 Courant faradaïque et courant de charge

Le courant faradaïque est en fait un processus régi par la loi de Faraday :

$$N = \frac{Q}{nF} \quad (1.15)$$

où :  $N$  : nombre de moles de particule oxydée ou réduite

$Q$  : charge (C)

$n$  : nombre d'électrons échangés lors de la réaction rédox

$F$  : constante de Faraday (96485 C/mol)

La charge,  $Q$ , est proportionnelle au temps et au courant par l'équation  $Q = i \cdot t$ . Le courant faradaïque provient du transfert d'électrons entre une électrode et une entité rédox. En fait, la quantité de produit formée électrochimiquement par un courant est proportionnelle à la charge passée dans l'électrolyte. La grandeur de ce courant est déterminée par les différents modes de transfert de masse expliqués dans la section 1.2.3.

Le courant de charge ou le courant de capacité est le résultat du bouleversement de l'interface électrode/solution avec un changement du potentiel de l'électrode en question. Ce phénomène non-faradaïque est conséquent des processus d'adsorption ou désorption des ions à l'interface électrode/solution et qui change par surcroît la capacité de la double couche électrique de l'électrode de travail. Cette double couche agit comme condensateur. Lorsqu'on applique un potentiel,  $E$ , à l'électrode de travail des charges s'accumulent à sa surface et créent la double couche électrique.

### 1.2.3 Transfert de masse

Le processus de transfert de masse, qui contrôle la quantité d'espèces électroactives à l'interface, est à l'origine du courant faradaïque. Il survient par trois déplacements d'espèces en solution : 1) la migration qui est le mouvement d'une espèce chargée sous l'influence d'un champ électrique ; 2) la diffusion qui est le mouvement d'une espèce sous l'influence d'un gradient de concentration ; 3) la convection qui est le mouvement causé par l'agitation du milieu par des moyens mécaniques ou thermiques.

Tous ces modes de transfert de masse contribuent séparément au courant faradaïque. Pour une analyse quantitative, il est nécessaire d'éliminer le courant de migration. Le soulagement de ce courant se fait avec l'appui d'un électrolyte de support. Cet électrolyte est composé d'ions qui ne peuvent subir aucune oxydation ou réduction au potentiel appliqué lors de l'analyse des échantillons. Un excès d'électrolyte de support est ajouté à la solution et annule ainsi presque entièrement le courant de migration de l'analyte.

Le transfert de masse par convection est éliminé par une absence de mouvement dans la solution. Ce courant est alimenté par une agitation de la solution par brassage manuel ou par gradient de température. Ce phénomène est généralement éliminé car il amène des réponses non-linéaires en voltampérométrie. Il est parfois intéressant d'étudier ce courant avec l'aide d'une électrode à disque rotatif ou dans un système utilisant un débit d'électrolyte comme en CE.

Le transfert de masse par diffusion est sûrement le plus utile. Le phénomène de diffusion apparaît avec un gradient de concentration. Il se forme une couche de diffusion entre l'électrode et le cœur de la solution lors de l'oxydation ou de la réduction réversible d'une substance électroactive. L'espèce électroactive se promène dans cette couche pour être oxydée et ensuite réduite. C'est-à-dire, lorsque l'on balaie le potentiel positivement, on arrive au potentiel d'oxydation de

l'espèce électroactive. Les molécules se trouvant à proximité de l'électrode sont subitement oxydées, ensuite, le potentiel est balayé vers un potentiel de moindre amplitude pour atteindre le potentiel de réduction et, naturellement, réduire les molécules réduites dans l'entourage de l'électrode.

#### **1.2.4 Voltampérométrie cyclique et détection ampérométrique**

La détection ampérométrique, utilisée tout au long de nos recherches, est l'application, à une électrode de travail, d'un potentiel constant suffisamment élevé (ou bas) pour oxyder (ou réduire) l'analyte d'intérêt (fig. 1.5). Le courant dû à cet oxydation ou réduction est proportionnel à la concentration d'analyte dans la solution. Nous avons recours à la voltampérométrie cyclique (CV) pour trouver le potentiel à appliquer. La CV est un balayage linéaire du potentiel entre deux limites en fonction du temps. Cette méthode permet de connaître les potentiels d'oxydation, de réduction et aussi de mesurer la hauteur du pic qui est proportionnelle à la concentration de nos analytes. Plusieurs renseignements sur le système rédox peuvent être obtenus en variant la vitesse de balayage. En résumé, la CV est quantitative car le courant est proportionnel à la concentration de l'espèce rédox et elle est qualitative car la réaction d'oxydoréduction se produit à un potentiel différent pour chaque composé électroactif. Le potentiel rédox dépend du caractère donneur ou accepteur d'électrons des ligands ou groupes fonctionnels.

Le chercheur peut lire les potentiels d'oxydoréduction de l'analyte lors de ce balayage (fig. 1.6). Le balayage du potentiel se fait entre l'électrode de référence, R, et l'électrode d'intérêt appelé l'électrode de travail, W. L'électrode de travail peut prendre place comme cathode ou comme anode et peut être soit solide ou liquide (électrode de mercure). Il y a une troisième électrode appelée contre électrode (ou électrode auxiliaire), C. Cette contre électrode sert à fournir les électrons nécessaire à la réduction ou à accepter les électrons provenant de

l'oxydation de l'analyte et compléter ainsi le circuit. Ces trois électrodes sont plongées dans la cellule contenant l'analyte et l'électrode de support.

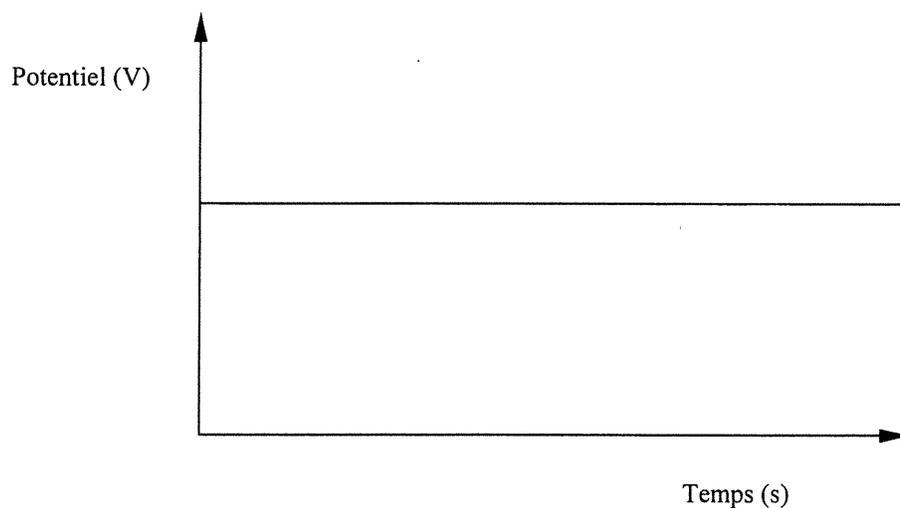


Figure 1.5 : Onde utilisée pour la détection ampérométrique.

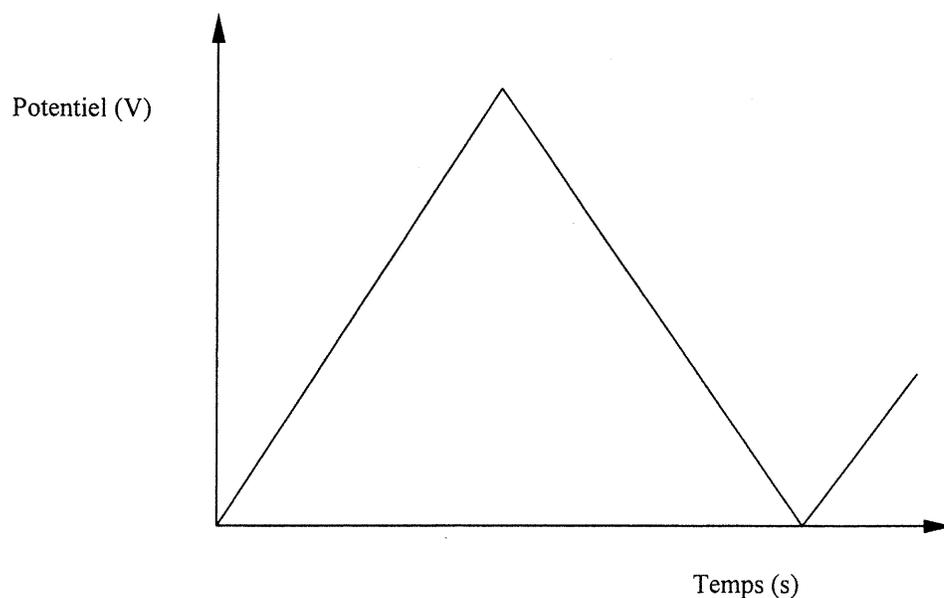


Figure 1.6 : Onde utilisée pour la voltampérométrie cyclique.

La figure 1.7 représente un voltampérogramme cyclique typique pour un système rédox réversible. Le courant faradaïque de diffusion est observé pour l'oxydation

et la réduction de l'espèce électroactive. Le courant observé augmente lorsque le potentiel balayé arrive soit au potentiel de réduction ou d'oxydation. Ces courants sont représentés respectivement par  $i_{p,r}$  et  $i_{p,o}$ . Une baisse du courant est aussi observée si l'on continue le balayage du potentiel. Cette baisse est due au manque d'analytes à oxyder ou à réduire dans l'environnement immédiat de l'électrode. Une ligne de base est tracée pour l'oxydation et la réduction. Elle sert à soustraire le courant de charge du courant total.

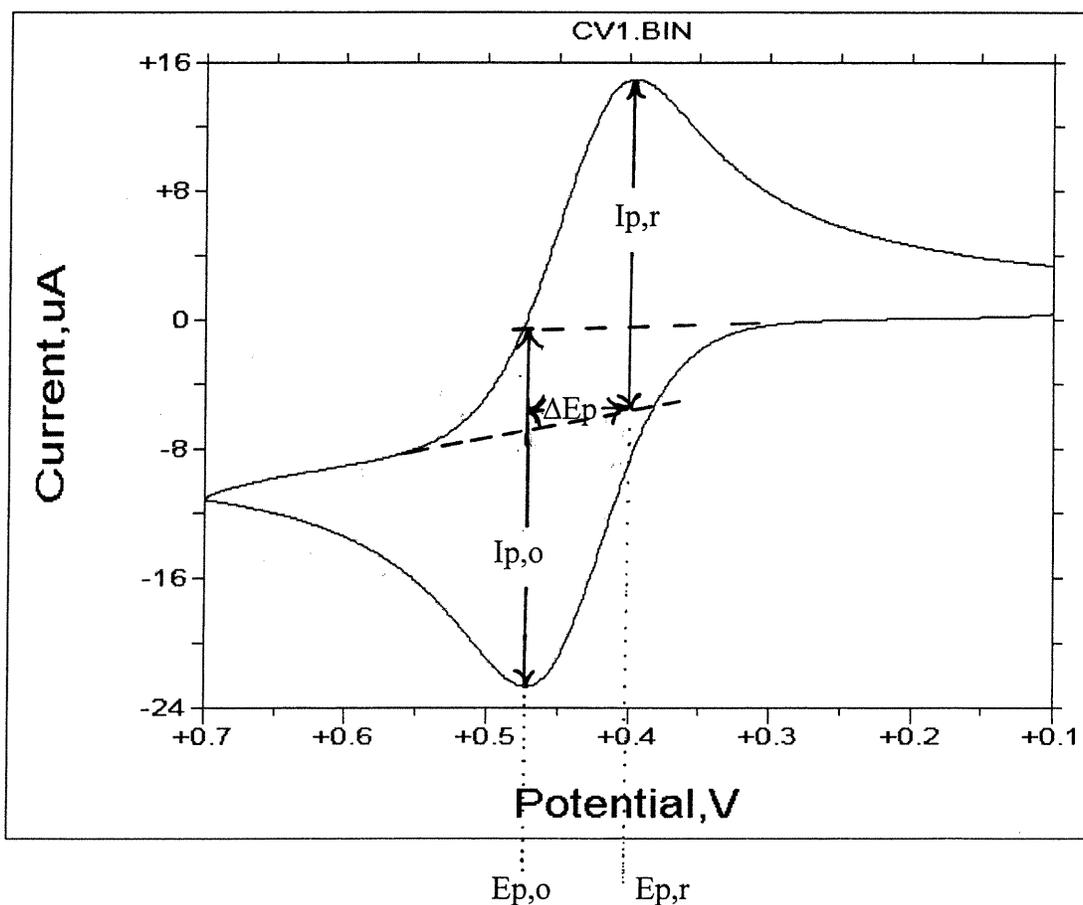


Figure 1.7 : Exemple d'identification des potentiels d'oxydoréduction lors d'un balayage cyclique du potentiel pour la CV, où  $\Delta E_p$  est la différence de potentiel entre les deux pics,  $E_{p,o}$  et  $E_{p,r}$  sont respectivement les potentiels aux pics d'oxydation et de réduction et  $I_{p,r}$  et  $I_{p,o}$  sont respectivement les courants d'oxydation et de réduction.

Une cinétique hétérogène réversible est observée lorsque  $\Delta E_p$  est  $(59/n)mV$ . L'équation 1.16 de Randles-Sevcik permet de trouver la concentration d'un

inconnu à partir de la hauteur du pic qui est le courant d'oxydation ou de réduction.

$$i_p = 0,443nFA \left( \frac{DnFv}{RT} \right)^{2/3} C_o \quad (1.16)$$

où :  $i_p$  : hauteur du pic (A)

$A$  : aire de l'électrode ( $cm^2$ )

$D$  : constante de diffusion de l'espèce ( $cm^2/s$ )

$v$  : vitesse de balayage (V/s)

$T$  : température (K)

$C_o$  : concentration de l'espèce électroactive ( $mol/cm^3$ )

Pour les besoins de cette étude, la voltampérométrie cyclique est utilisée seulement pour trouver les potentiels d'oxydation. La connaissance de ces potentiels pour les hydrates de carbone permet d'utiliser le détecteur ampérométrique. En fait, la détection ampérométrique sera le seul mode où une analyse quantitative sera étudiée.

### 1.3 Objectifs de projet

Un des objectifs de ce projet est la fabrication d'un potentiostat maison pouvant détecter de très faibles différences de courant. Ensuite, en collaboration avec M. Pascal Pérusse, on crée une interface entre ce système de détection pour la CE et un système informatisé de génération des potentiels et d'acquisition des données.

Un autre objectif est la fabrication d'une cellule du détecteur ampérométrique contenant la sortie du capillaire de séparation et les électrodes servant à la détection. Il faut construire une cellule facilitant l'alignement du capillaire avec l'électrode de travail. Pour s'assurer du bon fonctionnement du détecteur et du

logiciel, on reproduit des expériences de la littérature pour ensuite comparer nos résultats et ainsi trouver si nos réalisations sont adéquates ou non.

Le but final est la construction d'une toute nouvelle électrode de dioxyde de ruthénium pour la détection électrochimique des hydrates de carbone séparés par électrophorèse capillaire. Cette électrode est très sensible en CV pour la détection des sucres et ainsi, on vise une amélioration des limites de détection en CE.

## **2 Partie Expérimentale**

### **2.1 Choix de la dimension de l'électrode de travail**

Deux choix d'électrodes s'offrent à nous : les macro électrodes ( $\geq 100 \mu\text{m ID}$ ) ou les micro électrodes ( $< 100 \mu\text{m de ID}$ ). La majorité des groupes de recherche travaillent avec des microélectrodes [11,32-34]. L'avantage c'est qu'elles peuvent être insérées à l'intérieur même du capillaire, tandis que nous, on préfère utiliser une macroélectrode d'un diamètre de  $100 \mu\text{m}$ . Ces dernières électrodes sont plus faciles à manipuler et elles ne demandent aucun découpleur de courant entre le CE et ED car l'électrode est placée à une distance raisonnable du capillaire. Le découpleur est difficile d'utilisation car il brise souvent et seulement une personne expérimentée peut l'utiliser aisément. Notre but est de construire une cellule de détection électrochimique que tout le monde (non-électrochimiste) peut utiliser sans aucune difficulté. Pour arriver à ceci, les macroélectrodes doivent préférentiellement être utilisées.

### **2.2 La cellule électrochimique**

La construction de la cellule électrochimique est une partie importante de ce projet car son design influence fortement les résultats de détection. Premièrement, on construit une cellule avec laquelle la détection «end-column» sera réalisée, c'est-à-dire, que l'électrode de travail sera mise à l'extrémité de la sortie du capillaire et non pas à l'intérieur. De plus, une macroélectrode sera utilisée pour toutes les détections électrochimiques. D'abord, la technique de détection «end-column» élimine le besoin de découpler le courant provenant de la séparation par CE qui enlève une des difficultés de la détection [26]. Deuxièmement, les macroélectrodes sont beaucoup plus faciles à construire et à aligner que les microélectrodes et la commercialisation est par conséquent une option.

L'alignement de l'électrode de travail et du capillaire est une étape primordiale. Pour obtenir des limites de détection raisonnables, l'extrémité (sortie) du capillaire doit être alignée avec le bout de l'électrode. Ceci est une étape délicate car le capillaire possède un diamètre interne entre 10 et 50  $\mu\text{m}$  et l'électrode choisie a un diamètre de 100  $\mu\text{m}$  ou plus. Plusieurs méthodes de construction des cellules nous ont aidé à la fabrication de la cellule finale [11,27-31] Pour réaliser ceci, plusieurs cellules ont été conceptualisées et construites mais dans bien des cas sans succès.

La première cellule de détection électrochimique (fig.2.1) consistait en une bouteille de plastique de 250 ml fermée et étanche. La bouteille est percée à une extrémité (base) dans laquelle on insère un bout de pipette Eppendorf de 1 ml qui sert de guide à l'électrode de travail. Par ce bout de pipette arrive l'électrode de travail. La position du capillaire, elle, est retenue par le bouchon et une couche de para film. Le capillaire est passablement stable en arrivant à l'électrode de travail. L'électrode parvient au capillaire par le bas de la cellule. Les deux joueurs sont jumelés ensemble dans le sens vertical. L'incapacité de voir à l'intérieur de notre bouteille et la fragilité du système n'ont permis d'observer aucune réponse. L'intérieur de la cellule est rempli d'électrolyte de support et les autres électrodes (références, contre électrode et la cathode) entrent par un trou percé sur le côté (fig. 2.1).

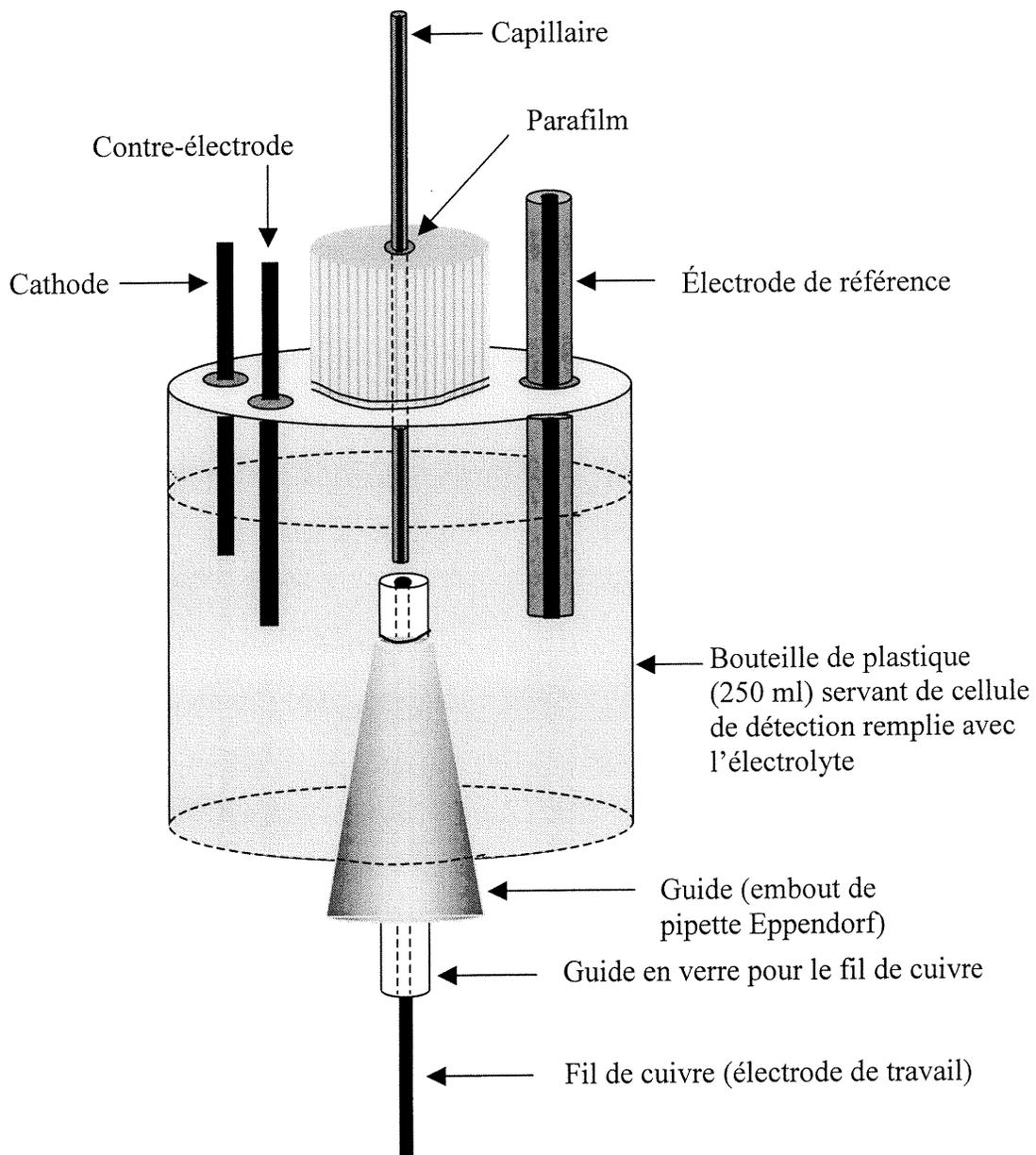


Figure 2.1 : Première cellule de détection élaborée.

La deuxième cellule de détection électrochimique (fig. 2.2) consistait en la construction de deux plaques de Plexiglas usinées (figs. 2.2a, 2.2b) afin d'aligner le capillaire et l'électrode de travail de façon fixe et stable. Le capillaire de diamètre externe de 365  $\mu\text{m}$  et l'électrode de travail de diamètre externe de l'ordre de 0,25 cm ( fig 2.2c) doivent être alignés ensemble. Pour ce faire, nous faisons construire deux plaques avec leurs profils respectifs imprimés dans le Plexiglas (encavure fig. 2.2a). Ces deux plaques sont jointes ensemble par 4 vis (fig. 2.2b). Il ne s'agit donc plus que d'insérer le capillaire et l'électrode de travail entre ces plaques et de visser les 4 vis. Le problème rencontré ici est que notre électrode de travail possède un diamètre externe beaucoup plus grand que le capillaire et le bout de cuivre est placé aléatoirement au milieu d'un tube de verre servant de cellule pour l'électrode de travail. La distance en Z est aussi très importante mais ne peut être vérifiée et est déterminée à l'œil. Toute cette cellule est, bien entendu, submergée dans un tube de verre étanche possédant l'électrolyte de support et où les 3 autres électrodes nécessaire à la séparation et la détection sont insérées dans ce tube.

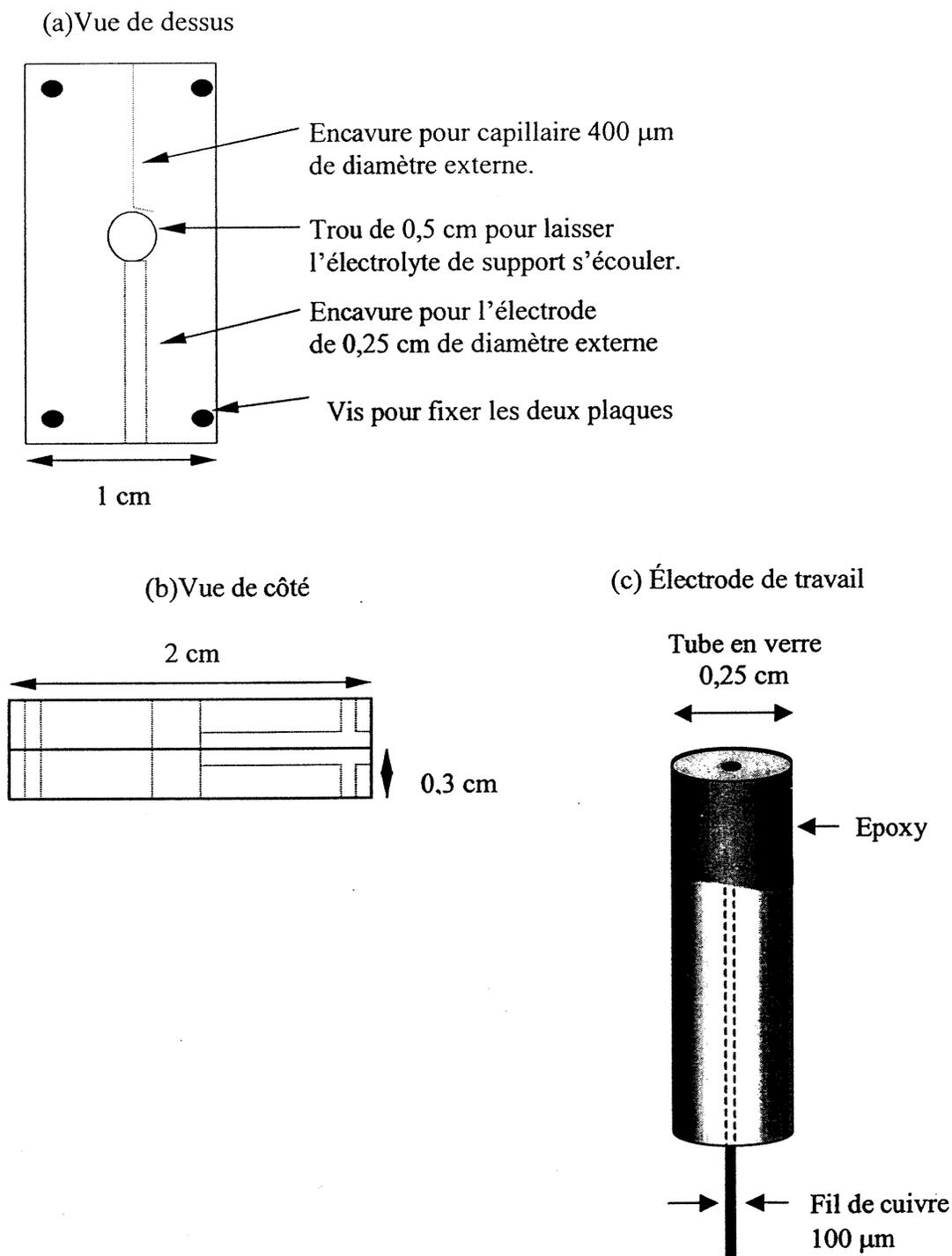


Figure 2.2 : Deuxième modèle de cellule, (a) vue de dessus, (b) vue de côté, (c) électrode de travail.

Comme troisième modèle de cellule de détection électrochimique (fig. 2.3), un micro positionneur a été utilisé pour varier la distance entre la sortie du capillaire et l'électrode de travail. Le capillaire est inséré dans ce micro positionneur et peut être approché ou éloigné à notre convenance pour optimiser la réponse. L'électrode est immobilisée avec une vis de l'autre côté du capillaire. Donc, à l'œil, on ajuste l'alignement du capillaire de gauche à droite et de bas en haut. Ensuite, la distance d'éloignement est ajustée avec le micro positionneur. L'électrode de travail est seulement placée sur une cellule eppendorf et on se sert de la tension de surface pour l'immerger dans notre électrolyte un peu comme le modèle de Baldwin [11]. Le capillaire, aussi, est déposé sur le rebord de la cellule Eppendorf et n'est submergé aussi que par la tension de surface de l'électrolyte de support. Ceci amène un problème évident, c'est-à-dire qu'il faut toujours être attentif et ne jamais laisser notre système fonctionner sans surveillance, car un petit écoulement ou simplement l'évaporation de l'électrolyte laisse notre électrode de travail à l'air libre. De plus, il ne faut pas oublier que l'on doit inclure à l'intérieur de cette même cellule les autres électrodes servant à la détection électrochimique et la cathode servant à la séparation électrophorétique. L'alignement de gauche à droite et de bas en haut n'est pas encore au point. Il faut continuer notre développement de la cellule et de fil en aiguille, la quatrième génération est née.

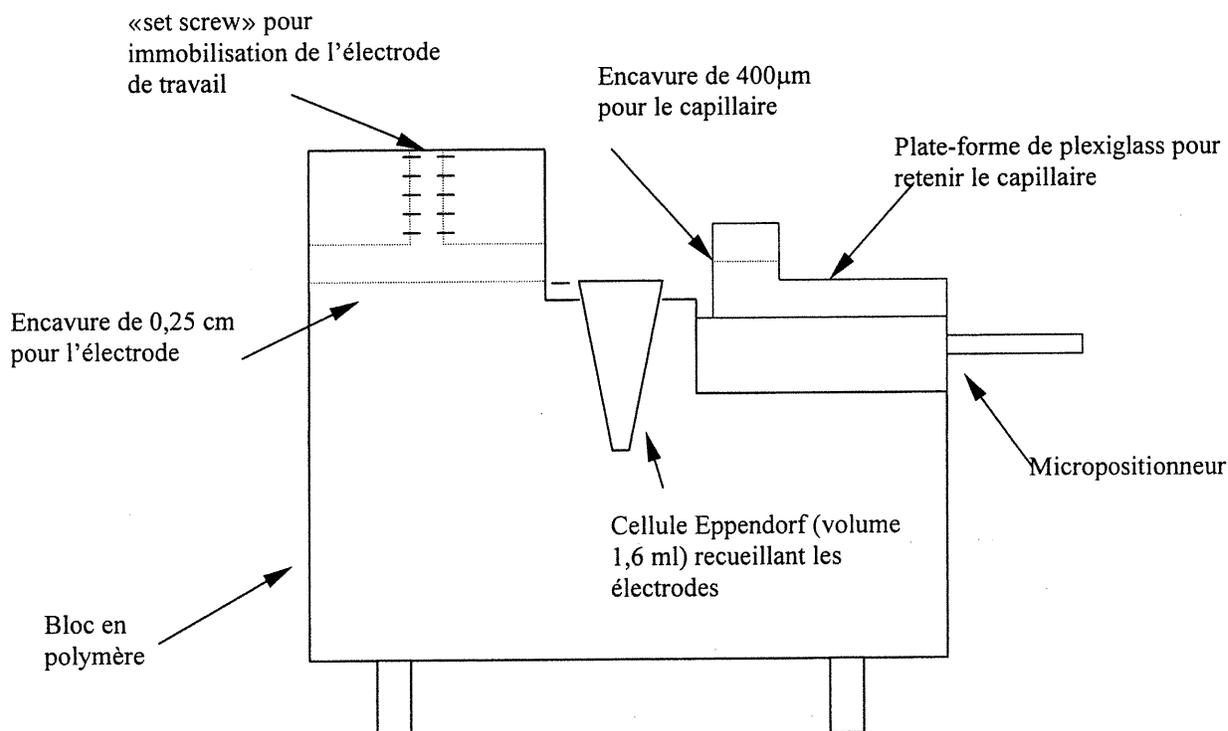


Figure 2.3 : Troisième modèle de cellule.

La quatrième sorte de cellule de détection électrochimique (fig. 2.4) est celle correspondant le plus à nos exigences. Elle requiert 3 micro positionneurs pour contrôler exactement les trois axes dans l'espace. Un microscope de marque StereoZoom® 5 BAUSH & LOMB 1.6-8X est aussi utilisé pour s'assurer de l'alignement entre l'électrode de travail et le capillaire. Donc, les électrophérogrammes sont plus reproductibles.

Le fonctionnement de cette cellule est le suivant : le capillaire se déplace de haut en bas (direction Z) et l'électrode se déplace dans les directions X et Y. Le capillaire arrive par le haut et est retenu par un des micro positionneurs de marque Newport UMR3.5 . Tandis que l'électrode arrive par le bas de la cellule et y est fixée par un joint femelle. Une paire de pince agrippe la cellule et la fixe à un

support d'aluminium, lui-même, vissé à un micro positionneur X. Ce dernier est vissé perpendiculairement à un autre micro positionneur Y. Le tout est déposé et immobilisé sur une planche de bois.

La cellule est constituée d'une bouteille à échantillon en verre de 20 ml à laquelle le souffleur de verre a introduit un joint femelle # 5 dans le fond de cette bouteille. L'électrode est fabriquée d'un joint mâle #5 qui est déposé, par le haut, naturellement dans le joint femelle #5. Tout ceci étant très étanche, on badigeonne quand même l'extrémité de l'électrode avec de la graisse de marque Dow Corning (Midlands, MI, USA) La graisse étant de nature hydrophobe, elle empêche l'eau de s'échapper par le bas. Il ne faut pas perdre de vue l'utilisation des autres électrodes, soit l'électrode de référence, la contre électrode et la cathode pour la séparation qui ne sont pas illustrées dans la fig. 2.4 pour des raisons de clarté.

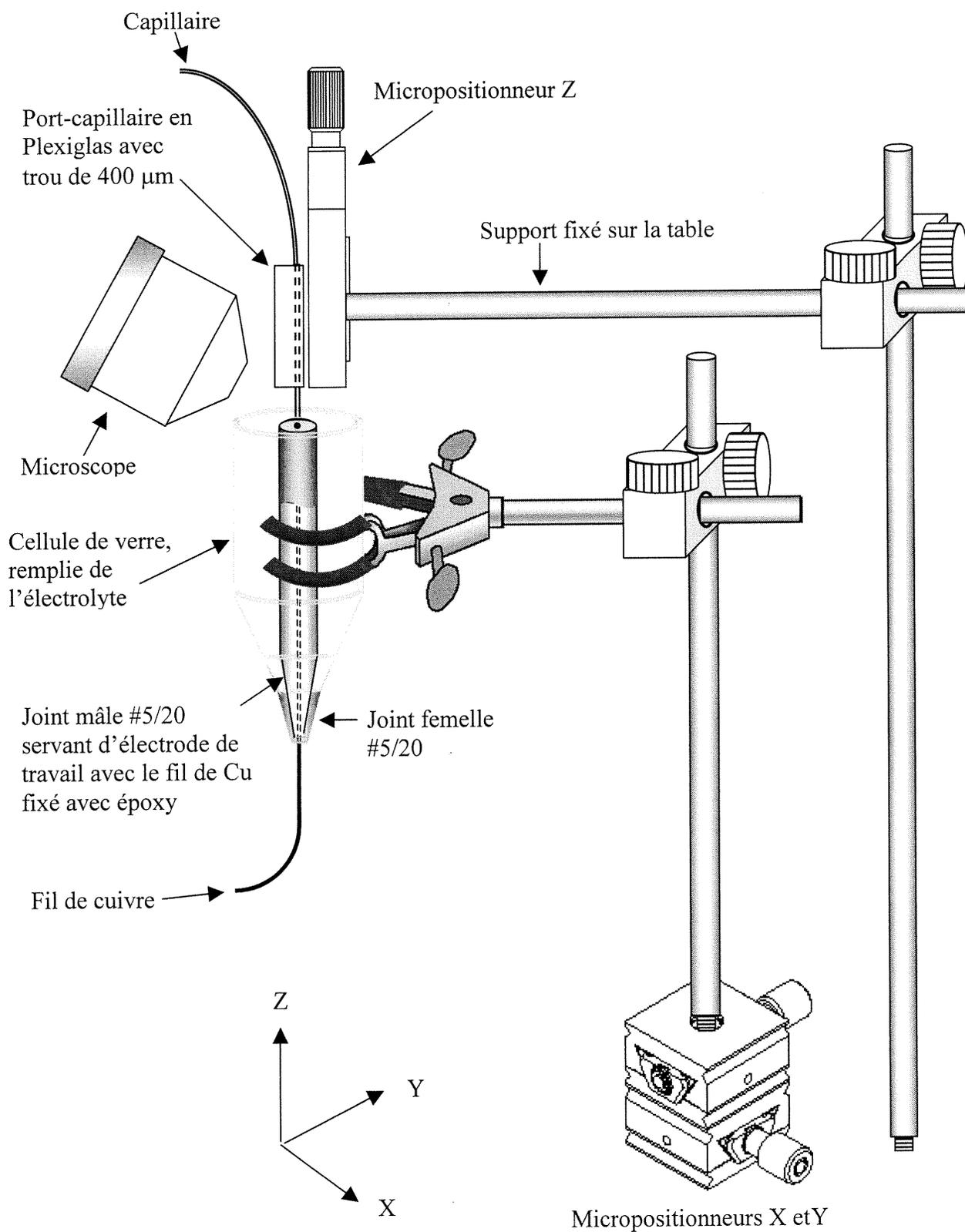


Figure 2.4 : Schéma de la cellule utilisée pour le système de détection électrochimique. La contre-électrode, l'électrode de référence et la cathode pour la CE ne sont pas montrées pour simplifier le schéma.

## 2.3 L'électrode de travail

### 2.3.1 L'électrode de cuivre

Le joint mâle #5 (fig 2.4) est aussi un tube de verre. On se sert de ce tube de verre pour réaliser l'électrode de travail. Un fil de cuivre est introduit à l'intérieur du tube et l'extrémité opposée au joint est remplie d'une colle polymérique de marque Polyscience, Inc. (Warrington, Pa, USA) avec la posologie suivante : vinylcyclohexene oxyde (VCD), 100 mg ; diglycidyl éther de polypropyleneglycol (D.E.R.), 40 mg ; nonenyl succinic anhydride (NSA), 260 mg ; diméthylaminoéthanol (DMAE), 4 mg.

Par action capillaire, la colle monte autour du fil de cuivre et bouche une extrémité du tube. Ensuite, on met les futures électrodes dans l'étuve à 70 °C pendant 8 heures. Cette colle ferme hermétiquement le tube. Seul l'extrémité du fil de cuivre (pris dans la colle) est exposé aux analytes. L'autre bout du fil de cuivre (joint mâle # 5) est, lui aussi, à l'air libre et sert de contact pour le détecteur ampérométrique. Un peu d'époxy 5 minutes de marque Easypoxy de Conap Inc. (Oleans, NY, USA) ferme le joint à l'autre extrémité mais laisse s'échapper le fil de cuivre. La dernière étape consiste à polir la surface de l'électrode, c'est-à-dire, que l'on veut obtenir un genre de disque uniforme incrusté dans la colle. Pour ce faire, il faut polir à l'aide d'un papier émeri 1200 le fil de cuivre sortant de la barrière de colle et exposé aux analytes. L'électrode est prête à être utilisée pour l'analyse.

Entre chaque journée d'analyse, l'électrode doit subir un léger polissage. Une rondelle de Microcloth® (Beuhler, Lake Bluff, IL, USA) est collée sur une plaquette de Plexiglas. Cette rondelle sert de surface rugueuse pour enlever toutes particules collées ou adsorbées à la surface de l'électrode. En plus de ce tapis,

une poudre d'alumine avec des particules de diamètre 0,05  $\mu\text{m}$  de marque Buehler est mélangée avec de l'eau pour donner une pâte qui aide au processus de nettoyage de notre électrode. La dernière étape consiste à laisser tremper l'électrode pendant 20 s dans un bain à ultrasons de marque Bransson 2200 (Danbury, Ct., USA) qui libère la surface de l'électrode de toutes les particules d'alumine.

### 2.3.2 L'électrode de dioxyde de ruthénium

Lors de ce projet, 3 types d'électrodes de dioxydes de ruthénium ont été utilisées. Le but est de trouver l'électrode se fabriquant le plus facilement possible tout en étant assez solide.

Première technique : une couche de dioxyde de ruthénium est déposée à la sortie du capillaire. De cette façon, l'alignement n'est plus nécessaire car cette couche agit comme électrode. Pour réaliser ceci, il faut brûler la couche protectrice de poly imide sur une distance de 1 cm à une extrémité du capillaire. Ainsi, il ne reste plus que la silice fondue qui sert de surface adhérente au ruthénium. Un sel de ruthénium ( $\text{RuCl}_3$ ) acheté chez Johnson Matthey (Materiels Technology, Royston, Angleterre) est oxydé en  $\text{RuO}_2$ . Le  $\text{RuCl}_3$  est mélangé avec de l'isopropanol et est badigeonné sur le bout du capillaire où il est chauffé à  $550^\circ\text{C}$  pendant 5 h.

Le capillaire ainsi construit avec une couche de  $\text{RuO}_2$  est très fragile, il faut faire extrêmement attention pour ne pas briser le bout lorsqu'on le manipule. Le joint entre le dioxyde de ruthénium et le fil électrique (pour transmettre le courant à l'enregistreuse) est réalisé avec une colle à chlorure d'argent de marque Epo-tek (Epoxy Technology Inc., Billerica, MA, USA) à deux parties.

Deuxième technique : l'électrode de ruthénium est fabriquée en diluant le  $\text{RuO}_2$  dans de l'isopropanol. Ensuite, l'électrode de carbone en est badigeonnée. La

couche de dioxyde de ruthénium sert de catalyse pour l'oxydation des sucres et le courant est conduit par le graphite.

Troisième technique : l'électrode est une pâte de carbone contenant des particules dispersées de dioxyde de ruthénium. Pour fabriquer cette pâte, on mélange en une proportion masse/masse de 20% dioxyde de ruthénium (préalablement synthétisé), plus 40% graphite de la compagnie Aldrich (Milwaukee, WI, USA), plus 10 ml d'éther. Ensuite, on évapore le mélange au rotavap et on ajoute 40% d'huile minérale lourde (Biopharm Inc. Laval, Québec).

La pâte est insérée dans des tubes de verre de différents diamètres internes, soit 250  $\mu\text{m}$  ou 400  $\mu\text{m}$ . Les tubes sont, en fait, des capillaires de chez Polymicro de longueur de 2 à 3 cm de long. Un fil de cuivre est inséré à l'intérieur du capillaire jusqu'à la pâte pour ressortir de l'autre côté et servir de conduit électrique. Ces capillaires sont immobilisés dans un joint mâle #5 identiquement aux électrodes de cuivre.

Dans cet ouvrage, la troisième technique de fabrication des électrodes de ruthénium est utilisée pour la réalisation de la détection électrochimique des sucres. C'est une méthode efficace pour notre système (cellule) et facile de manipulation.

## **2.4 Les appareils d'analyse**

### **2.4.1 La voltampérométrie cyclique**

L'appareil utilisé pour la voltampérométrie cyclique est un Bipotentiostat de modèle AFCBPI de la compagnie PINE Instruments (Grove City, PA, USA). L'enregistrement du signal est fait avec une table traçante X-Y Recorder de

Bioanalytical System (BAS, West-Lafayette, IN, USA). L'analyse se fait avec l'aide de 3 électrodes :

- une électrode de référence (Ag/AgCl)
- une contre électrode de platine (fabriquée dans notre laboratoire)
- une électrode de travail (celle à vérifier) soit de cuivre ou de dioxyde de ruthénium

L'électrolyte de support est le NaOH 0,1 M. Les balayages de voltage pour une analyse des sucres avec les électrodes de cuivre se fait entre 200 et 700 mV. Tandis que les même analyses avec une électrode de pâte de ruthénium se fait entre les potentiels -200 et 600 mV. La vitesse de balayage est de 100 mV/s.

#### **2.4.2 Le détecteur ampérométrique**

Deux détecteurs ont été utilisés aux cours de nos études : un de type commercial et l'autre fabriqué à l'Université de Montréal. Le premier détecteur ampérométrique, LC-4B de la compagnie BAS jumelé à une table traçante de marque Rec 80 Servograph (Copenhagen, Danemark) furent utilisés pour la première partie et ainsi, nous guider dans la réalisation du détecteur maison. Le deuxième détecteur est constitué d'un circuit électrique servant comme potentiostat et d'un logiciel créé à l'aide de LabVIEW (National Instruments, Austin, TX, USA). Ce programme contrôle l'onde de potentiel requis en ampérométrie et acquiert les données d'analyse (voir chapitre 3).

Le potentiostat, élaboré dans la section 3.1, est fabriqué de plusieurs composants:

- Une planche électrique de marque SC 2071 de National Instruments reliée à la carte d'acquisition des données (Lab PC 1200).
- 2 diodes de modèle Signal IN 914
- 2 amplificateurs de modèle : CA3140.E
- 2 condensateur en céramique de 0,01  $\mu$ F
- 1 condensateur en papier de 0,39  $\mu$ F

- 3 résistances de précision en carbone de : 1 M $\Omega$ , 100 k $\Omega$ , 10 k $\Omega$
- sélecteur de résistance.

Les connections sont soudées et les fils reliant les différents contacts sont fait de cuivre.

### **2.4.3 Le système de séparation CE**

La figure 2.4 illustre l'aménagement de l'air de travail ainsi que certains appareils mais ne fait pas mention de la source de haute tension ni de la cage de Plexiglas. Le générateur de voltage (Bertan Electronics, NY, USA) fourni des voltages de 0 à 20 kV. Le courant du capillaire est indiqué digitalement sur le boîtier qui est fabriqué par l'atelier électronique du Département de chimie de l'Université de Montréal. L'anode du potentiel de séparation est isolée dans une cage de Plexiglas où un dispositif de sécurité est installé, c'est-à-dire que le haut potentiel coupe lorsque la porte de la cage est ouverte évitant ainsi le risque de choc électrique.

### **2.4.4 L'ordinateur**

Une carte d'acquisition de donnée de marque Lab PC 1200 de National Instruments est incorporée à un Pentium 200 MMX pour la communication entre le potentiostat maison et l'ordinateur.

Les logiciels utilisés pour le fonctionnement de l'acquisition des données sont LabVIEW v.3.1 et le NI-DAQ v.4.0 de National Instruments.

## **2.5 Les capillaires**

Tous les capillaires ont été achetés chez Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA). Les diamètres internes (ID) des capillaires sont de 10, 20, 25 ou 50  $\mu\text{m}$  dépendant de l'expérience à réaliser. Les capillaires utilisés ont tous un diamètre externe (ED) de 365  $\mu\text{m}$  qui leur permet de bien tenir dans le micro positionneur.

La longueur des capillaires varie selon l'expérience mais, généralement, est de 55 cm.

## **2.6 L'électrolyte de support et solutions analytiques**

L'eau déionisée et déminéralisée (Milli-Q) est utilisée lors de la préparation des solutions à analyser et de l'électrolyte de support. Cet électrolyte est essentiellement une solution de NaOH. L'hydroxyde de sodium provient de la compagnie ACP Chemical Inc (Montréal, QC). Le pH de l'électrolyte varie entre 10 et 12 dépendant de la concentration du NaOH. Le pH mètre a été fabriqué par l'atelier électronique du département de chimie de l'Université de Montréal.

Les échantillons de sucres ( $\alpha$ -D(+)-glucose, D(+)-mannose, D(+)-galactose, D(+)-xylose proviennent de Sigma (St-Louis, MO, USA). La concentration des analytes varie selon l'expérience. Les conditions expérimentales sont décrites pour chaque expérience.

## **3 Réalisation d'un détecteur ampérométrique maison contrôlé par ordinateur**

### **3.1 Potentiostat maison**

Le circuit de la figure 3.1 servant de potentiostat provient d'un modèle trouvé dans la littérature [35].

La fragilité de ce système est sans doute son plus grand défaut. Il faut faire excessivement attention de ne pas surcharger les amplificateurs opérationnels (OA). Le brûlement des circuits intérieurs de l'OA est souvent provoqué par un mauvais branchement. Pour savoir si les OA fonctionnent toujours, on mesure le voltage à la borne de sortie et si la valeur est  $>13$  V, l'OA est brûlé. Les livres de Horowitz [36] et de Jung [37] indiquent ces particularités, c'est-à-dire, le bon fonctionnement des différents OA utilisables ainsi que les circuits électriques.

Pour éviter la surcharge, les fils électriques ont été préalablement isolés avec un survêtement robuste possédant un deuxième fil non-relié qui capte les charges libres. Le générateur de 15 V, lui aussi, possède des fils électriques de qualité supérieure et le lien entre le générateur et le contact avec l'OA est soudé solidement. Il ne doit y avoir aucun contact hésitant et fragile. Une cage de Faraday peut aussi être ajoutée pour isoler le circuit contre les champs électromagnétiques provenant de l'extérieur de la cellule, mais ces champs sont tellement petits que cette précaution devient inutile dans nos conditions.

Le circuit est stable et efficace si l'on fait attention à ces particularités. Les courants lus sont de l'ordre de pico à nano ampères même avec des OA de moyennes qualités.

La vérification de ce circuit a été réalisée avec l'aide de la voltampérométrie cyclique (section 3.4). On applique une onde triangulaire (provenant de l'appareil AFCBP1 de PINE) de notre circuit maison aux électrodes et le courant ainsi récolté repasse par le circuit pour arriver à un système d'acquisition de données. Ce système d'acquisition maison est, à son tour, vérifié en le comparant à un électrophérogramme analysé avec une table traçante (section 3.4).

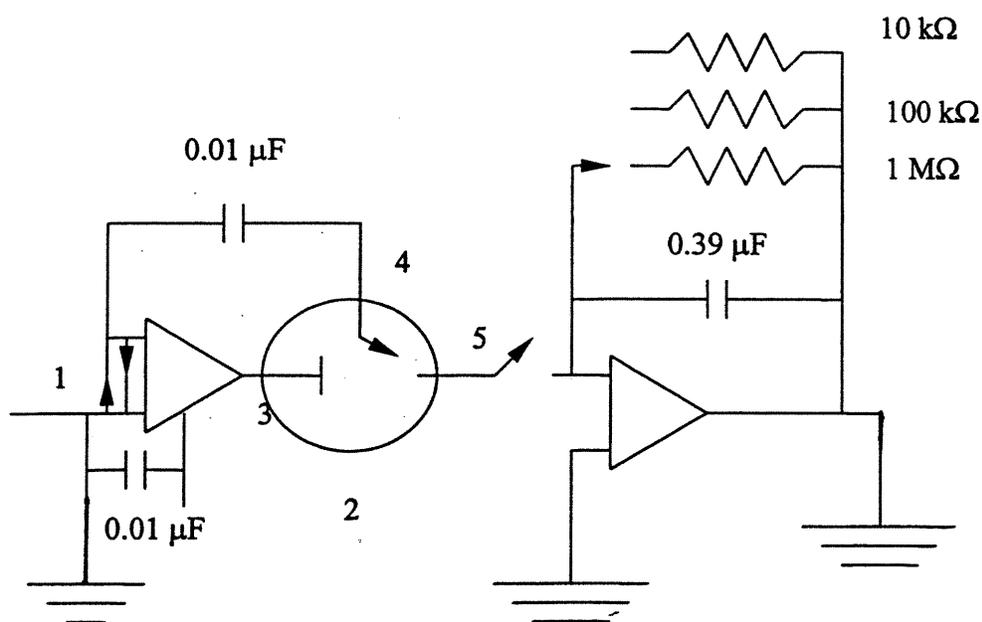


Figure 3.1 : Schéma du circuit [35], 1- diode de protection, 2- cellule de détection, 3- électrode auxiliaire, 4- électrode de référence, 5- électrode de travail.

### 3.2 Détection ampérométrique et système d'acquisition des données

Le détecteur ampérométrique maison est une combinaison du potentiostat maison (interface + système d'acquisition/traitement des données), du circuit maison, de la cellule contenant l'électrolyte de support, des électrodes et de la sortie du capillaire de séparation. La programmation du potentiostat virtuel réalisée avec LabVIEW par Pascal Pérusse<sup>1</sup> permet d'effectuer une simulation du panneau avant d'un détecteur ampérométrique commercial avec un système d'acquisition/traitement des données. Le panneau possède un bouton pouvant faire varier le potentiel appliqué entre l'électrode de travail et l'électrode de référence. Lorsque actionné, un message est envoyé à la carte Lab PC 1200 qui transforme ce message en un potentiel analogique souhaité. Lorsqu'il y a une réaction électrochimique, un courant circule entre l'électrode de travail et l'électrode auxiliaire. Ce courant repasse par un OA, est amplifié et converti en voltage pour être dirigé vers la carte Lab PC 1200.

La carte Lab-PC 1200 acquiert ce voltage et envoie un message à notre logiciel qui affiche ces courants en temps pseudo réel dans une fenêtre réservée à cet effet. C'est l'acquisition des données (fig. 3.2). Cette partie est très importante car elle permet une acquisition digitale au lieu d'analogue et facilite le rangement des données.

---

1- Étudiant M.Sc. avec Dónal Leech (directeur) en 1998 au département de chimie de la faculté des arts et sciences à l'Université de Montréal.

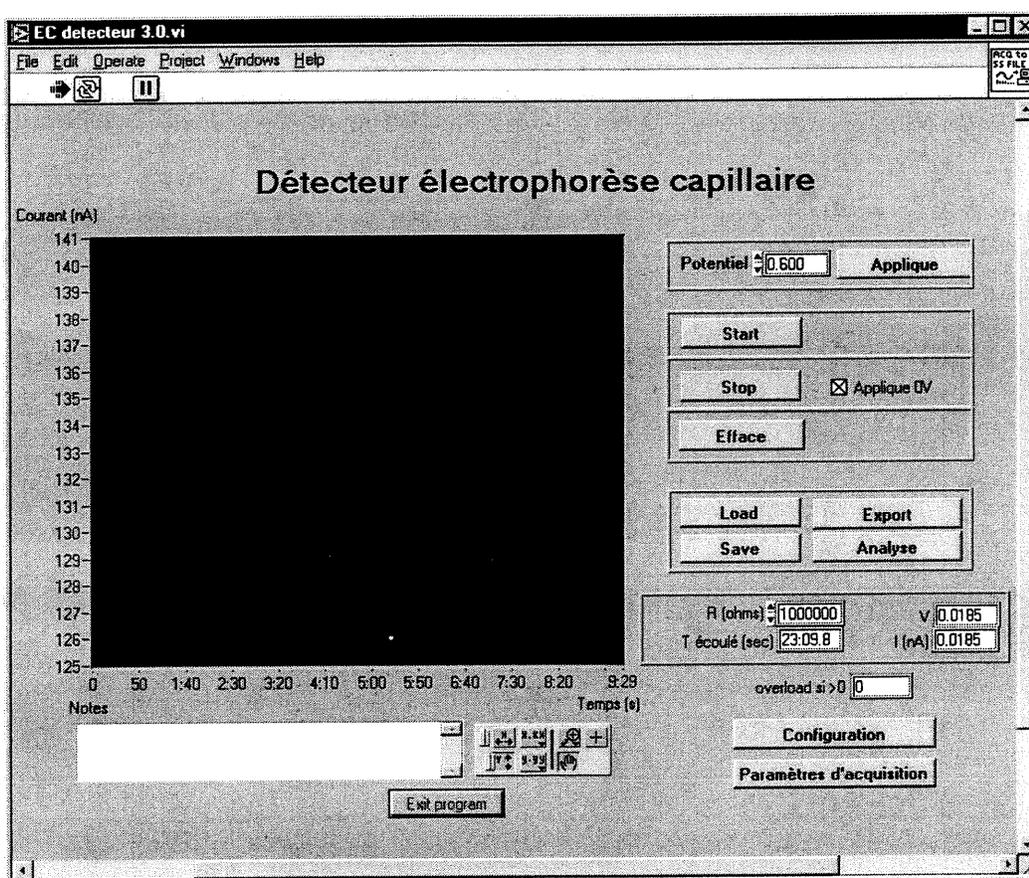


Figure 3.2 : Interface de l'appareil virtuel combiné au système d'acquisition des données.

### 3.3 Système d'analyse des données

Un système d'analyse des données a été créé avec le logiciel de programmation LabVIEW. Ce système peut calculer l'aire des pics obtenu ainsi que la hauteur. De plus, on a la possibilité d'exporter les données et d'utiliser le logiciel Origin version 4.1. (Microcal, Natick, MA, USA)

Pour bien visualiser le système d'analyse des données, il est approprié d'introduire le panneau de l'instrument virtuel, montré à la figure 3.3.

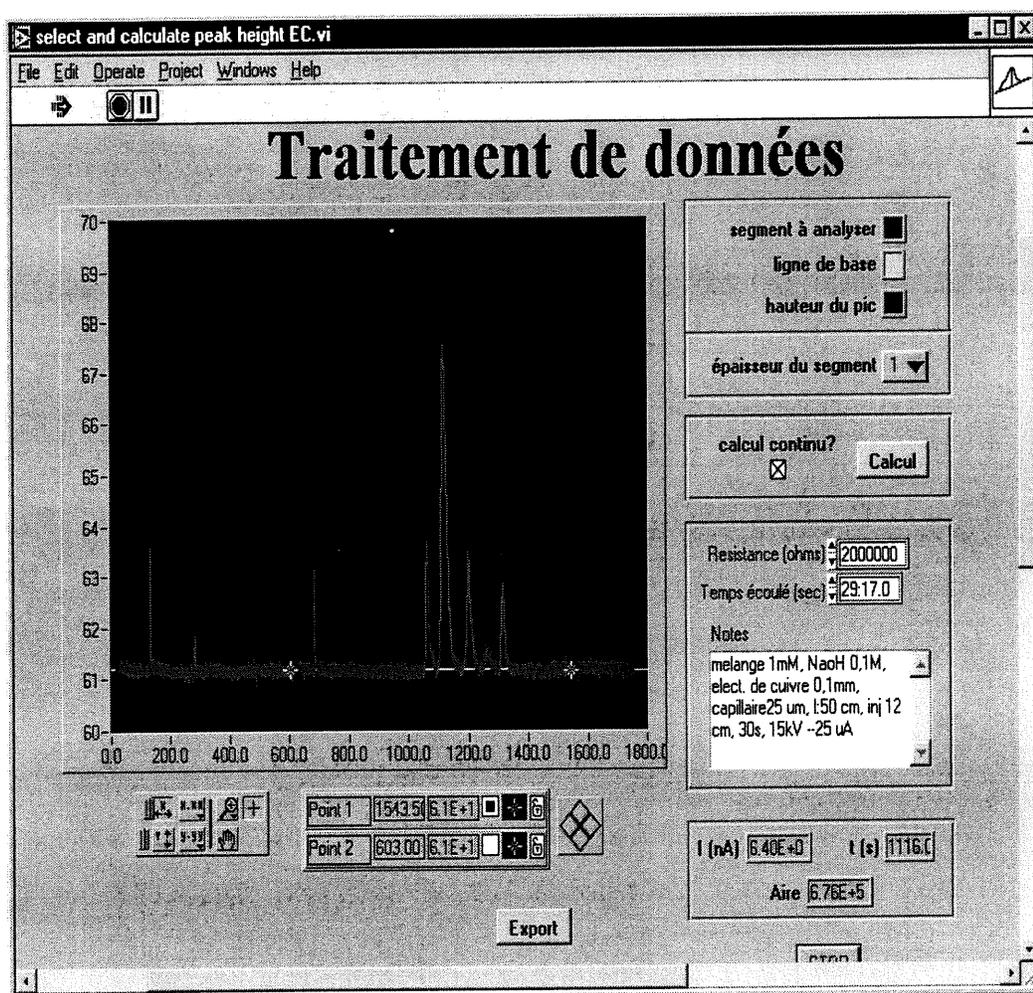


Figure 3.3 : Panneau de l'instrument virtuel pour l'analyse des données.

Premièrement, un code de couleur indique la signification des traits observés. Le trait du segment à analyser peut être de largeurs différentes (en ajustant le contrôle à cet effet). Ensuite, nous avons l'option de calcul, c'est-à-dire, que l'on a le choix de voir apparaître la ligne de base.

Un paramètre important est le «feedback» utilisée dans le circuit. Pour nos besoins une résistance de  $1\text{ M}\Omega$  est utilisée. Donc, pour l'obtention des résultats justes, il faut faire concorder la valeur des résistances (circuit électrique et panneau virtuel). Le logiciel transforme cette valeur amplifiée du circuit par la valeur de courant réel.

### **3.4 Vérification du système d'acquisition/traitement des données et de notre circuit**

#### **A. Système d'acquisition des données**

Le système maison fabriqué pour cet ouvrage doit être validé car il sert pour l'acquisition des données lors de nos expériences en CE. Il est primordial que ce système fonctionne bien avant de tirer comme conclusion que nos résultats viennent d'une réponse chimique et non d'un artefact électronique.

L'onde triangulaire est contrôlée par le PINE et les électrophérogrammes résultants sont comparés de 3 manières différentes :

- 1-Acquisition en mode analogique avec le potentiostat PINE où l'enregistrement est fait à l'aide d'une table traçante. Aucun traitement digital de données n'est réalisé.
- 2-Acquisition par mode digital avec notre système maison d'acquisition et de traitement de données (fig. 3.8).
- 3-Acquisition par mode digital avec notre système maison d'acquisition et traitement de donnée par Origin après leurs exportations de LabVIEW en format «Text file».

L'acquisition se fait en même temps sur notre système d'acquisition et de traitement de données virtuel et sur la table traçante. La comparaison est facilitée et exacte car elle provient du même signal.

Avec ces résultats, nous serons en mesure de connaître l'exactitude des résultats provenant du système d'acquisition et du système d'exportation des données.

Le courant correspondant à l'oxydation du  $\alpha$ -glucose est de 49,5 nA pour l'électrophérogramme enregistré sur la table traçante, 49,2 nA pour le même

électrophérogramme provenant du traitement des données par LabVIEW et de 49.0 nA par l'importation de ces données dans Origin 4.1. La moyenne est de 49.2 nA avec un écart-type relatif (RSD) de 0,5 %. Le tableau 3.1 montre la comparaison du signal et du bruit observé pour 3 essais de 2 différentes concentrations d'analytes entre l'acquisition/traitement décrit au cas 1 et l'acquisition/traitement décrit aux cas 2 et 3 ci-haut. Il confirme la fiabilité du système d'acquisition des données pour la réponse à un pulse de courant élevé. La comparaison quantitative est concluante, on peut affirmer que les valeurs récoltées par le système virtuel d'acquisition et de traitement des données sont justes et fiables (voir colonne % RSD au tableau 3.1).

Maintenant, si une analyse qualitative est effectuée, une différence est observable dans le fait qu'avec les données informatisées l'allure des pics est en échelle. C'est-à-dire que la montée du pic est saccadée (par petits segments). Ceci est dû à l'acquisition des valeurs qui se fait numériquement et non analogiquement comme la table traçante.

Dans le tableau 3.1 les valeurs de différentes injections ne sont pas très reproductibles en fait de hauteur du pic. Ceci est peut-être dû à l'injection qui n'est pas très précise(réalisée au chronomètre) ou simplement à notre système de détection où l'alignement entre le capillaire et l'électrode de travail peut bouger avec le temps. Cependant, il est intéressant de noter que le bruit sur le signal de fond calculé comme la différence maximale d'une oscillation sur le signal de fond reste constant à 2.0 nA peu importe la concentration de glucose où la méthode d'acquisition/traitement des données.

Tableau 3.1 : Comparaison du signal entre les données acquises avec la table traçante, le logiciel virtuel et le traitement des données par Origin.

	Logiciel d'acquisition Traitement par LabVIEW	Logiciel d'acquisition Traitement par Origin	Table traçante		
Concentration de Glucose (mM)	Hauteur du pic (nA)	Hauteur du pic (nA)	Hauteur du pic (nA)	Moyenne de hauteur du pic (nA)	RSD (%)
10	55.0	55.1	54.0	54.7	1.1
10	49.2	49.0	49.5	49.2	0.5
10	46.0	46.0	46.0	46.0	0.0
moyenne	50.1	50.0	49.8		
RSD(%)	9.1	9.3	8.0		
0,1	15.4	15.4	15.6	15.5	0.7
0,1	11.7	11.6	11.0	11.4	3.3
0,1	15.1	15.0	15.0	15.0	0.4
moyenne	14.1	14.0	13.4		
% RSD	14.6	14.9	18.0		

### B. Circuit maison.

La deuxième étape consiste à vérifier le fonctionnement de notre circuit. C'est une étape difficile et moins certaine car la comparaison des résultats ne se fait pas sur les mêmes expériences, c'est-à-dire que l'on doit effectuer plusieurs analyses de l'échantillon et faire une moyenne, ensuite, la comparaison des moyennes entre le circuit et le détecteur commercial, LC-4B (BAS), est réalisée. Le problème rencontré ici est que le courant d'oxydation varie beaucoup entre chaque journée d'expérience. Plusieurs facteurs (par exemple, l'alignement de l'électrode de travail et la sortie du capillaire, la qualité de l'électrode, le volume d'injection de l'analyte, la qualité du capillaire) sont difficilement reproductibles et font varier le courant d'oxydation.

Pour détourner ces problèmes, l'étude se porte sur des résultats connus. Par exemple, on étudie une solution de ferricyanure ( $K_3Fe(CN)_6$ ) avec la voltampérométrie cyclique. Le protocole [38] de D. Leech est suivi et l'on vérifie la loi de Randles-Sevcik [25]. La loi de Randles-Sevcik suit l'équation 3.1.

$$I_p = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} CAD^{1/2} v^{1/2} \quad \text{à } 25^\circ C \quad (3.1)$$

où :  $I_p$ : courant du pic (A) à 25 °C

$n$ : nombre d'électrons échangés à l'électrode

$C$ : concentration de l'analyte (moles/cm<sup>3</sup>)

$A$ : aire de l'électrode de travail (cm<sup>2</sup>)

$D$ : coefficient de diffusion (cm<sup>2</sup>/s)

$v$ : vitesse de balayage (V/s)

Premièrement, un voltampérogramme typique est obtenu (fig. 3.4). Cette figure a été obtenue avec l'appareil AFPCB1 (Pine Instruments). Le balayage du potentiel passe par le circuit maison pour se rendre aux électrodes. Les courants d'oxydation et de réduction reviennent par ce même circuit maison et se dirige vers la carte LabPC 1200.

Nous avons aussi étudié la linéarité de l'équation de Randles-Sevcik pour différentes concentrations de ferricyanure. La courbe de la figure 3.5 montre bien le fondement de cette équation par son domaine de linéarité pour les vitesses de balayages entre 1 mV/s et 900 mV/s. Nos résultats expérimentaux pour le ferricyanure sont comparés au coefficient de diffusion de la littérature. En utilisant la pente qui est de  $0,4306 \mu A/(mV)^{1/2}$ , et l'aire de l'électrode de travail (de  $0,021 \pm 0,007 \text{ cm}^2$ ) on trouve un coefficient de diffusion de  $7,35 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  pour le ferricyanure dans 0,1 M KCl. Ceci est semblable à la valeur de la littérature qui est de  $6,76 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ [39] et est donc acceptable.

La courbe de la figure 3.6 montre que notre circuit maison est fiable car la loi de Randles-Sevcik est vérifiée par la linéarité de la courbe suivante (coefficient de corrélation de 0,99999) (le courant de diffusion est bel et bien proportionnel à la concentration de l'espèce électroactive dans la zone linéaire de la figure 3.6).

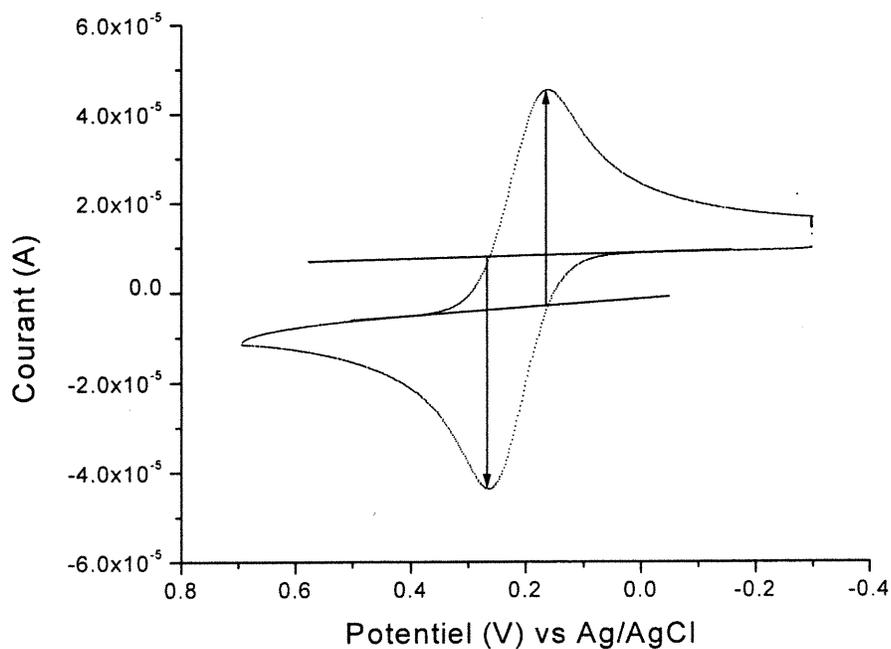


Figure 3.4 : Voltampérogramme typique de l'oxydo-réduction d'une solution de ferricyanure. Conditions : électrode de platine, vitesse de balayage de 100 mV/s dans un électrolyte qui contient le  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  à 9,78 mM.

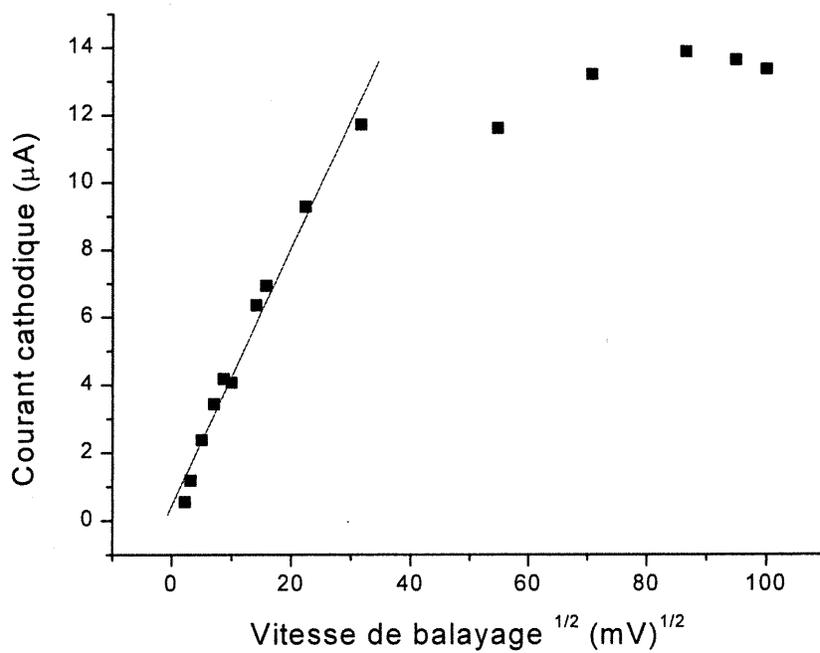


Figure 3.5 : Vérification du coefficient de diffusion du ferricyanure dans le KCl 0,1 M avec le potentiostat virtuel. Conditions : électrode de platine, milieu électrolytique qui contient  $K_3Fe(CN)_6$  à 9,78 mM.

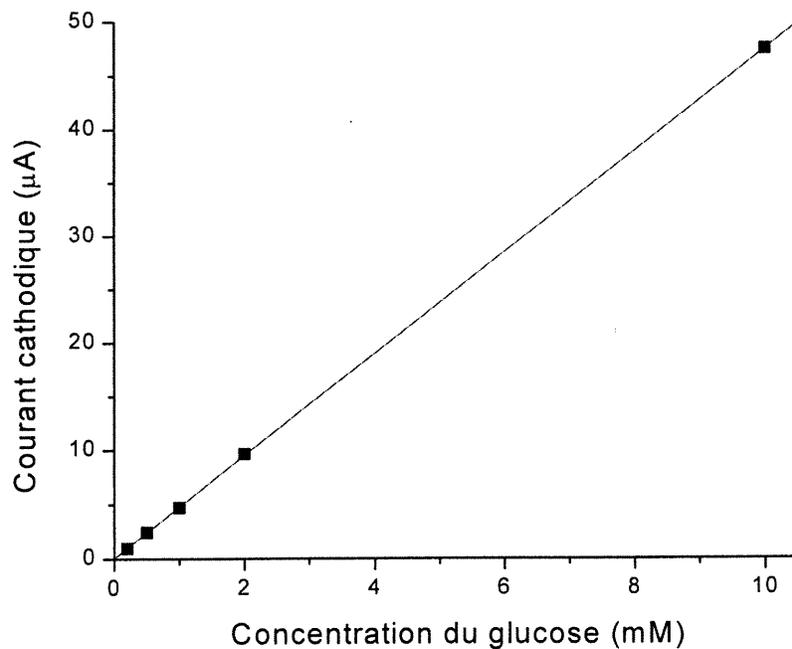


Figure 3.6 : Vérification de la loi de Randles-Sevcik. Conditions : électrode de platine, vitesse de balayage de 100 mV/s dans un électrolyte qui contient  $K_3Fe(CN)_6$  à 9,78 mM avec le potentiostat maison.

### C. Vérification du couplage de deux composants maisons: le système d'acquisition des données et le circuit

La dernière étape consiste à vérifier que le tout fonctionne ensemble. Le courant électrochimique en CE avec détection électrochimique est beaucoup plus petit qu'en voltampérométrie cyclique classique (environ 100 fois plus petit). Il faut s'assurer que le circuit soit assez sensible pour la détection en CE. Les deux figures suivantes (3.7 et 3.8) démontrent la réussite de ce couplage. Les courants observés sont de l'ordre de 200 nA pour l'analyte et le système détecte bien ces courants. Ainsi, on peut se servir de ce système pour réaliser nos expériences sur l'étude des différents composants de l'électrode de travail dans la détection des sucres. La figure 3.7 montre la différence de magnitude du bruit de fond avec un potentiel de séparation de 10 kV appliqué (de 0 à 400 s) et sans potentiel de séparation ( de 400 à 800 s).

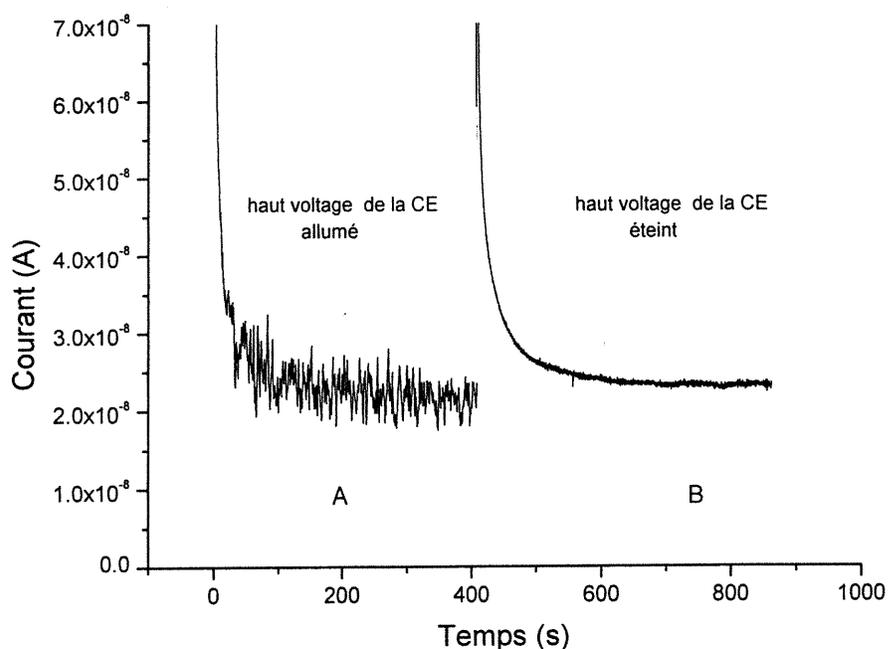


Figure 3.7 : Signal de fond électrophorétique avec le système maison montrant la différence dans le signal avec (A) et sans (B) potentiel de séparation appliqué. Conditions expérimentales : capillaire de  $50\mu\text{m}$  de diamètre et 50 cm de longueur, électrolyte ; NaOH 0,1 M, électrode de cuivre de 0,1 mm de diamètre.

Maintenant, il ne reste plus qu'à montrer la détection d'un sucre avec le système maison pour s'assurer de son bon fonctionnement. La figure 3.8 montre l'électrophérogramme du glucose réalisé en couplant notre circuit maison et notre système d'acquisition des données.

Cette partie a donné les résultats escomptés. Le logiciel couplé au circuit maison est complètement autonome. C'est-à-dire que nous n'avons besoin d'aucun autre appareillage pour simuler notre potentiel et acquérir les données. Par ailleurs, on est certain de l'exactitude des résultats obtenus car ces résultats ont été comparés à des résultats de la littérature et à des résultats obtenus avec des appareils commerciaux.

Donc, le circuit est efficace et peut être utilisé pour les expériences à venir.

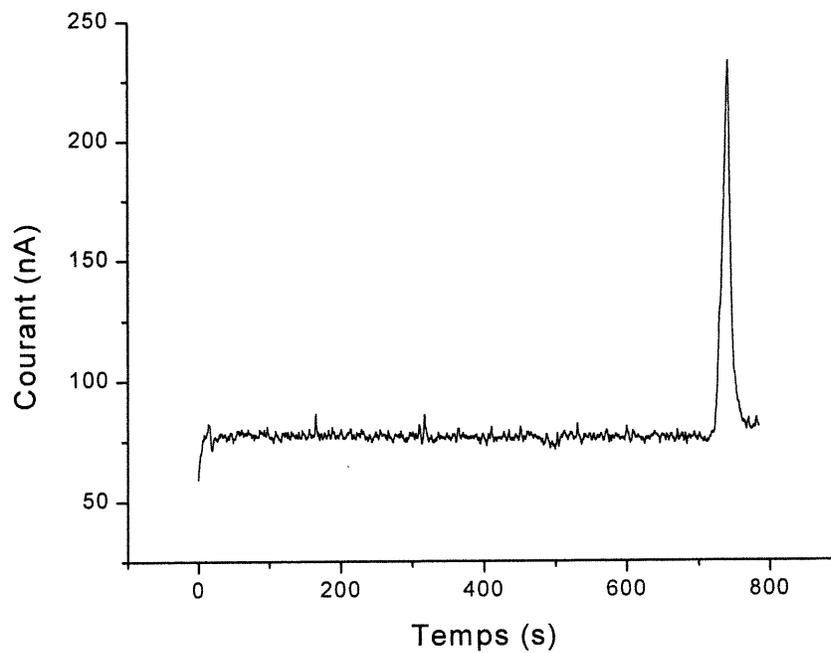


Figure 3.8 : Électrophérogramme réalisé en couplant notre circuit et notre système d'acquisition des données. Conditions Expérimentales: analyte; Glucose 0,1M, électrolyte ; NaOH 0,1M, temps d'injection ; 90s à une hauteur de 12 cm, électrode ; 0,1 mm de diamètre de cuivre, capillaire ; longueur : 55 cm, DI : 50 $\mu$ m, séparation 10 kV.

## **4 Séparation et détection ampérométrique des sucres par CE avec une électrode de cuivre**

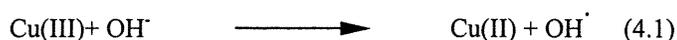
### **Introduction**

La quatrième partie de cet ouvrage traite de la détection ampérométrique des hydrates de carbones (sucres). Ce mode de détection est couplé pour la première fois à l'électrophorèse capillaire en 1987 par le groupe de Ewing [40]. Leurs macroélectrodes sont composées de carbone vitreux et servent à la détection des cathécoles. Ce mode de détection a pris de l'importance avec les années et prendra sûrement une place de choix parmi les détecteurs efficaces du 21<sup>ème</sup> siècle. Son application pour plusieurs analytes d'importance, qui sont difficilement détectables par d'autres méthodes, comme les peptides [41], les cathécoles [42], et bien entendu les sucres [43] obligent les chercheurs à se pencher sur ce mode de détection.

L'électrode de cuivre sera celle de choix pour tester notre montage. Plus particulièrement, l'électrode utilisée sera de diamètre normal, c'est-à-dire, plus grand ou égal à 100  $\mu\text{m}$  [11]. D'après l'étude de Vassilyev et al.[44] sur différents métaux pouvant servir comme électrode de travail, le surpotentiel d'oxydation obtenu avec une électrode de cuivre est considérablement plus élevé qu'avec des électrodes faites de platine ou d'or. L'électrode de cuivre est reconnue pour sa réaction catalytique dans l'oxydation des sucres. Il a été démontré qu'une étape importante dans l'oxydation des hydrates de carbones est l'interaction avec la couche oxyde/hydroxyde recouvrant l'électrode. Cette interaction a besoin de l'état oxydé du Cu(I) et aussi du Cu(II) après la formation de la couche. L'électrochimie du cuivre dans une solution très alcaline est assez complexe car des espèces solubles et insolubles sont produites [45]. Plusieurs études sur cette

électrode ont été publiées [46-52] et tous concordent pour dire qu'il y a trois états d'oxydation du cuivre (Cu(I), Cu(II) et (Cu(III)) près du potentiel d'oxydation de l'oxygène.

Pour l'obtention d'un courant d'oxydation maximal du glucose, la concentration en ions hydroxyles doit être assez élevée. En fait, c'est Abd El Halem et al. [49] qui ont proposé l'utilisation d'une solution alcaline avec une concentration des ions OH<sup>-</sup> supérieure à 0,1 M. La réaction hypothétique proposée vérifiant cette idée est expliquée par Marioli et al. [45] :



L'oxydation du cuivre en Cu(III), pour ensuite oxyder l'ion hydroxyle (réaction 4.1), a lieu vers 600 mV vs Ag/AgCl.

#### 4.1 Choix du voltage de détection

Une expérience de voltampérométrie cyclique est toujours réalisée sur les analytes à étudier. Le potentiel est balayé sur l'intervalle d'oxydo-réduction de l'analyte et on observe le courant maximal. Ce courant maximal correspond au potentiel optimum d'oxydation ou de réduction. Ce potentiel d'oxydation sera le minimum appliqué lors de l'analyse ampérométrique couplée à l'électrophorèse capillaire. La CV sert donc à connaître le potentiel d'oxydation ou de réduction des analytes. Pour un mélange d'analytes, le potentiel optimum sera évalué en effectuant quelques compromis entre le potentiel qui amènera les courants les plus élevés pour la moyenne des analytes et le potentiel qui affectera le moins le bruit pour un

rapport signal sur signal de fond optimum. La CV est aussi une bonne méthode pour vérifier l'efficacité des électrodes. Après la construction d'une nouvelle électrode, une expérience de voltampérométrie cyclique est effectuée pour s'assurer que le contact électrique est fiable et que l'électrode est étanche. Toutes ces méthodes sont expérimentales et sujettes à de multiples erreurs il est donc primordial de vérifier et de s'assurer que l'électrode fonctionne bien avant de la coupler avec l'électrophorèse capillaire qui amènera d'autres problèmes. Une CV avec une électrode de cuivre est illustrée à la figure 4.1.

On remarque que sur la figure 4.1, vers 350 mV, le glucose commence à être oxydé. Vers 600 mV la réaction d'oxydation est assez importante et correspond à un bon compromis entre le courant maximum et le signal de fond.

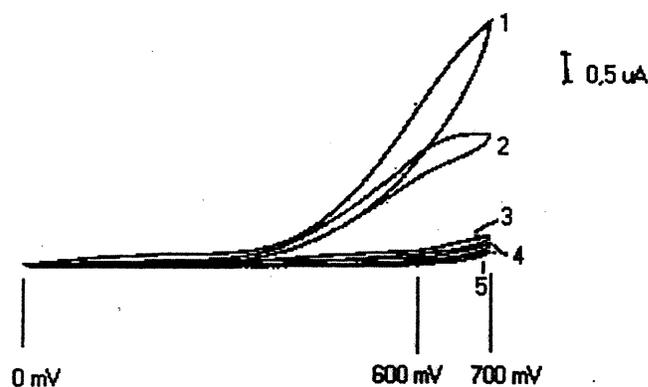


Figure 4.1 : Voltamérométrie cyclique du glucose avec une électrode de cuivre.  
Conditions expérimentales: électrode de cuivre de 0,1 mm de diamètre, vitesse de balayage: 100 mV/s, borne de balayage: de 0 mV (gauche) à 700 mV (droite), concentration en glucose : 1) 0,1 M, 2) 0,01 M, 3) 1 mM, 4) 0,1 mM, 5) aucun glucose.

Une autre étude sur le potentiel optimum est réalisée en utilisant la détection ampérométrique à un potentiel fixe suivant l'injection de glucose dans le système (fig. 4.2). On fixe le potentiel (entre l'électrode de travail et l'électrode de référence) entre 100mV et 700mV et on lit le courant d'oxydation du glucose. Cette expérience démontre clairement que le potentiel optimum est 600 mV pour

l'oxydation du glucose avec l'électrode de cuivre. Lorsque l'on dépasse cette valeur, le signal provenant de l'oxydation des sucres augmente mais le bruit du signal de fond augmente plus rapidement causant une diminution du rapport signal sur le bruit du signal de fond.

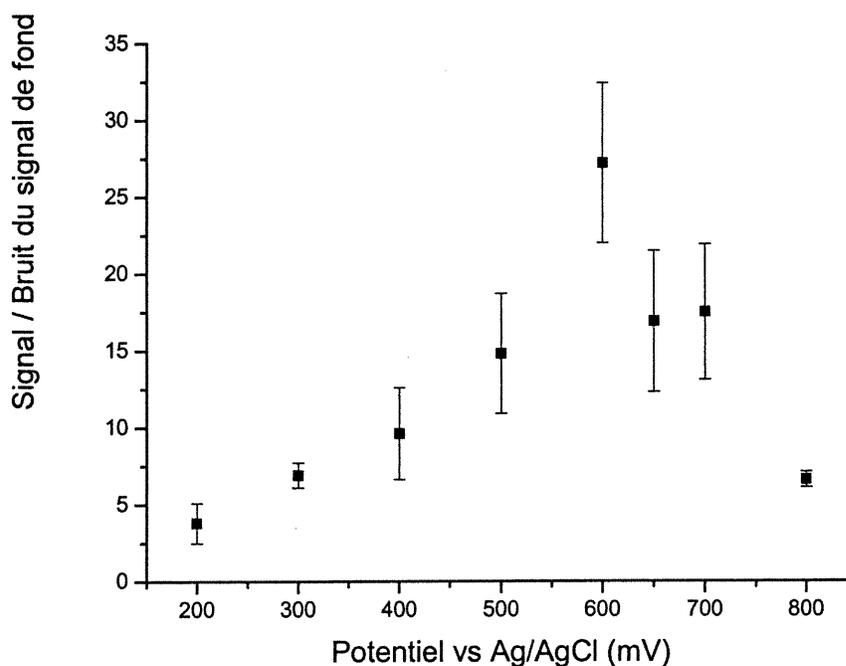


Figure 4.2 : Potentiel optimum pour l'oxydation du glucose à une électrode de cuivre. Conditions expérimentales : concentration du glucose 0,1 mM, diamètre de l'électrode de cuivre : 0,1 mm, concentration de l'électrolyte : 0,1 M NaOH, temps de l'injection : 30 s, hauteur de l'injection : 12 cm, potentiel de séparation : 15 kV.

Le courant est fonction de la concentration de glucose (fig. 4.3). La CV ayant des limites de détection un peu moins élevées que la détection ampérométrique, on peut supposer que le domaine linéaire pour les sucres en détection ampérométrique est plus important et s'étend sur de très faibles concentrations (voir fig. 4.9). L'électrophorèse capillaire ajoute une autre dimension à la détection ampérométrique : le courant électrophorétique. Il provient du potentiel

de séparation. Ce courant dépend de plusieurs autres facteurs : le potentiel de séparation, la concentration de l'électrolyte, la conductivité de l'électrolyte, la longueur du capillaire et finalement le diamètre interne (ID) du capillaire. Ce dernier facteur est le plus important et fait varier le courant de manière drastique. Tous ces facteurs sont étudiés au cours de ce mémoire.

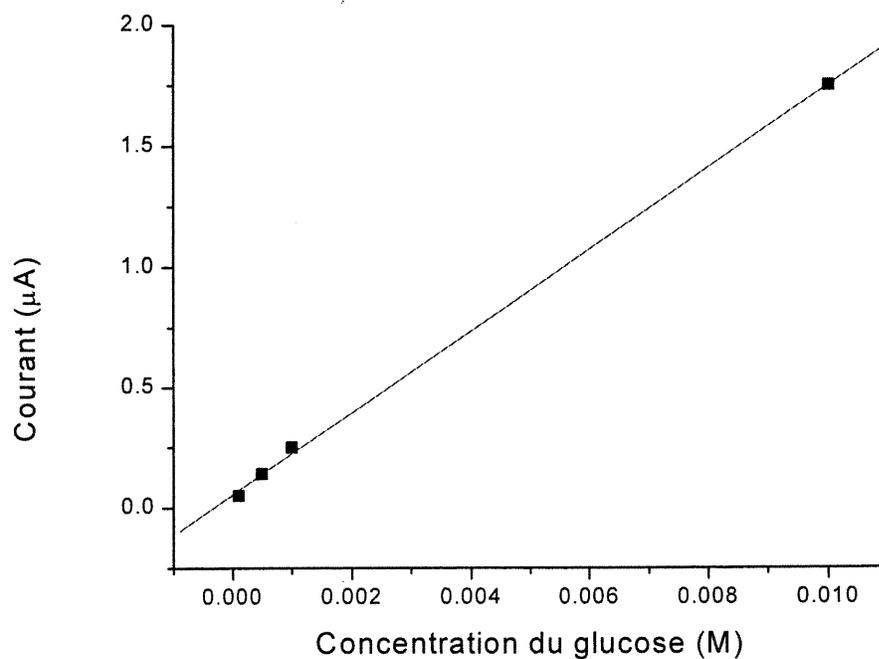


Figure 4.3 : Linéarité de l'oxydation du glucose à une électrode de cuivre pour la voltampérométrie cyclique. Conditions expérimentales : concentration du glucose : 10, 1, 0,5, 0,1 mM, diamètre de l'électrode de cuivre : 0,1 mm, concentration de l'électrolyte : 0,1 M NaOH, vitesse de balayage : 100 mV/s, le courant sur la figure (4.3) correspond au courant d'oxydation à 600 mV.

## 4.2 Paramètres affectant le signal et/ou la séparation

### 4.2.1 Potentiel de séparation

L'électrolyte de séparation est constitué d'hydroxyde de sodium, NaOH. À une concentration importante de NaOH le courant parcourant le capillaire est élevé et amène plusieurs problèmes ; comme le phénomène de l'effet de chaleur («Joule heating») et/ou un signal de fond important au détecteur ampérométrique. En fait, cinq phénomènes peuvent intervenir et augmenter le courant dans le capillaire, ils seront discutés un peu plus loin. Premièrement, le potentiel de séparation appliqué par le générateur de puissance devient une source importante de courant. Plus le potentiel de séparation appliqué est élevé plus le courant du capillaire est élevé. Le courant est proportionnel au voltage appliqué par la loi de Ohm [19].

La résistance demeure inchangée pour chaque analyse en gardant la conductivité constante (même électrolyte de séparation et le même capillaire). Cette loi est démontrée par la figure 4.4, où l'on observe une meilleure linéarité de la droite pour le capillaire de 10  $\mu\text{m}$  de ID par rapport à celui de 50  $\mu\text{m}$ .

Avec un diamètre interne de 10  $\mu\text{m}$  la résistance interne est plus élevée qu'avec un capillaire de 50  $\mu\text{m}$  (fig. 4.4) et lorsque la résistance est grande, le courant résultant est faible (cependant il faut préciser qu'à la figure 4.4 les conditions du tampon ne sont pas identiques : 0,05 M NaOH pour le capillaire de 50  $\mu\text{m}$  et de 0,1 M pour le capillaire de 10  $\mu\text{m}$ ). Cependant, la différence de courant est beaucoup moins importante à de faibles potentiels de séparation, mais, si l'on compare les courants pour des potentiels de 20 kV, la différence est appréciable et doit être tenue en considération pour le choix des diamètres internes de nos capillaires et de la concentration de l'analyte.

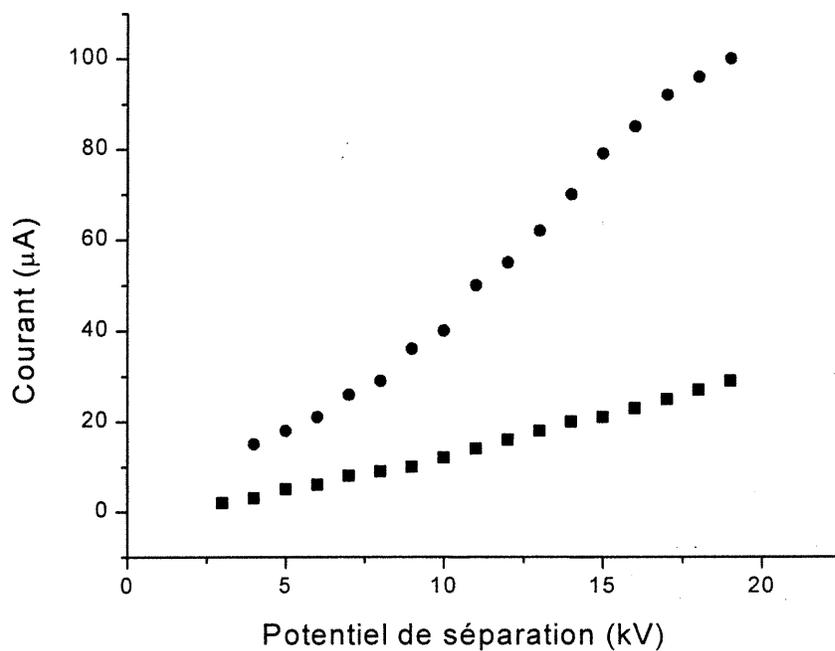


Figure 4.4 : Courant électrophorétique résultant du potentiel de séparation. (●) capillaire de 50  $\mu\text{m}$  de ID et une concentration de l'électrolyte de support de 0,05 M NaOH, (■) capillaire de 10  $\mu\text{m}$  de ID et une concentration de l'électrolyte de support de 0,1 M NaOH. Les deux capillaires ont une longueur de 55 cm.

L'effet du potentiel appliqué sur le rapport de signal ampérométrique (pour le glucose) sur le signal de fond est montré dans la figure 4.5.

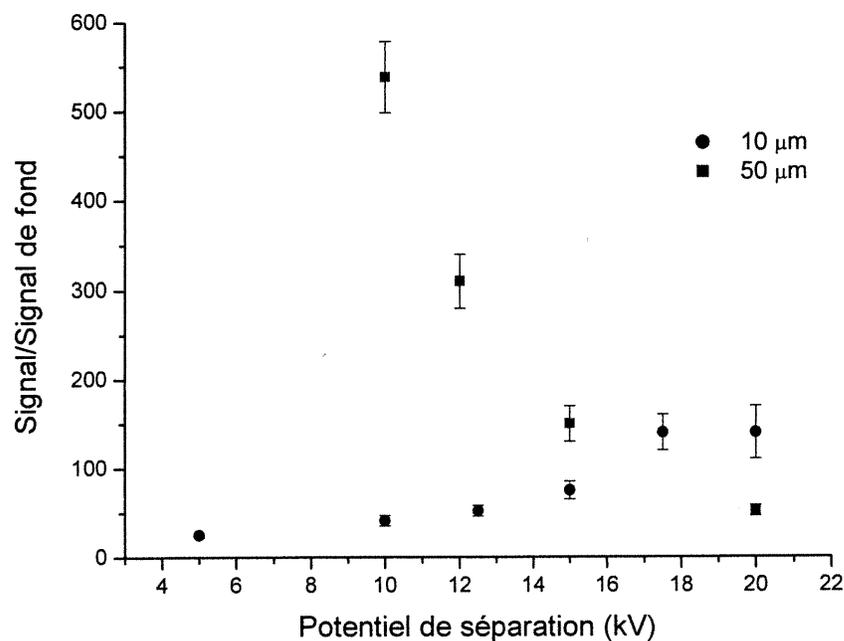


Figure 4.5 : Importance du potentiel de séparation sur le rapport signal sur signal de fond. Electrolyte : NaOH 0,1 M, électrode de cuivre de 100 µm de diamètre, potentiel d'oxydation de 600 mV, longueur du capillaire : 50 cm, analyte : glucose 0,1 M, temps d'injection : 15 s, hauteur d'injection : 12 cm.

Avec un petit diamètre interne la différence du courant dans le capillaire entre 20 kV et 1 kV n'est pas excessivement importante donc le bruit du signal de fond n'augmente pas dramatiquement (il est sensiblement le même  $\cong 0,2$  nA). Le rapport signal sur bruit est optimum entre 17,5 et 20 kV lorsque l'on compare les résultats obtenus à  $\leq 20$  kV. À un potentiel plus élevé, le pic correspondant au glucose est moins évasé et possède une allure plus Gaussienne. À un potentiel assez faible ( $\leq 5$  kV) l'analyte est plus diffus dans l'électrolyte et sa hauteur est ainsi affectée. La hauteur a un pourcentage de différence de 560 % entre le pic à 5 kV et le pic à 20 kV pour un diamètre interne de 10 µm. Ceci est différent lorsque des capillaires de diamètre plus imposants sont utilisés. Pour un diamètre de 50 µm, le courant associé à un potentiel de 20 kV est non négligeable. Le

signal de fond de notre réponse à l'électrode est affecté et est différent à 20 kV et 5 kV. Le signal de fond passe de 5 nA pour le potentiel de 20 kV à 1,3 nA pour le potentiel de 5 kV. La comparaison directe entre les 2 graphiques est cependant compromise car la concentration de l'électrolyte n'est pas la même. À 50  $\mu\text{m}$  de ID la concentration du NaOH est seulement 0,05 M car une concentration plus élevée a tendance à briser notre capillaire lorsqu'un haut potentiel de séparation est utilisé. Ceci est dû à l'effet de chaleur résultant d'un courant trop élevé.

Pour le capillaire ayant un ID de 50  $\mu\text{m}$ , le rapport signal sur bruit diminue en augmentant le potentiel de séparation. Même si le bruit est affecté par le potentiel de séparation le signal du glucose (à un potentiel de 10 kV) est de beaucoup supérieur au signal du glucose à un potentiel de 20 kV. L'explication peut venir du fait qu'à une faible concentration de NaOH l'action catalytique sur l'électrode de cuivre n'est pas accomplie parfaitement et l'oxydation des sucres en est affectée. Avec un faible EOF le sucre demeure plus longtemps en contact avec l'électrode et par le fait même l'oxydation est plus complète. Tandis qu'avec une concentration optimum de l'électrolyte (0,1 M NaOH), l'oxydation se fait aisément. À un faible EOF, il y a diffusion de l'analyte dans le capillaire et un temps de résidence à l'électrode plus long ce qui confère l'élargissement et une baisse dans la hauteur du pic.

Le potentiel de séparation influence, lui aussi, beaucoup la séparation d'un mélange de quelques sucres. Pour l'obtention d'une bonne résolution, il faut optimiser le potentiel de séparation, mais toujours en faisant attention à ne pas trop baisser le potentiel pour éviter la diffusion des analytes et ainsi amenuiser la résolution. Des exemples de séparation de 4 sucres à différents potentiels sont montrés dans les figures 4.6, 4.7 et 4.8.

Pour identifier les pics, nous avons utilisé la méthode de dosage avec les solutions mères de chaque étalon.

On remarque que la résolution est supérieure sur la figure 4.8 avec un potentiel de séparation de 10 kV mais le temps d'analyse est deux fois plus long. En fait, il y a environ 500 s de différence pour une seule analyse, ce qui n'est pas négligeable. Un autre facteur important est la hauteur du pic. Il y a une nette diminution du signal entre les graphiques 4.6 et 4.8. Nous désirons, en général, obtenir une bonne limite de détection et un temps d'analyse assez court. L'électrophérogramme de la figure 4.7 est considéré le meilleur.

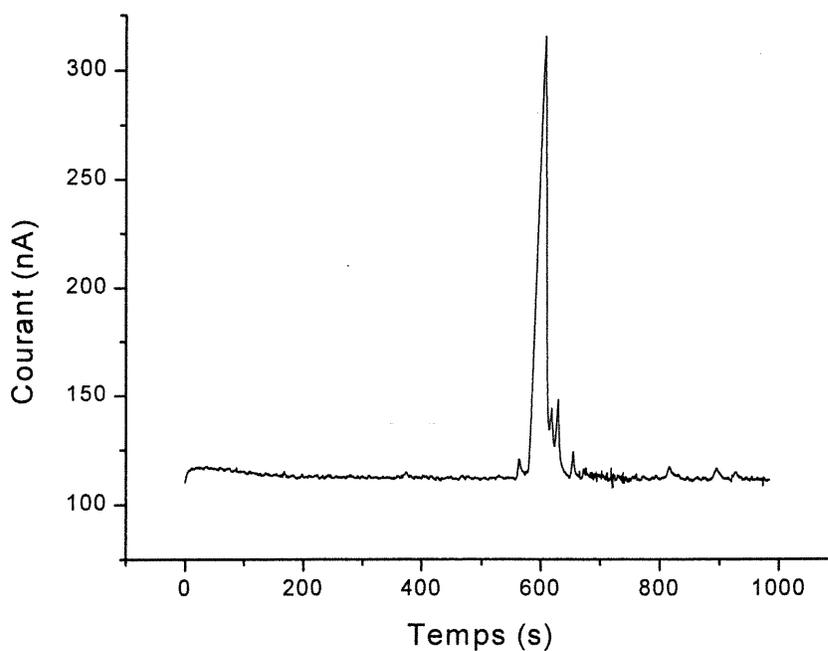


Figure 4.6 : Tentative de séparation d'un mélange de 4 sucres avec un potentiel de séparation de 20 kV (les 4 sucres sont : D(+)-galactose 1 mM, D(+)-glucose 1 mM, D(+)-manose 1 mM, D(+)-xylose 1 mM) électrolyte NaOH 0,1 M, ID 10  $\mu$ m, longueur du capillaire : 50 cm, électrode de cuivre de diamètre de 100  $\mu$ m, temps d'injection de 30s, hauteur de l'injection : 12 cm.

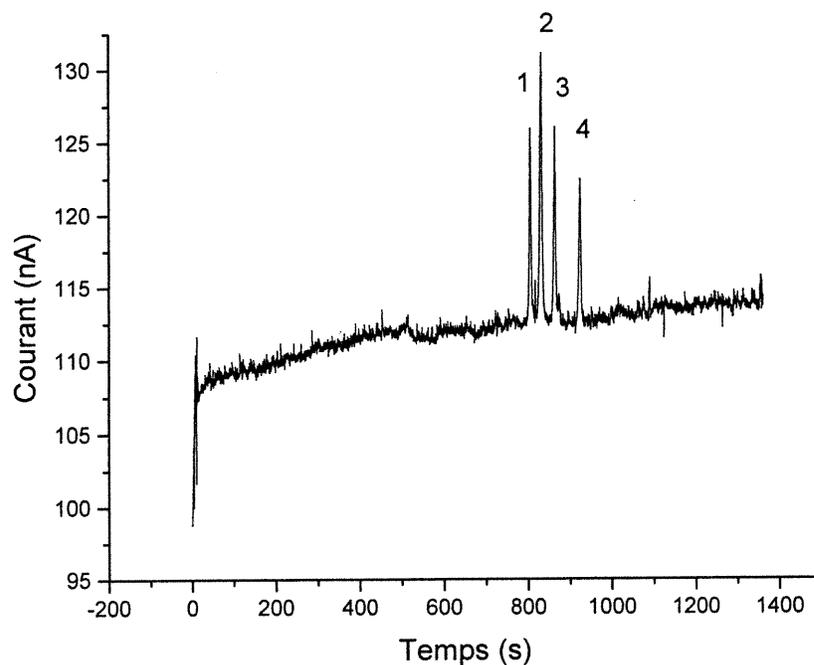


Figure 4.7 : Séparation d'un mélange de 4 sucres avec un potentiel de séparation de 15 kV. Premier pic- D(+)-galactose 1 mM, deuxième pic- D(+)-glucose 1mM, troisième pic- D(+)-manose 1 mM, quatrième pic- D(+)-xylose 1 mM, électrolyte NaOH 0,1 M, ID 10  $\mu$ m, longueur du capillaire : 50 cm, électrode de cuivre de diamètre de 100  $\mu$ m, temps d'injection de 30s, hauteur de l'injection : 12 cm. Résolution entre les pics 1 et 2 : 2,3, les pics 2 et 3 : 2,0 et les pics 3 et 4 : 3,5.

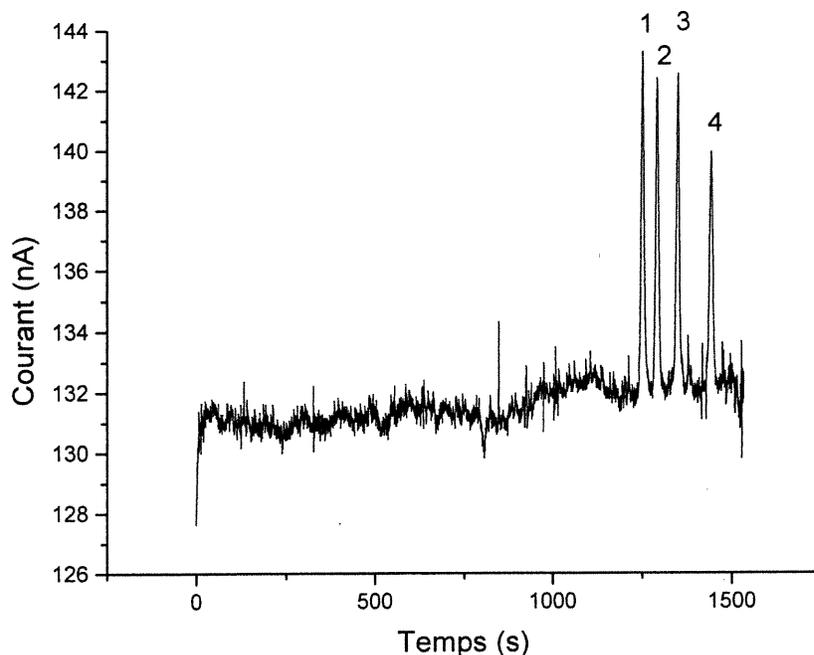


Figure 4.8 : Séparation d'un mélange de 4 sucres avec un potentiel de séparation de 10 kV. Premier pic- D(+)-galactose 1mM, deuxième pic- D(+)-glucose 1mM, troisième pic- D(+)-manose 1mM, quatrième pic- D(+)-xylose 1 mM, électrolyte NaOH 0,1 M, ID 10  $\mu\text{m}$ , longueur du capillaire : 50 cm, électrode de cuivre de diamètre de 100  $\mu\text{m}$ , temps d'injection de 30s, hauteur de l'injection : 12 cm. Résolution entre les pics 1 et 2 : 1,1, les pics 2 et 3 : 1,5 et les pics 3 et 4 : 2,3.

#### 4.2.2 L'effet de la concentration de l'électrolyte sur le système

Le courant dans le capillaire, pour une dimension donnée, est fonction de la concentration de l'électrolyte utilisée pour la séparation des hydrates de carbones. Plus l'électrolyte est présent en forte concentration, plus la conductivité dans le capillaire est importante amenant un courant élevé. L'équation 4.3 démontre que la conductivité est inversement proportionnelle à la résistance, et d'après la loi de Ohm, plus la résistance est faible plus le courant à l'intérieur du capillaire est

élevé. Un courant élevé amène un signal de fond élevé. Notre électrolyte, NaOH, possède 2 propriétés importantes :

- 1- le NaOH concentré ( $\approx 0,1$  M) est nécessaire comme électrolyte car, il possède un pH élevé  $\approx 12$  qui ionisera nos molécules.
- 2- l'action catalytique du cuivre pour oxyder les hydrates de carbones requiert une concentration minimum de NaOH.

$$R = L / kA \quad [19] \quad (4.3).$$

où :  $L$  : longueur du capillaire (cm)  
 $k$  : conductivité de l'électrolyte (mho)  
 $A$  : aire interne du capillaire (cm<sup>2</sup>)

La première propriété est facilement vérifiable. Toutes les expériences effectuées concordent pour confirmer l'hypothèse que les analytes s'ionisent graduellement sous forme anionique au fur et à mesure que la concentration du NaOH augmente. Les sucres étant négativement chargés à pH élevé, ils ont une mobilité électrophorétique contre le EOF. Les temps de migration augmentent avec la concentration du NaOH mais avec une amplitude un peu différente pour chacun (dépendant de leur pKa respectif). On peut se servir de ce paramètre pour améliorer la résolution des pics. Toutefois, il faut être réaliste et utiliser une concentration raisonnable car les temps de migration deviennent très longs et aussi, la diffusion de l'analyte pose un problème. La concentration de l'électrolyte amène aussi un courant élevé dans le capillaire. Ce courant peut briser le capillaire si la chaleur à l'intérieur est suffisamment importante. Par exemple, des concentrations de 0,5 M sont utilisables dans les capillaires de 10  $\mu$ m de ID et ne brisent pas les capillaires. Un autre problème surgit : les hydrates de carbones sont

tellement ionisés et le flux électroosmotique devient plus petit que la mobilité électrophorétique.

Le deuxième phénomène est difficilement étudiable en électrophorèse capillaire car chaque journée d'étude n'est pas aussi reproductible que nous le voulons avec notre système. Il y a trop de paramètres entrant en jeu pour avoir une comparaison juste. Aussi, le phénomène de diffusion a lieu lors des migrations d'analytes à différentes concentrations de NaOH. Mais, on peut toujours faire une étude en voltampéramétrie cyclique et ainsi connaître que la concentration idéale pour l'oxydation des sucres est d'au moins 0,5 M NaOH [50].

En résumé, une concentration de 0,1 M NaOH est favorable pour réaliser une droite d'étalonnage et la détection des sucres. Cette concentration amène un pH assez élevé pour bien réussir la catalyse à l'électrode de cuivre et n'affecte pas dramatiquement les temps de migration. Le phénomène de diffusion est minime.

#### **4.2.3 L'effet du diamètre interne du capillaire sur le système**

Un deuxième facteur découlant du ID survient. L'alignement entre l'électrode et le capillaire a besoin de toute l'aide nécessaire pour être le plus exact possible. Pour en faciliter la tâche, un ID de 50  $\mu\text{m}$  aide cet l'alignement. Ayant plus de liquide sortant au même instant de ce capillaire, la détection grâce à la technique du «wall jet» touchera presque à coup sûr notre électrode. Plus le ID diminue, plus l'alignement est difficile. Nous avons décidé de continuer l'étude avec un capillaire de diamètre interne de 50  $\mu\text{m}$ .

#### 4.2.4 L'effet de la longueur du capillaire sur le système

La longueur du capillaire affecte un peu tous les paramètres. Premièrement, il est évident que si l'on diminue la longueur on diminue les temps de migration. D'un autre côté, la résistance est beaucoup moindre et, par conséquent, le bruit (courant) augmente. On diminue donc le voltage pour que le courant reste le même. Comme expliqué plus haut, tout ceci est amplifié lorsque les capillaires utilisés possèdent des ID de gros gabarits ( $\approx 50 \mu\text{m}$ ). Cette différence est presque inexistante lorsque les ID sont de  $\approx 10 \mu\text{m}$ . Ici, c'est un avantage d'utiliser un ID de  $10 \mu\text{m}$  comparativement à  $50 \mu\text{m}$ . Il est impossible de travailler (dans nos conditions) avec un capillaire de 20 cm de longueur et un diamètre de  $50 \mu\text{m}$ , le courant dans le capillaire est excessivement élevé et le capillaire brise lorsque le potentiel de séparation dépasse les 10 kV.

#### 4.2.5 L'effet du diamètre de l'électrode de travail sur le signal

Tel qu'expliqué dans le chapitre 1, on peut utiliser deux grosseurs d'électrodes soit les macroélectrodes ou les microélectrodes. La différence entre ces deux électrodes est l'amplitude du courant résultant de l'oxydation des sucres. Les macroélectrodes fournissent une aire d'électrode de travail beaucoup plus importante donc plus d'analytes s'y font oxyder. Pour comparer les deux grandeurs d'électrodes, on observe la densité de courant. La densité est le courant, signal moins le signal de fond, divisé par l'aire de l'électrode. Cette formule est utilisée surtout en voltampérométrie cyclique où il y a une certaine concentration d'analytes partout en solution et plus l'aire est grand plus d'analytes s'y feront réduire ou oxyder. Elle devient un peu complexe en CE car l'analyte est dirigé directement sur l'électrode de travail en configuration «wall jet» et de ce fait la proportion de la concentration oxydée devient plus.

Par exemple, si l'on compare les valeurs moyennes des courants obtenus avec des électrodes de 1 mm de diamètre, le courant pour des conditions spécifiques est d'environ  $700 \pm 100$  nA donc une densité de  $0,9 \pm 0,1$   $\mu\text{A}/\text{mm}^2$ . Pour exactement les mêmes conditions, mais avec une électrode de 0,1 mm de diamètre le courant moyen est de  $110 \pm 40$  nA ce qui confère une densité de courant de  $14 \pm 5$   $\mu\text{A}/\text{mm}^2$ . La densité est de beaucoup supérieure avec l'électrode de travail de 0,1 mm de diamètre, mais le courant absolu est tout de même plus grand avec l'électrode de 1mm. Le facteur le plus important est le rapport s/n. Ce rapport est deux fois plus grand avec la petite électrode car le bruit est au moins dix fois moindre. Notre choix est l'électrode de 0,1 mm de diamètre.

### **4.3 L'effet de l'alignement entre l'électrode et le capillaire sur le signal et les conditions optimum trouvées**

L'alignement est une étape importante pour la détection ampérométrique des analytes. Pour arriver à nos fins, l'ajustement dans les axes X et Y se fait avec deux micropositionneurs et un microscope 4X Baush and Lomb (fig. 2.4). Deux paramètres facilitent ce travail : le diamètre interne du capillaire et le diamètre de l'électrode. Les électrodes utilisées ont un diamètre de 100  $\mu\text{m}$  ce qui constituent de grosses électrodes faciles à aligner. L'autre dimension, Z, est moins évidente à optimiser et reproduire. En fait, la technique est d'appuyer le capillaire directement sur l'électrode et ensuite l'éloigner de quelques micromètres ( $\approx 5$   $\mu\text{m}$ ). Cette distance tient compte de la distance minimum à respecter pour que le courant de séparation n'affecte pas trop la détection. En laissant une distance assez imposante, le courant dû au potentiel de séparation n'affecte pas la détection. Il faut quand même être près de l'électrode car l'analyte n'entrera pas en contact avec l'électrode de travail et ne sera pas oxydée.

L'alignement reste une étape laborieuse et difficile à reproduire. Le même analyste peut réussir des analyses reproductibles d'une journée à l'autre mais ce n'est pas

garanti. Le problème réside dans l'amplitude du signal obtenu, non dans la séparation.

Les paramètres optimums pour réaliser la meilleur limite de détection proviennent de la figure 4.9. Cette figure montre une droite d'étalonnage réalisée avec les paramètres optimums nécessaires pour l'obtention d'une basse limite de détection. Ce que l'on observe sur la figure 4.9, pour des concentrations faibles ( $< 25$  mM glucose), est une courbe linéaire avec un facteur de corrélation de 0,996. En fait, le domaine de linéarité est observé pour la détection du glucose avec une électrode de  $100 \mu\text{m}$  de cuivre entre  $25$  mM et  $25 \mu\text{M}$ . La linéarité déborde sûrement le domaine mentionné mais avec nos limitations dues aux paramètres choisis on ne peut arriver à des limites de détection plus basse que l'ordre de  $10^{-5}$  M.

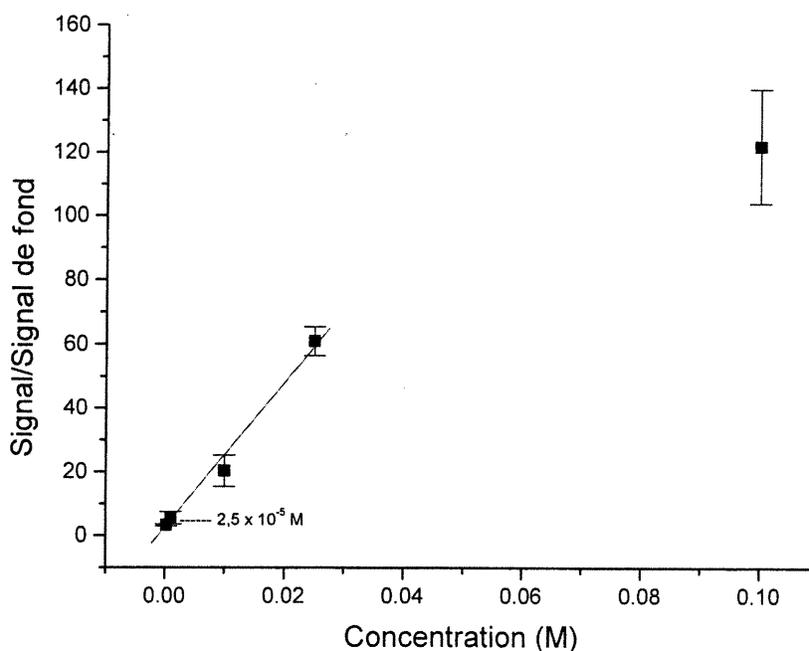


Figure 4.9 : Droite d'étalonnage pour le glucose avec une électrode de cuivre de  $100 \mu\text{m}$ . Électrolyte de support : NaOH  $0,1$  M; potentiel d'oxydation :  $600$  mV; diamètre interne du capillaire :  $50 \mu\text{m}$ ; longueur du capillaire :  $55$  cm; potentiel appliqué :  $10,0$  kV.

#### 4.4 Conclusion

La compréhension et l'acceptation des compromis est sans contredit la clé du succès de l'analyse des sucres avec la séparation par électrophorèse capillaire et la détection électrochimique. Plusieurs paramètres entrent en ligne de compte lorsque vient le temps de réaliser une analyse. Un ordre d'importance doit être suivi. Par exemple, si l'on veut obtenir une bonne séparation de plusieurs analytes, il faut faire certains compromis qui diminueront le rapport signal sur signal de fond.

L'alignement de l'électrode et du capillaire joue un rôle important avec ce mode de détection. Ce paramètre varie un peu d'une journée d'expérience à une autre. Il faut être assez rigoureux et posséder une cellule d'alignement efficace. Cette cellule est nécessaire pour l'obtention de résultats reproductibles et compétitifs avec les autres méthodes de détection. Nous n'avons pas obtenus les résultats justifiant une étude plus approfondies avec les trois premiers modèles de cellules de la section 2.2. L'élaboration de la cellule de la figure 2.4 nous permet de pousser davantage nos recherches et l'étude des paramètres affectant la séparation et la détection électrochimique.

## 5 L'électrode de dioxyde de ruthénium ( $\text{RuO}_2$ )

### Introduction

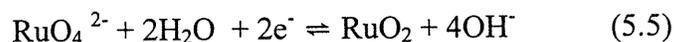
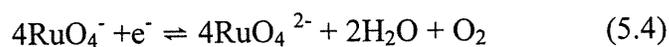
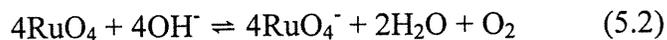
Après avoir construit la cellule de détection pour CE et le circuit pour l'acquisition des données et les optimiser avec une électrode de cuivre, une nouvelle électrode servant à la détection ampérométrique des hydrates de carbonnes jumelée à l'électrophorèse capillaire, appelée électrode de dioxyde de ruthénium, est utilisée au cours de ce chapitre.

Ce genre d'électrode, catalytiquement active et stable, est largement utilisée dans les cellules chlore-alcalins [53] pour la photo oxydation de l'eau ainsi que sa réduction [54], pour l'oxydation électrocatalytique de composés organiques comme le méthanol [55,56] et bien sûr, pour l'oxydation des hydrates de carbonnes [57,58].

Contrairement aux électrodes d'or et de platine [59,60] avec lesquelles des pulsions ampérométriques pour nettoyer et activer la surface de l'électrode de travail sont nécessaires, l'électrode  $\text{RuO}_2$  n'a besoin d'aucune séquence de pulsion de potentiel. Même après 48 h de travail, la réponse à l'oxydation des sucres demeure stable [58] comme l'électrode de cuivre (chapitre 4).

Un autre avantage de cette électrode est qu'elle est catalytiquement active à un faible potentiel constant, exemple entre 0,2 et 0,5 V vs Ag/AgCl pour l'électrooxydation des hydrates de carbonnes.

D'après Leech [61], l'état  $\text{RuO}_4^-$  du ruthénium agit dans la réaction catalytique des sucres. Les réactions d'oxydation/réduction de cette électrode sont décrites par les équations 5.1 à 5.6.



L'oxydation des sucres à l'électrode de pâte de dioxyde de ruthénium est régie par la réaction chimique entre l'espèce hydroxyle à la surface de l'électrode et la fonction alcool des sucres. D'après le groupe de Burke [62], l'étape déterminante de la réaction serait ;



où ads : adsorbé

D'autres étapes comme l'oxydation du groupement aldéhyde en acide carboxylique peuvent survenir. L'oxydation des alcools primaires se fait en premier, ensuite les alcools secondaires et, bien entendu, l'oxydation des alcools tertiaires est impossible. L'électrode de  $\text{RuO}_2$  peut avoir de belles vertus pour l'électrophorèse capillaire couplé avec une détection ampérométrique.

## **5.1 Le choix de la méthode de fabrication de l'électrode de dioxyde de ruthénium**

La technique décrite à la section 2.3.2 où le ruthénium est inséré par action capillaire à l'intérieur du capillaire n'a donné aucun résultat concluant car nous n'avons pu surmonter le problème de la fragilité du capillaire une fois chauffé à 550 °C.

La couche de dioxyde de ruthénium dissoute dans l'isopropanol et badigeonnée sur une électrode de carbone vitreux (chapitre 2) n'est pas très flexible. Il est difficile d'obtenir la surface de contact désirée avec un tel type de fabrication. La goutte de RuO<sub>2</sub> s'étend avant de sécher et sa superficie est incontrôlable. Pour limiter le bruit de fond, il est impératif que le diamètre de l'électrode de travail soit de l'ordre de 100 à 500 µm. Cette façon de fabriquer l'électrode d'oxyde de ruthénium est rejetée.

Une autre manière de construire l'électrode de RuO<sub>2</sub> est d'utiliser une pâte de carbone contenant les particules de RuO<sub>2</sub>, comme expliqué dans le chapitre 2. Il est ainsi plus facile de contrôler son diamètre. Par contre, des petits diamètres sont excessivement difficiles à obtenir. Le plus petit diamètre obtenu est de 250 µm. Ceci sera le type d'électrode étudié lors de nos expériences.

## **5.2 La voltampérométrie cyclique**

Pour vérifier le bon fonctionnement des nouvelles électrodes, une expérience de voltampérométrie cyclique est toujours réalisée. De plus, avec la CV on trouve les potentiels à appliquer pour l'oxydation de nos analytes en détection ampérométrique. En regardant un voltampérogramme typique sans glucose

(fig. 5.1), on s'aperçoit qu'il y a une réaction rédox de Ru [61]. Cette réponse est grandement accentuée en présence du glucose.

Pour le glucose, la figure 5.1 indique que le début de l'oxydation se situe vers 150 mV vs Ag/AgCl. La différence entre le signal de fond et le signal dû à l'oxydation est assez constante. Vers 300 mV vs Ag/AgCl, la différence s'accroît et devient non négligeable. Elle est assez importante pour choisir ce potentiel comme potentiel d'oxydation des sucres lorsqu'une électrode de pâte de ruthénium est utilisée comme électrode de travail et jumelée à l'électrophorèse capillaire.

Il n'y a pas seulement la différence entre le signal du blanc et le signal de notre analyte qu'il faut tenir en considération mais aussi l'amplitude du bruit du signal de fond. L'électrode fabriquée avec le ruthénium agit un peu comme un condensateur c'est-à-dire qu'elle accumule des charges à la surface de l'électrode. Ces charges nuisent à l'obtention de bonnes limites de détection.

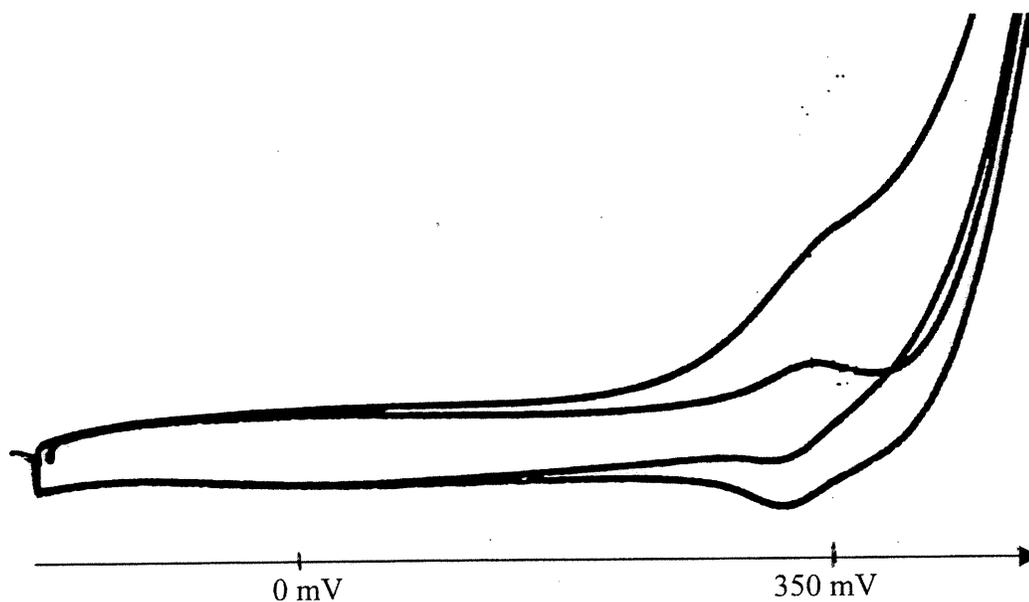


Figure 5.1 : Voltampérogramme avec une électrode de dioxyde de ruthénium. La courbe la plus haute est le glucose 0,01 M. La courbe la plus basse est le NaOH seul. Électrode de pâte de ruthénium avec un diamètre de 400  $\mu\text{m}$  ; Électrolyte de support : NaOH 0,5 M ; vitesse de balayage : 100 mV/s.

### 5.3 Détection ampérométrique du glucose avec une électrode $\text{RuO}_2$ couplé à l'électrophorèse capillaire

Pour la première fois, une électrode faite de dioxyde de ruthénium est couplée à l'électrophorèse capillaire. Le résultat est satisfaisant du point de vue que l'on obtient une réponse (fig. 5.2). Ce courant possède une amplitude de beaucoup supérieure au courant obtenu avec une électrode de cuivre et une densité de  $60 \pm 20 \mu\text{A}/\text{mm}^2$ . En comparant le meilleur résultat obtenu avec l'électrode de cuivre,  $14 \pm 5 \mu\text{A}/\text{mm}^2$ , l'électrode de dioxyde de ruthénium donne des courants 3 fois plus élevés. Par contre, le signal de fond est également supérieur (fig. 5.2).

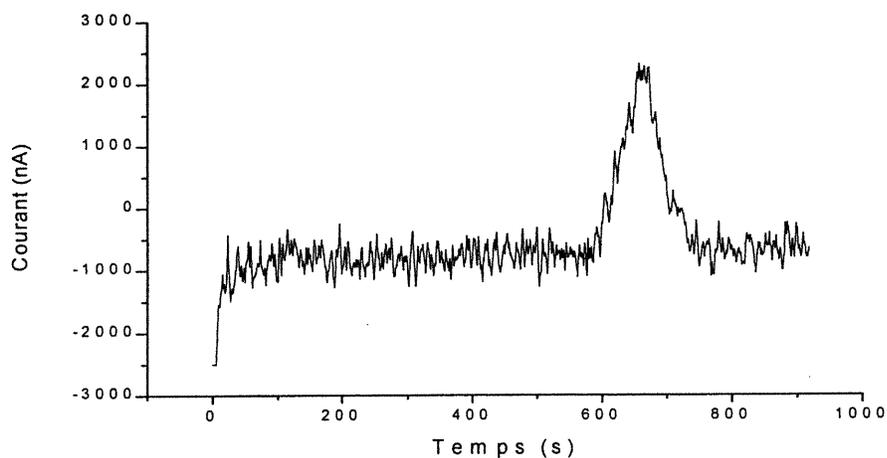


Figure 5.2 : Oxydation du glucose à une électrode de dioxyde de ruthénium. On utilise le glucose 0,1 M, du NaOH 0,1 M, un diamètre d'électrode de  $250 \mu\text{m}$ , un potentiel d'oxydation de 450 mV, un potentiel de séparation de 20 kV, un capillaire de ID de  $50 \mu\text{m}$ , une longueur de 55 cm, le temps d'injection est de 30s avec une hauteur de 12 cm.

## 5.4 Choix du potentiel optimum pour la détection du glucose

Les dernières électrodes de dioxyde de ruthénium fabriquées possèdent des courants sensiblement identiques au courant observé avec les électrodes de cuivre. Donc, la reproductibilité de l'amplitude du courant qui était environ 10 fois plus qu'avec l'électrode de cuivre n'est pas retrouvée. Cette différence est difficilement explicable. Les voltampérogrammes, aussi, sont différents. L'augmentation du courant due à l'oxydation des sucres n'est pas aussi drastique qu'auparavant. Il en résulte que l'on peut utiliser des potentiels assez élevés sans affecter énormément le bruit. Ce changement est possiblement dû à la fabrication du dioxyde de ruthénium. Les lots utilisés sont différents ce qui nous amène à croire que l'un était non conforme à son étiquette.

Sur la figure 5.3, le potentiel optimum est 650 mV vs Ag/AgCl. Il faut donc, appliquer ce potentiel pour obtenir le meilleur ratio signal/signal de fond pour l'oxydation du glucose.

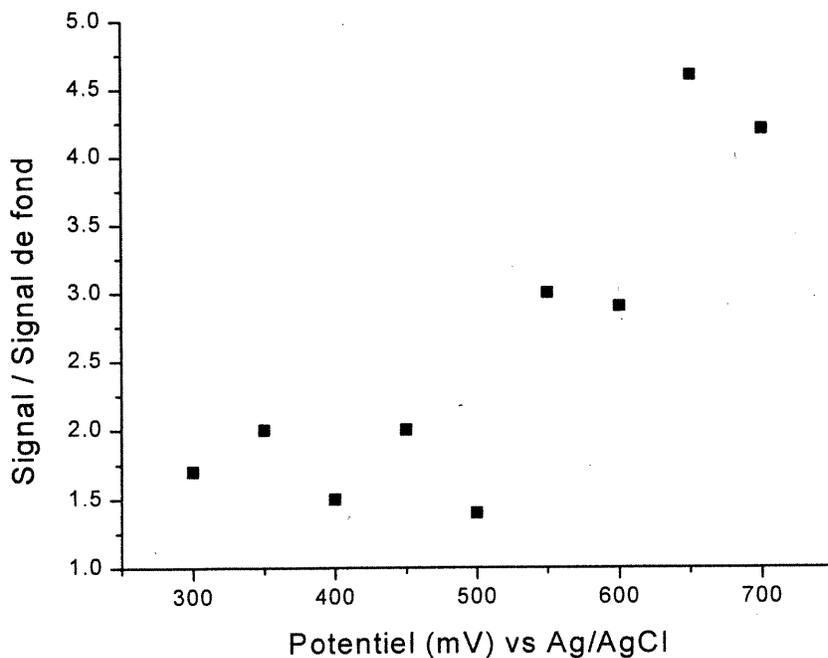


Figure 5.3 : Relation entre le potentiel d'oxydation du glucose et le rapport signal sur signal de fond avec une électrode de pâte de carbone contenant du dioxyde de ruthénium.

### 5.5 Limite de détection du glucose

Pour obtenir une limite de détection acceptable, il faut diminuer le signal de fond du capillaire au maximum. Tel que discuté au chapitre précédent, plusieurs facteurs influencent ce phénomène.

Premièrement, un capillaire avec un diamètre interne très petit est essentiel ( $< 20 \mu\text{m}$ ). Des diamètres internes de l'ordre de  $50 \mu\text{m}$  amènent un signal de fond beaucoup trop important.

Ensuite, le potentiel de séparation, la concentration de l'électrolyte de support, le diamètre de l'électrode de travail et le potentiel d'oxydation doivent être le plus faible ou petit possible. La longueur du capillaire, quant à elle, se doit d'être de longueur raisonnable ( $\approx 50$  cm).

Malheureusement, les électrodes nouvellement construites ne répondent pas à nos attentes. Les courants observés sont beaucoup trop petits pour réussir une limite de détection acceptable.

À cause de ces difficultés, il a été impossible de réaliser une séparation de mélanges de sucres avec cette électrode.

## 5.6 Conclusion

Le couplage entre l'électrode de dioxyde de ruthénium et l'électrophorèse capillaire a été réalisé. Cependant, les résultats obtenus ne sont pas très encourageants. Premièrement, la fabrication du dioxyde de ruthénium est une tâche délicate mais essentielle pour la réalisation d'une électrode catalytiquement active vis-à-vis l'oxydation des sucres. Cette étape n'a pu être retrouvée avec le nouveau trichlorure de ruthénium. Ceci est peut-être dû à la mauvaise conversion du chlore en oxyde. Cette mauvaise conversion est causée soit par la température déficiente de l'étuve ou encore, le trichlorure de ruthénium s'était peut-être détérioré avec le temps (il ne provenait pas du même lot d'échantillon).

Évidemment, il faudra diminuer le diamètre de l'électrode de travail en utilisant des capillaires (servant comme micro-environnement entre le dioxyde de ruthénium et l'analyte) aux diamètres internes plus petits que  $250 \mu\text{m}$ , ou du moins, trouver une alternative pour réussir à diminuer le bruit à l'électrode de travail.

## 6. Conclusions générales et études futures

Ce projet contenait 5 parties dont la fabrication d'une cellule électrochimique, d'un potentiostat maison, d'un système d'interfaçage informatique et d'acquisition des données, de l'essai de notre système avec des systèmes connus de la littérature et finalement de l'essai avec une nouvelle électrode de dioxyde de ruthénium pour la détection des hydrates de carbones avec l'aide du CE pour leur séparation.

Le couplage entre la CE et un détecteur EC est une réussite, on a construit une cellule amenant une détection assez reproductible avec un RSD de 8.0% selon le tableau 3.1 avec la table traçante. Cette cellule permet de déplacer l'alignement électrode/capillaire dans les 3 dimensions. Ce système est facilement manipulable et utilisable.

Ensuite, on a réalisé, en collaboration avec M. Pascal Pérusse, un détecteur ampérométrique maison contrôlé par ordinateur avec une acquisition des données en temps pseudo-réel. Ce système a été vérifié et répond à nos attentes. De plus, nous avons élaboré un système de traitement des résultats qui facilite leurs analyses sans l'aide d'un programme commercial. Les avantages de ces travaux sont la vitesse d'exécution et le fait que l'on a pas besoin d'avoir plusieurs programmes sous la main.

Par la suite, des expériences de la littérature ont été reprises pour comparer nos résultats et aussi s'assurer que le tout fonctionne bien et que les résultats sont reproductibles. Nos limites de détection sont de l'ordre de  $10^{-5}$  M tandis que la littérature [31] nous donne une limite de l'ordre de  $10^{-6}$  M pour pratiquement les mêmes conditions, c'est-à-dire, détection du glucose avec une macroélectrode de cuivre (100  $\mu\text{m}$  de diamètre). La différence peut être

expliquée par la technologie utilisée pour l'alignement de l'électrode et du capillaire (micropositionneur piezoélectrique et microscope avec camera numérique) qui est un facteur important pour la détection. De plus, un traitement mathématique ou «amortissage» des données pourrait améliorer notre limite de détection.

Finalement, on a fait l'étude d'une nouvelle électrode pour la détection ampérométrique des hydrates de carbones couplée avec la CE : l'électrode de dioxyde de ruthénium. Ce type d'électrode est intéressant du point de vue qu'il ne nécessite pas de technique d'impulsion de potentiel pour nettoyer sa surface. La réponse obtenue avec une telle électrode est surprenante. Le courant dû à l'oxydation des sucres est très élevé et la densité du courant est environ 4 fois plus élevée qu'avec notre électrode de cuivre, c'est-à-dire de  $60 \pm 20 \mu\text{A}/\text{mm}^2$  pour le dioxyde de ruthénium et de  $14 \pm 5 \mu\text{A}/\text{mm}^2$  pour une électrode de 0,1mm de diamètre de cuivre. Le problème réside dans le signal de fond provenant de cette électrode. En effet, le ruthénium agit comme un condensateur et emmagasine des charges à sa surface, ce qui nuit nettement à la détection. Il faudrait s'attarder un peu à ce signal de fond généré par l'accumulation de charge en diminuant le diamètre de l'électrode de travail. Néanmoins, ceci laisse présager un futur très intéressant pour ce genre d'électrode.

Le but à long terme de ce projet est d'employer des électrodes de dioxyde de ruthénium servant à la détection d'un séquençage de glycoprotéines séparées par CE. Pour ce faire, il faudra trouver un moyen efficace pour l'alignement de cette électrode avec le capillaire comme mentionné sur la page précédente. L'alignement le plus reproductible est lorsque cette électrode est insérée dans le capillaire. Les défis seront d'oxyder le ruthénium sans affecter les propriétés du capillaire (surtout la flexibilité) et de réduire le signal du bruit de fond avec les électrodes de ruthénium tout en gardant la même amplitude pour le signal de l'analyte.

## Références

- 1 : Jorgenson, J.W., Lukacs, K.D., *Science*, 222 (1983) 266.
- 2 : Kobota, A., *Eur. J. Biochem.* 209, (1992) 483.
- 3 : Olechno, J.D., Ulfelder K.J., dans Handbook of Capillary Electrophoresis, J.P. Landers (éd.), CRC Press, London, (1994) 225.
- 4 : Kuhr, W.G., Monnig, C.A., *Anal. Chem.* 62, (1992) 389.
- 5 : Bruin, G.J.M., Paulus, A., *Anal. Methods Instrum.* 2, (1995) 3.
- 6 : Oefner, C., Chiesa, C., Bonn, G. & Horvath, C., *J. Cap. Elec.* 1, (1994) 5.
- 7 : Novotny, M.V., & Sudor, J., *Electrophoresis* 14, (1993) 373.
- 8 : Johnson, D.C., & Lacourse W.K., dans *Carbohydrate Analysis (J. Chromatogr. Library vol. 58)*, Z. El Rassi (éd.), Elsevier, Amsterdam, (1995) 391.
- 9 : Townsend, R.R., dans *Carbohydrate Analysis (J. Chromatogr. Library vol. 58)*, Z. El Rassi (éd.), Elsevier, Amsterdam, (1995) 181.
- 10 : Colon, L.A., Dadoo, R. & Zare R.N., *Anal. Chem.* 65, (1993) 476.
- 11 : Ye, J., Baldwin, R.P., *Anal. Chem.*, 65, (1993) 3525.
- 12 : Mikkers, F.E.P., Everaerts, F.M. & Verheggen, T.P.E.M., *J. Chromatogr.* 169, (1979) 11.
- 13 : Terabe, S., Otsuka, K., Ichikawa, K., Tsuchiya, A., Ando, T., *Anal. Chem.* 56, (1984) 11.
- 14 : Terabe, S., Otsuka, K., Ando, T., *Anal. Chem.* 57, (1985) 834.
- 15 : Hjerten, H., *J. Chromatogr.* 270, (1983) 1.
- 16 : Everaerts, F.M., Beckers, J.L., Verheggen, Th.P.E.M., dans Instrumentation and Applications, Isotachophoresis Theory, Elsevier (1976).
- 17 : Tiselius, A., Kundel, H.Z. *Physiol. Chem.* 309, (1937) 219.
- 18 : Lukas, K.D., Jorgenson, J., *J. High Resolut. Chromatogr. Commun.*, 8, (1985) 407.
- 19 : Anonyme, Introduction to Capillary Electrophoresis, 1<sup>ère</sup> édition, Beckman Inc., 1994.

- 20 : Weinberger, R., Practical Capillary Electrophoresis, Academic Press, Inc., San Diego, (1993)
- 21 : D'Amboise, M., Chimie Analytique Instrumentale, Librairie de L'Université de Montréal, Montréal, (1995) 232.
- 22 : Knoll, J.E., J. Chromatogr. Sci., 23, (1985) 422.
- 23 : Camilleri, P., Capillary Electrophoresis ; Theory and Practice, Boca Raton, San Diego, (1993).
- 24 : Bockris, J. O'M., Reddy A. K. N., Modern Electrochemistry, Plenum Press, New York, (1970).
- 25 : Bard, A.J., Faulkner, L.R., Electrochemical Methods : Fundamentals and Applications, Wiley, New York (1980).
- 26 : Olefirowicz, T.M., Ewing, A.G., Anal. Chem., 65, (1990) 2878
- 27 : Park, S., Lunte, S.M., Lunte, C.E., Anal. Chem., 67, (1995) 911.
- 28 : O'Shea, T.J., Lunte, S.M., Current Separations, 14 (1), (1995) 18.
- 29 : Chen, I.C., Whang, C.W., J. Chromatogr., 644, (1993) 208.
- 30 : Curry, P.D., Engstrom-Silverman, Ewing, A.G., Electroanalysis, 3, (1991) 587.
- 31 : Malone, M.A., Weber, P.L., Smyth, M.R., Lunte, S.M., Anal. Chem., 66, (1994) 3782.
- 32 : Sloss, S., Ewing, A.G., Anal. Chem., 65, (1993) 577.
- 33 : Lu, W., Cassidy, R.M., Anal. Chem., 65, (1993) 2878.
- 34 : Colon, L.A., Dandoo, R., Zare, R.N., Anal. Chem., 65, (1993) 3525.
- 35 : Kissinger, P.T., Heineman, W.R., Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry, Marcel Decker, New York (1984).
- 36 : Horowitz, P., Hill, W., The Art of Electronics, Cambridge University Press, Cambridge (1980).
- 37 : Walter G. Jung, I.C. UP, Amp Cook Book, Sams, Carmel, Indiana, 3<sup>e</sup> édition (1974).
- 38 : Leech, D., et collaborateurs, CHM 2173 Laboratoire de Chimie Analytique 1, La librairie de l'Université de Montréal, (1997).

- 39 : CRC Handbook Series in Inorganic Electrochemistry VIII.
- 40 : Wallingford, R.A., Ewing, A.G., *Anal. Chem.*, 59, (1987) 1762.
- 41 : Lunte, S.M., O'Shea, T.J., *Electrophoresis*, 15, (1994) 79.
- 42 : Curry, P.D. Jr., Engstrom-Silverman, C.E., Ewing, A.G., *Electroanalysis*, 3, (1991) 587.
- 43 : Voegel. P.D., Baldwin, R.P., *Electrophoresis*, 18, (1997) 2267.
- 44 : Vassilyev, Y.B., Khazova, O.A., Nikolaeva, N.N., *J. Electroanal. Chem.*, 196, (1985) 127.
- 45 : Marioli, J.M., Kuwana, T., *Electrochimica Acta*, 37, (7), (1992) 118.
- 46 : Miller, B., *J. Electrochem. Soc.*, 116, (1969) 1675.
- 47 : Ashworth, V., Fairhurst, D., *J. Electrochem. Soc.*, 124, (1977) 506.
- 48 : Fletcher, S., Barradas, R.G., Porter, J.D., *J. Electrochem. Soc.*, 125, (1978) 1960.
- 49 : Abd El Haleem, S.M., Ateya, B.G., *J. Electroanal. Chem.*, 117, (1981) 309.
- 50 : Pyun, C.H., Park, S.M., *J. Electrochem. Soc.*, 132, (1986) 2024.
- 51 : Burke, L.D., Ahern, M.J.G., Ryan, T.G., *J. Electrochem. Soc.*, 137, (1990) 553.
- 52 : Mechref, Y., Ostrander, G.K., El Rassi, Z., *J. Chromatogr. A*, 695, (1995) 83.
- 53 : Burke, L.D., Whelan, D.J., *J. Electroanal. Chem.*, 103, (1979) 179.
- 54 : Kleijn, M., Van Leeuwen, H., *J. Electroanal. Chem.*, 247, (1988) 253.
- 55 : Burke, L.D., Healy, J.F., *J. Electroanal. Chem.*, 101, (1979) 351.
- 56 : Laule, G., Hawk, R., Miller, D., *J. Electroanal. Chem.*, 213, (1986) 329.
- 57 : Wahl, J.H., Enke, C.G., McGuffin, V.L., *Anal. Chem.*, 62, (1990) 1416.
- 58 : Burke, L.D., Whelan, D.P., *J. Electroanal. Chem.*, 103, (1979) 179.
- 59 : Hughes, S., Johnson, D.C., *Anal. Chim. Acta*, 132, 11 (1981).
- 60 : Rocklin, R.D., Pohl, C.A., *J. Liq. Chromatogr.*, 6, 1577 (1983).
- 61 : Leech, D., The Development and Characterisation of some Novel Amperometric Sensors PhD. Thesis, Dublin City University, Dublin, p.180 (1991).
- 62 : Burke, L.D., Healy, J.F., *J. Electroanal. Chem.*, 124, 327 (1981).