Office de la Propriété Intellectuelle du Canada
Un organisme d'Industrie Canada

Canadian Intellectual Property Office
An agency of Industry Canada

CA 2545213 C 2012/02/21

(11)(21) 2 545 213

(12) BREVET CANADIEN
CANADIAN PATENT

(13) C

(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2004/11/10
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2005/05/26
(45) Date de délivrance/Issue Date: 2012/02/21
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2006/05/08
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2004/050580
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2005/046881
(30) Priorité/Priority: 2003/11/12 (FR0350820)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *B05B 5/025* (2006.01), *B81B 7/00* (2006.01), *H01J 49/16* (2006.01), *G01N 30/04* (2006.01)

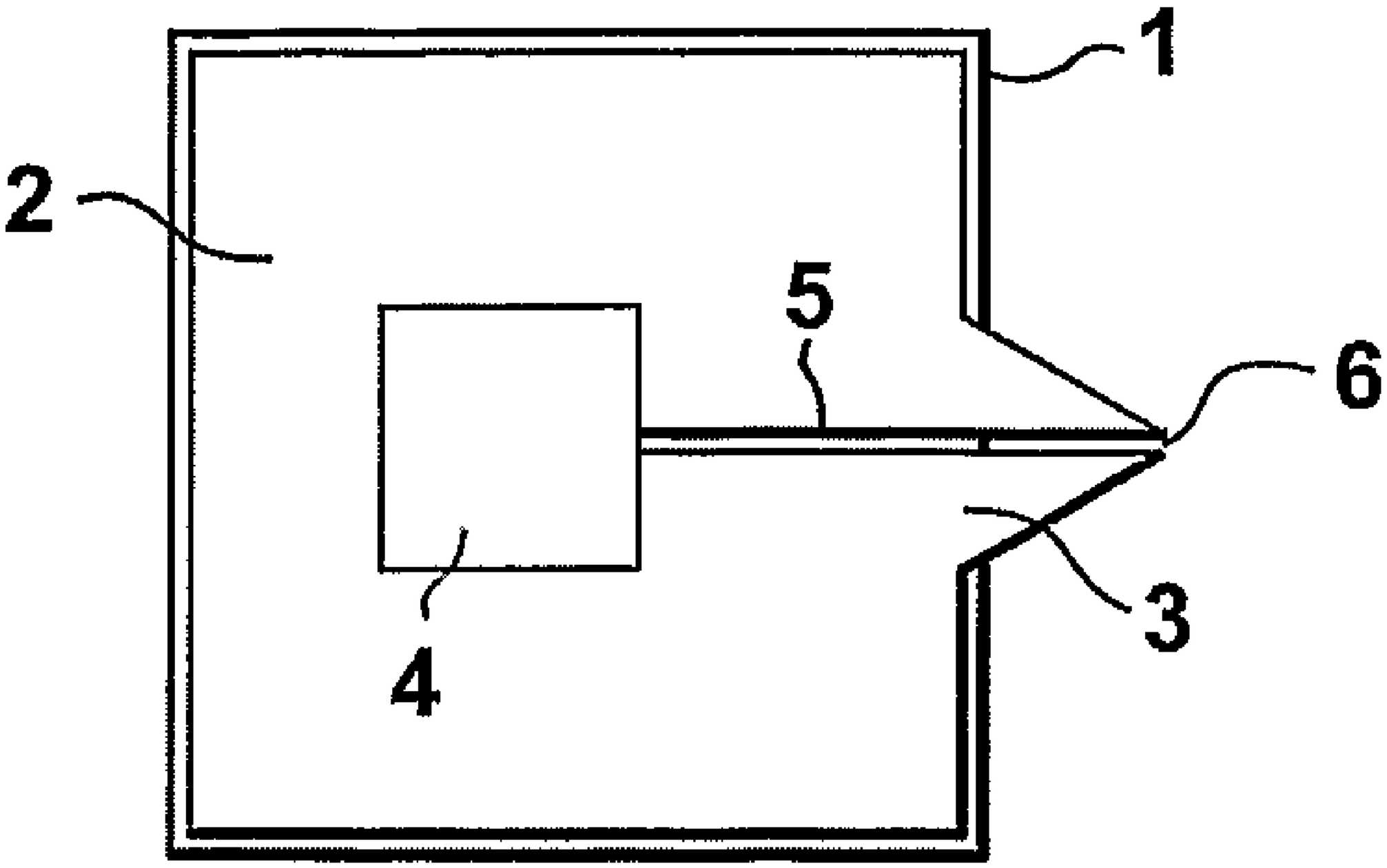
(72) Inventeurs/Inventors:
ARSCOTT, STEVE, FR;
LE GAC, SEVERINE, FR;
DRUON, CHRISTIAN, FR;
ROLANDO, CHRISTIAN, FR

(73) Propriétaires/Owners:
UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE, FR

(74) Agent: GOUDREAU GAGE DUBUC

(54) Titre : SOURCES D'ELECTRONEBULISATION PLANAIRES SUR LE MODELE D'UNE PLUME DE CALLIGRAPHIE ET LEUR FABRICATION

(54) Title: PLANAR ELECTRONEBULIZATION SOURCES MODELED ON A CALLIGRAPHY PEN AND THE PRODUCTION THEREOF



(57) Abrégé/Abstract:
L'invention concerne une source d'électronébulisation comportant une structure comprenant au moins une pointe plate et mince (3) en porte-à-faux par rapport au reste (1) de la structure, la pointe (3) étant pourvue d'une fente capillaire (5) pratiquée dans toute

CA 2545213 C 2012/02/21

(11)(21) 2 545 213

(13) C

(57) Abrégé(suite)/Abstract(continued):
l'épaisseur de la pointe et qui aboutit à l'extrémité (6) de la pointe (3) pour former l'orifice d'éjection de la source d'électronébulisation, la source comprenant des moyens d'approvisionnement (4) de la fente capillaire (5) en liquide à nébuliser et des moyens d'application d'une tension d'électronébulisation sur le liquide. L'invention concerne également un procédé de fabrication d'une telle source d'électronébulisation.

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Bureau international

(43) Date de la publication internationale
26 mai 2005 (26.05.2005)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2005/046881 A1

(51) Classification internationale des brevets[7] :
B05B 5/025, G01N 30/72

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2004/050580

(22) Date de dépôt international :
10 novembre 2004 (10.11.2004)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0350820 12 novembre 2003 (12.11.2003) FR

(71) Déposants *(pour tous les États désignés sauf US)* : **UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE** [FR/FR]; Cité Scientifique, F-59655 Villeneuve D'Ascq (FR). **CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE** [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants *(pour US seulement)* : **ARSCOTT, Steve** [GB/FR]; 4 rue des Stations, F-59000 Lille (FR). **LE GAC, Séverine** [FR/FR]; 13 rue Jean Charcot, F-94490 Ormesson sur Marne (FR). **DRUON, Christian** [FR/FR]; 19 allée des Thuyas, F-59650 Villeneuve D'Ascq (FR). **ROLANDO, Christian** [FR/FR]; 11 rue de Friedland, F-59800 Lille (FR).

(74) Mandataire : **POULIN, Gérard**; Brevalex, 3, rue du Docteur Lancereaux, F-75008 Paris (FR).

(81) États désignés *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible)* : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

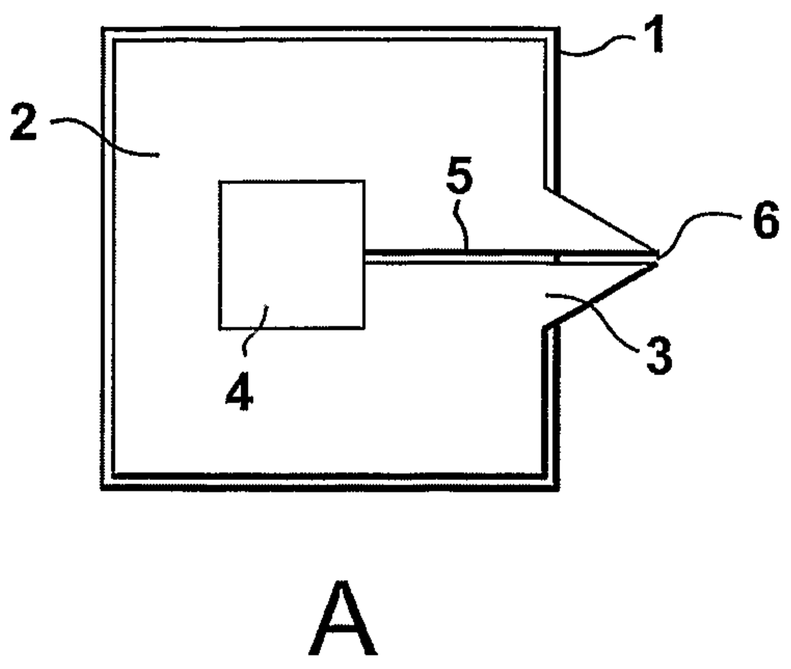
(84) États désignés *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible)* : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :
— *avec rapport de recherche internationale*

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: PLANAR ELECTRONEBULIZATION SOURCES MODELED ON A CALLIGRAPHY PEN AND THE PRODUCTION THEREOF.

(54) Titre : SOURCES D'ELECTRONEBULISATION PLANAIRES SUR LE MODELE D'UNE PLUME DE CALLIGRAPHIE ET LEUR FABRICATION.



A

(57) Abstract: The invention relates to an electronebulization source comprising at structure consisting of at least one flat, thin tip (3) disposed in a non-perpendicular position to the rest (1) of the structure, said tip (3) being provided with a capillary slit (5) inside the entire thickness of the tip and which terminates at the extremity (6) of the tip (3) to form and ejection opening for the electronebulization source, said source comprising means (4) for supplying the capillary slit (5) with liquid to be nebulized and means for applying an electronebulization voltage to the liquid. The invention also relates to a method for producing said electronebulization source.

(57) Abrégé : L'invention concerne une source d'électronébulisation comportant une structure comprenant au moins une pointe plate et mince (3) en porte-à-faux par rapport au reste (1) de la structure, la pointe (3) étant pourvue d'une fente capillaire (5) pratiquée dans toute l'épaisseur de la pointe et qui aboutit à l'extrémité (6) de la pointe (3) pour former l'orifice d'éjection de la source d'électronébulisation, la source comprenant des moyens d'approvisionnement (4) de la fente capillaire (5) en liquide à nébuliser et des moyens d'application d'une tension d'électronébulisation sur le liquide. L'invention concerne également un procédé de fabrication d'une telle source d'électronébulisation.

WO 2005/046881 A1

WO 2005/046881 A1

— *avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues*

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

SOURCES D'ELECTRONEBULISATION PLANAIRES SUR LE MODELE D'UNE PLUME DE CALLIGRAPHIE ET LEUR FABRICATION

DESCRIPTION

DOMAINE TECHNIQUE

La présente invention concerne des sources d'électronébulisation originales, leur procédé de fabrication et leurs applications.

ETAT DE LA TECHNIQUE ANTERIEURE

L'électronébulisation est le phénomène qui transforme un liquide en un nébulisat sous l'action d'une haute tension (M. CLOUPEAU "Electrohydrodynamic spraying functioning modes: a critical review. Journal of Aerosol Science (1994), 25(6), 1021-1036"). Pour ce faire, le liquide est amené dans un capillaire et est soumis à une haute tension continue ou alternative ou à une superposition des deux (Z. HUNEITI et al., "The study of AC coupled DC fields on conducting liquid jets", Journal of Electrostatics (1997), 40 & 41 97-102). En sortie de capillaire, le liquide est nébulisé sous l'action de la tension. La surface du ménisque formé par le liquide est allongée pour former un ou des cônes de Taylor d'où sont éjectées des gouttelettes de liquide chargées qui évoluent pour donner un gaz contenant des particules chargées. La formation du nébulisat est observée lorsque les forces électriques dues à l'application de la tension compensent et dépassent les forces de tension de surface du liquide

sur la section du capillaire en l'extrémité dudit capillaire.

La taille du capillaire, et plus précisément son orifice de sortie, est en relation directe avec le débit de liquide sortant du capillaire et la tension à appliquer pour observer le phénomène de nébulisation. Il existe deux régimes distincts d'électronébulisation qui se distinguent de par leurs caractéristiques d'établissement :

- le régime dit classique qui correspond à des tailles de sortie de capillaire de 100 µm, des débits de fluide dans la gamme de 1-20 µL/min et des hautes tensions de 3-4 kV ;
- le régime dit de nanoélectronébulisation où les débits de liquide sont inférieurs à 1 µL/min, la haute tension d'environ 1 kV et les diamètre internes des capillaires de 1-10 µm (M. WILM et al, "Analytical Properties of the Nanoelectrospray Ion Source", Analytical Chemistry (1996), 68(1), 1-8.).

L'application d'une tension comportant une composante alternative permet la stabilisation du processus d'électronébulisation par synchronisation sur sa fréquence propre (F. CHARBONNIER et al., "Differentiating between Capillary and Counter Electrode Processes during Electrospray Ionization by Opening the Short Circuit at the Collector. Analytical Chemistry (1999), 71(8), 1585-1591). La composition chimique des gouttes produites par le phénomène d'électronébulisation peut être améliorée en vue de ses applications par l'application de tensions multiples et indépendantes qui permettent la modification chimique

des espèces présentes dans le liquide par électrochimie (voir la demande de brevet US 2003/0015656; G. J. VAN BERKEL, "Enhanced Study and Control of Analyte Oxidation in Electrospray Using a Thin-Channel, Planar Electrode Emitter", Analytical Chemistry (2002), 74(19), 5047-5056; G.J. VAN BERKEL et al., "Derivatization for electrospray ionization mass spectrometry. 3. Electrochemically ionizable derivatives", Analytical Chemistry (1998), 70(8), 1544-1554; F. ZHOU et al. "Electrochemistry Combined Online with Electrospray Mass Spectrometry", Analytical Chemistry (1995), 67(20), 3643-3649).

Les domaines d'applications de l'électronébulisation sont les suivants :

- En premier lieu, l'ionisation de molécules (M. DOLE et al., "Molecular beams of macroions", Journal of Chemical Physics (1968), 49(5), 2240-2249 ; L. L. MACK et al., "Molecular beams of macroions. II", Journal of Chemical Physics (1970), 52(10), 4977-4986 ; le brevet US 4 209 696; M. YAMASHITA et al., "Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme", Journal of Physical Chemistry (1984), 88(20), 4451-4459 ; M. YAMASHITA et al., "Negative ion production with the electrospray ion source", Journal of Physical Chemistry (1984), 88(20), 4671-4675) avant leur analyse par spectrométrie de masse en fonction du rapport m/z où m est la masse de l'analyte et z sa charge. Dans ce cas, le débit de liquide est continu.

- Une deuxième application des dispositifs d'électronébulisation est la production de gouttes de

taille calibrée. De telles gouttes peuvent être déposées sur un support (C. J. McNEAL et al., "Thin film deposition by the electrospray method for californium-252 plasma desorption studies of involatile molecules", Analytical Chemistry (1979), 51(12), 2036-2039 ; R. C. MURPHY et al., "Electrospray loading of field desorption emitters and desorption chemical ionization probes", Analytical Chemistry (1982), 54(2), 336-338) par exemple une plaque pour, soit la production de puces d'analyse comme les puces à ADN ou à peptides, dédiées à une analyse à haut débit (V. N. MOROZOV et al., "Electrospray Deposition as a Method for Mass Fabrication of Mono- and Multicomponent Microarrays of Biological and Biologically Active Substances", Analytical Chemistry (1999), 71(15), 3110-3117; R. MOERMAN et al., "Miniaturized electrospraying as a technique for the production of microarrays of reproducible micrometer-sized protein spots", Analytical Chemistry (2001 May 15), 73(10), 2183-2189 ; N. V. AVSEENKO et al., "Immunoassay with Multicomponent Protein Microarrays Fabricated by Electrospray Deposition", Analytical Chemistry (2002), 74(5), 927-933), soit le dépôt de solutions sur une plaque MALDI (pour "Matrix Assisted Laser Desorption Ionization") avant une analyse par spectrométrie de masse (J. AXELSSON et al., "Improved reproducibility and increased signal intensity in matrix-assisted laser desorption/ionization as a result of electrospray sample preparation", Rapid Communications in Mass Spectrometry (1997), 11(2), 209-213). Ces gouttes peuvent aussi être manipulées, soit pour l'injection de

liquide dans une balance hydrodynamique pour la manipulation de gouttes uniques (M. J. BOGAN et al., "MALDI-TOF-MS analysis of droplets prepared in an electrodynamic balance: "wall-less" sample preparation", Analytical Chemistry (2002), 74(3), 489-496), soit pour leur collecte pour conduire à des molécules encapsulées ou présentant un état cristallin métastable (I. G. LOSCERTALES et al., "Micro/nano encapsulation via electrified coaxial liquid jets", Science (Washington, DC, United States) (2002), 295(5560), 1695-1698). Ici, l'éjection a lieu de manière discrète les dimensions des sources dépendent grandement de la taille des dépôts à réaliser.

- Une troisième application est le dépôt de particules de taille contrôlée contenues au sein du liquide (I. W. LENGGORO et al., "Sizing of Colloidal Nanoparticles by Electrospray and Differential Mobility Analyzer Methods", Langmuir (2002), 18(12), 4584-4591). Les particules peuvent également être remplacées pas des cellules pour la préparation de puces à cellules.

- Une quatrième application est l'injection des gouttes formées par électronébulisation dans un liquide conduisant à des émulsions de taille bien définies (R. J. PFEIFER et al., "Charge-to-mass relation for electrohydrodynamically sprayed liquid droplets", Physics of Fluids (1958-1988) (1967), 10(10), 2149-54; C. TSOURIS et al., "Experimental Investigation of Electrostatic Dispersion of Nonconductive Fluids into Conductive Fluids", Industrial & Engineering Chemistry Research (1995), 34(4), 1394-1403 ; R. HENGELMOLEN et al., "Emulsions

from aerosol sprays", Journal of Colloid and Interface Science (1997), 196(1), 12-22).

• Une cinquième application est l'écriture moléculaire sur une plaque à l'aide de molécules ou de solutions chimiques (S. N. JAYASINGHE et al., "A novel process for simulataneous printing of multiple tracks from concentrated suspensions", Materials Research Innovations (2003), 7(2), 62-64.), en vue de la fonctionnalisation du matériau ou d'un traitement chimique localisé, à une échelle pouvant être inférieure au micromètre.

Ces diverses applications peuvent être également combinées entre elles.

Usuellement, les sources utilisées pour la nanoélectronébulisation se présentent sous forme de capillaires en verre ou en silice fondue. Elles sont fabriquées par étirement à chaud ou par attaque acide du matériau afin de donner un orifice de sortie de 1 à 10 µm (M. WILM et al., "Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole's beam of macromolecules at last?", International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes (1994), 136(2-3), 167-180). La tension d'électronébulisation peut être appliquée via un revêtement extérieur conducteur approprié : un revêtement métallique comme l'or ou un alliage Au/Pd (G. A. VALASKOVIC et al., "Long-lived metalized tips for nanoliter electrospray mass spectrometry", Journal of the American Society for Mass Spectrometry (1996), 7(12), 1270-1272), l'argent (Y.-R CHEN et al., "A simple method for fabrication of silver-coated sheathless electrospray emitters", Rapid Communications

in Mass Spectrometry (2003), 17(5), 437-441), un matériau à base de carbone (X. ZHU et al., "A Colloidal Graphite-Coated Emitter for Sheathless Capillary Electrophoresis/Nanoelectrospray Ionization Mass Spectrometry", Analytical Chemistry (2002), 74(20), 5405-5409) ou un polymère conducteur comme le polyaniline (P. A. BIGWARFE et al., "Polyaniline-coated nanoelectrospray emitters: performance characteristics in the negative ion mode", Rapid Communications in Mass Spectrometry (2002), 16(24), 2266-2272). La tension d'électronébulisation peut aussi être appliquée via le liquide avec l'introduction d'un fil métallique dans la source (K. W. Y. FONG et al., "A novel nonmetallized tip for electrospray mass spectrometry at nanoliter flow rate", Journal of the American Society for Mass Spectrometry (1999), 10(1), 72-75).

Néanmoins, les dispositifs de l'art antérieur dédiés à la nanoélectronébulisation souffrent de plusieurs faiblesses (B. FENG et al., "A Simple Nanoelectrospray Arrangement With Controllable Flowrate for Mass Analysis of Submicroliter Protein Samples", Journal of the American Society for Mass Spectrometry (2000), 11, 94-99) :

- Tout d'abord, ces capillaires sont peu robustes. Leur procédé de fabrication est mal contrôlé et fournit des sources de dimensions peu reproductibles ;
- Le revêtement conducteur externe se détériore rapidement ;
- Leur mode d'utilisation est peu commode du fait de leur géométrie de type aiguille : le

liquide à nébuliser doit être introduit manuellement dans l'aiguille à l'aide d'une micropipette et d'un embout adapté de forme effilée ;

- Le chargement de la solution conduit à l'introduction de bulles d'air dans l'aiguille qui peuvent perturber ultérieurement la stabilité du nébulisat, elles doivent donc être chassées ;

- Enfin, le plus souvent, l'orifice de sortie est trop petit pour permettre le passage du liquide ; de ce fait, les capillaires doivent d'abord être cassés doucement le long d'une paroi, ce qui accroît encore le caractère aléatoire de leurs dimensions.

Ainsi, les sources standard commerciales sont-elles peu adaptées, premièrement à une nébulisation contrôlée, reproductible et de qualité, deuxièmement à l'utilisation de robots du fait du caractère entièrement manuel de leur mode d'utilisation, et, troisièmement, à une intégration sur un microsystème fluidique, comme discuté dans la suite.

Ces défauts entravent certains domaines d'applications de l'éléctronébulisation qui nécessitent à l'heure actuelle une robotisation et une automatisation des processus. Ceci est le cas des domaines d'applications recensés ci-dessus : l'analyse par spectrométrie de masse, le dépôt de gouttes de taille calibrée et l'écriture à une échelle inférieure au micromètre à l'aide d'une pointe.

Ces deux dernières décennies ont vu l'avènement de la microfluidique dans les domaines de la chimie et de la biologie. Ce secteur résulte en

partie de la miniaturisation des outils de laboratoire et donc du mariage entre microtechnologie et biologie ou microtechnologie et analyse chimique. Ainsi, les techniques de microtechnologie sont-elles mises à profit pour la fabrication de microsystèmes intégrés de taille caractéristique de l'ordre du micromètre et qui rassemblent une série de processus réactionnels et/ou analytiques, chimiques et/ou biochimiques/biologiques.

L'essor de la microfluidique dans les domaines de la chimie et de la biologie, où la rapidité et l'automatisation des processus sont aujourd'hui requises, s'explique par :

- le gain en vitesse des processus, du fait que la vitesse dépend principalement de la taille des dispositifs ; ce gain en vitesse est particulièrement important pour des champs d'applications de type diagnostic médical ou analyse environnementale, où une réponse instantanée est souvent attendue,
- la possibilité de parallélisation des processus ; la microtechnologie permet la fabrication simultanée d'un grand nombre de dispositifs identiques,
- la compatibilité des objets microfabriqués avec une interface robotique en vue de l'automatisation des processus,
- l'adéquation des volumes manipulés avec ceux dont l'expérimentateur dispose dans le cas, entre autres, des analyses biologiques ou environnementales,
- la limitation allant jusqu'à la suppression de l'intervention humaine, qui est souvent source d'erreur et de contamination,

- un gain en sensibilité, pour certaines techniques d'analyse, dont la spectrométrie de masse avec une ionisation par électronébulisation,
- globalement, de nouvelles performances qui ne correspondent pas seulement à une diminution d'échelle des outils et des techniques bien établis.

Les dispositifs microfluidiques sont fabriqués à l'aide des techniques de microtechnologie. Une large gamme de matériaux est aujourd'hui disponible pour ces microfabrications, gamme qui va du silicium et du quartz (matériaux usuels en microtechnologie) aux verres, céramiques et matériaux de type polymère, comme les élastomères ou les plastiques. Ainsi, la microfluidique bénéficie-t-elle à la fois :

- de l'héritage des matériaux et des techniques de fabrication développés et utilisés pour des applications microélectronique et,
- de nouveaux procédés de fabrication, développés en parallèle et adaptés à d'autres matériaux émergents et de grand intérêt pour des applications microfluidiques, comme les matériaux de type plastique, dont l'attrait principal réside dans leur faible coût.

Plus précisément, les matériaux envisageables pour des fabrications technologiques applicables à la chimie et à la biologie sont (T. McCREEDY, "Fabrication techniques and materials commonly used for the production of microreactors and micro total analytical systems", TrAC, Trends in Analytical Chemistry (2000), 19(6), 396-401) :

- les matériaux de type semi-conducteurs comme le silicium, matériaux traditionnels en

microtechnologie qui bénéficient de techniques de fabrication robustes et éprouvées ; parmi ces techniques de fabrication, on compte la lithographie, les gravures physiques et chimiques entre autres (P. J. FRENCH et al., "Surface versus bulk micromachining: the contest for suitable applications", Journal of Micromechanics and Microengineering (1998), 8(2), 45-53). De ce fait, le silicium notamment est le matériau le plus intéressant en termes de fabrication de petites structures à des échelles de la dizaine de nanomètres. De plus, sa chimie de surface est maîtrisée, les traitements mettant en jeu les fonctions silanols présentes à sa surface. Mais ses propriétés semi-conductrices ne sont pas toujours adaptées en fonction des applications visées. Il n'est pas transparent ce qui empêche toute technique de détection optique (absorbance UV, fluorescence, luminescence). Le coût du matériau lui-même le rend impropre pour certaines fabrications de masse (objets à usage unique notamment).

- le quartz, utilisé pour le développement des premiers microsystèmes (J. S. DANEL et al., "Quartz: a material for microdevices", Journal of Micromechanics and Microengineering (1991), 1(4), 187-98), qui est devenu peu attrayant du fait de son coût fortement élevé ; il est donc progressivement abandonné en dépit de ses propriétés physico-chimiques.

- le verre, matériau moins cher que le quartz et le silicium, qui est beaucoup utilisé du fait de ses propriétés de surface adaptées à l'établissement d'un flux électroosmotique (K. SATO et al.,

"Integration of chemical and biochemical analysis systems into a glass microchip", Analytical Sciences (2003), 19(1), 15-22). De même que pour le silicium, des groupements silanols tapissent la surface du verre. Ils laissent envisager une modification chimique ultérieure des surfaces de verre. De plus, ses propriétés de transparence en font un matériau de choix dans le cas d'une détection optique. Cependant, les techniques de fabrication ne sont pas aussi bien maîtrisées que pour le silicium; les profils de gravure sont moins propres et le rapport de forme est fort médiocre (T. R. DIETRICH et al., "Fabrication technologies for microsystems utilizing photoetchable glass", Microelectronic Engineering (1996), 30(1-4), 497-504). D'autre part, c'est un matériau fragile et cassant.

- les matériaux de type polymère, qui regroupent les plastiques les élastomères. Leur avantage principal est leur faible coût qui est compatible avec des productions de masse à bas prix de revient. La multiplicité de ces matériaux conduit à une large gamme de propriétés physico-chimiques. Leur inconvénient majeur est leur faible résistance aux hautes températures et leur sensibilité aux conditions de solvant utilisées classiquement en chimie et en biologie, milieu organique, acide, basique, qui peuvent entraîner une dégradation du matériau voire même sa dissolution. Par ailleurs, la chimie de surface de ces matériaux est mal connue, ce qui rend difficile tout traitement ultérieur des surfaces engendrées afin d'en modifier les propriétés. Les techniques de fabrication

sont tout autres et sont basées sur des techniques de moulage/injection, d'ablation laser, de LIGA (acronyme allemand pour "Lithographie, Galvanoformung, Abformung") (J. HRUBY, " Overview of LIGA microfabrication", AIP Conference Proceedings (2002), 625(High Energy Density and High Power RF), 55-61), de photolithographie, de gravure plasma.

- les matériaux de types céramiques (W. BAUER, "Ceramic materials in the microsystem technology", Keramische Zeitschrift (2003), 55(4), 266-270), qui sont des substrats inorganiques de faible coût de fabrication à l'image des matériaux plastiques. Un avantage majeur est que leur fabrication ne nécessite pas d'équipements dédiés d'entretien onéreux comme des salles blanches mais repose sur des processus simples et rapides (ablation laser, laminage, moulage, procédé sol-gel), réduisant encore le prix de revient des structures microfabriquées. Leur état de surface est comparable à celui du verre ou du silicium et enfin, le capotage est plus facile que pour d'autres matériaux, comme le verre.

En particulier, les techniques de microfabrication ont été appliquées à la réalisation de sources d'électronébulisation ou de pointe type aiguille en vue :

- d'améliorer la qualité globale des capillaires en termes de contrôle des procédés de fabrication, de reproductibilité des sources et de leurs dimensions,
- de produire un grand nombre de dispositifs identiques ou différant entre eux par une

ou plusieurs dimensions, sur une même plaque de matériau, à l'image des microcomposants en microélectronique, afin de promouvoir l'automatisation et la robotisation de l'électronébulisation.

Les fabrications à l'aide des techniques de microtechnologie de pointes d'électronébulisation obéissent à deux tendances :

- la fabrication d'une pointe d'électronébulisation qui reproduit la géométrie classique, c'est-à-dire un capillaire microfabriqué et, le plus souvent, de section circulaire. Dans cette classe peuvent être inclues également les aiguilles microfabriquées destinées à une autre application, comme celle d'injection de substances chimiques ou de mesure de potentiel biologique.
- la conception d'une source d'électronébulisation comme une sortie de microcanal ou capillaire fabriqué à l'aide de techniques de microtechnologie et ayant un profil effilé.

Ces dispositifs d'électronébulisation microfabriqués reposent, à l'image des microsystèmes fluidiques, sur l'utilisation de différents types de matériaux et différents types de procédés.

Selon la première tendance, qui vise à produire par voie technologique une géométrie de type capillaire, on recense les descriptions suivantes :

- Selon cette approche, des sources d'électronébulisation en nitrure de silicium ont été fabriquées à l'aide de techniques classiques de photolithographie et de gravure (A. DESAI et al., "MEMS Electrospray Nozzle for Mass Spectrometry", Int. Conf.

on Solid-State Sensors and Actuators, Transducers '97, (1997)). Les dimensions desdits dispositifs sont une longueur de 40 µm et un diamètre interne de l'orifice de sortie de 1 à 3 µm. Lesdites sources ont été testées en spectrométrie de masse à des tensions de nébulisation voisines de 4 kV et un débit de liquide de 50 nL/min avec des peptides standard à une concentration de quelques micromolaires. La tension de nébulisation est appliquée en amont dudit dispositif, au niveau de la jonction avec un capillaire d'alimentation en liquide, et ce, sur une connexion métallique en platine.

- Des sources d'électronébulisation fabriquées en matériau de type polymère, le parylène, matériau photolithographiable ont également été décrites (demande interntionale WO-A-00/30167; L. LICKLIDER et al., "A Micromachined Chip-Based Electrospray Source for Mass Spectrometry", Analytical Chemistry (2000), 72(2), 367-375). Ces sources ont un orifice de sortie de 5 × 10 µm et ont été présentées comme partie intégrante d'un microsystème fluidique en silicium. Elles sont connectées à des microcanaux de 100 µm de largeur et de 5 µm de hauteur. La tension requise pour la nébulisation est ici plus faible, de l'ordre de 1,2 à 1,8 kV dans des conditions de concentration et de débit de fluide équivalentes ; la tension est appliquée sur un fil métallique mis en contact avec la solution à nébuliser.

- Le silicium a aussi été utilisé pour la microfabrication de structures de type aiguille. La demande internationale WO-A-00/15321 décrit un

dispositif d'électronébulisation ressemblant à une cheminée, de diamètre interne de 10 µm pour un diamètre externe de 20 µm et une hauteur de 50 µm. On peut se référer également à l'article de G. A. SCHULTZ et al., intitulé "A Fully Integrated Monolithic Microchip Electrospray Device for Mass Spectrometry", Analytical Chemistry (2000), 72(17), 4058-4063. Ces sources résultent d'une gravure physique dite profonde du matériau. Leur fonctionnement en électronébulisation est décrit avec des hautes tensions de 1,25 kV, qui sont appliquées sur le capillaire d'alimentation en fluide situé à l'arrière de la source et qui est en matériau conducteur. Le prototype a été présenté intégré sur une plaque comprenant 100 sources de ce type, identiques et fonctionnant indépendamment les unes des autres. Le silicium et un procédé de fabrication similaire ont également été utilisés pour former des structures de type aiguille qui sont employées soit comme sources d'électronébulisation (P. GRISS et al., "Development of micromachined hollow tips for protein analysis based on nanoelectrospray ionization mass spectrometry", Journal of Micromechanics and Microengineering (2002), 12(5), 682-687; J. SJODAHL et al., "Characterization of micromachined hollow tips for two-dimensional nanoelectrospray mass spectrometry", Rapid Communications in Mass Spectrometry (2003), 17(4), 337-341), soit comme aiguilles de mesure de potentiels biologiques (demande internationale WO-A-03/15860; P. GRISS et al., "Micromachnied electrodes for biopotential measurements", IEEE/ASME Journal of

Microelectromechanical systems, 2001, 10, 10-16). Leur forme varie quelques peu en fonction de leur application; les dispositifs d'électronébulisation ressemblent aux dispositifs en silicium décrits ci-dessus, avec néanmoins, un profil qui se rétrécit en leur pointe conduisant à un plus petit orifice de sortie, alors que les aiguilles destinées à des mesures de potentiels biologiques ont une pointe très effilée. Le procédé de fabrication desdits dispositifs en silicium à l'aide de techniques de gravure profonde est fort complexe et nécessite un appareillage coûteux, encombrant et les performances, en termes de tension de nébulisation entre autres, des structures obtenues sont médiocres comparées à celles de sources standard commerciales. Par ailleurs, leur géométrie se prête mal à une intégration sur un microsystème fluidique.

• L'article de L. LIN et al., intitulé "Silicon processed microneedles", IEEE Journal of Mictroelectromechanical Systems (1999), 8, 78-84) décrit des micro-aiguilles qui sont connectées à un réseau microfluidique. Ces aiguilles ont été développées pour l'injection de substances chimiques in situ et non pour de la nébulisation, mais la géométrie de type aiguille de ces dispositifs est proche de celle des sources de nanonébulisation. Ces aiguilles sont fabriquées en nitrure de silicium et présentent un orifice de sortie rectangulaire de 9 × 30-50 µm et une hauteur de 1 à 6 mm.

• Des structures de type aiguille ont enfin été fabriquées en un autre matériau polymère, le polycarbonate, à l'aide d'un procédé d'ablation laser

(K. TANG et al., "Generation of multiple electrosprays using microfabricated emitter arrays for improved mass spectrometric sensitivity", Analytical Chemistry (2001), 73(8), 1658-1663). Leurs dimensions sont les suivantes : 30 µm de diamètre interne en leur orifice de sortie et 250 µm de hauteur. Pour cet exemple encore, les dimensions desdits dispositifs sont trop grandes pour un régime en nanoélectronébulisation puisque la tension requise pour l'observation d'un nébulisat est de 7 kV et le débit de fluide est estimé à 30 µL/min. Le procédé de fabrication est par ailleurs complexe. Ces sources se présentent sous forme d'une série de neuf sources arrangées selon un carré 3 × 3. Elles opèrent simultanément et nébulisent la même solution.

La deuxième tendance est d'usiner une pointe à la sortie d'un microcanal ou de créer une structure en pointe qui tient lieu de source d'électronébulisation. L'angle de la structure en pointe ne semble pas avoir d'influence sur le phénomène de nébulisation. Selon cette deuxième tendance:

- Les tentatives de nébulisation à la sortie d'un microcanal, sur la tranche d'un microsystème se sont révélées peu concluantes. La tension à appliquer est très élevée et, dans ces conditions, le liquide a tendance à s'étaler sur la surface de sortie, sur la tranche du microsystème (R. RAMSEY et al., "Generating Electrospray from Microchip Devices Using Electroosmotic Pumping", Analytical Chemistry (1997), 69(6), 1174-1178; Q. XUE et al., "Multichannel Microchip Electrospray Mass

Spectrometry", Analytical Chemistry (1997), 69(3), 426-430; B. ZHANG et al., "Microfabricated Devices for Capillary Electrophoresis-Electrospray Mass Spectrometry", Analytical Chemistry (1999), 71(15), 3258-3264). Ces essais ont été améliorés par un traitement chimique approprié de la surface de sortie ou en assistant de façon pneumatique la formation du nébulisat. Ceci démontre l'importance de travailler avec une structure en pointe qui conduit à une concentration du champ électrique et qui permet ainsi la nébulisation.

- L'effet de pointe peut être réalisé par insertion d'une structure plane triangulaire entre les deux plaques de matériaux définissant un microcanal (le support dans lequel le microcanal est usiné et le couvercle). Cette structure plane triangulaire est constituée d'une feuille de parylène de 5 µm d'épaisseur (J. KAMEOKA et al., "An electrospray ionization source for integration with microfluidics", Analytical Chemistry (2002), 74(22), 5897-5901). Le système intègre quatre dispositifs d'électronébulisation identiques placés en parallèle. La tension de nébulisation requise est de 2,5-3 kV pour un débit de fluide de 300 nL/min. Aucune interférence inter-sources n'a été observée.

- Un dispositif en forme d'étoile à huit branches a été fabriqué en polyméthylméthacrylate (PMMA) (C.-H. YUAN et al., "Sequential Electrospray Analysis Using Sharp-Tip Channels Fabricated on a Plastic Chip", Analytical Chemistry (2001), 73(6), 1080-1083). Chacune des branches de l'étoile constitue

un système microfluidique indépendant et la pointe de chaque branche est une source de nébulisation. Chaque branche intègre ainsi un microcanal de section 300 x 376 µm, la structure en pointe forme un angle de 90° et les huit réservoirs de liquide sont regroupés au centre de l'étoile. La tension appliquée pour l'établissement d'un cône de Taylor est élevée et égale à 3,8 kV, ce qui s'explique par les dimensions fort larges de la section du microcanal en son extrémité. Par ailleurs, le procédé de fabrication décrit repose sur l'usinage de canaux à l'aide d'un couteau, technique qui ne permet pas de réaliser des canaux et des dispositifs de nébulisation de petites dimensions.

• Un autre matériau de type polymère, le polydiméthylsiloxane (PDMS), a servi à la réalisation de structures en pointe destinées à l'électronébulisation suivant trois voies de fabrication microtechnologiques différentes, une méthode basée sur l'ablation de matériau, un procédé utilisant une double couche de résine photolithographiable et un procédé de moulage de la résine (demande internationale WO-A-02/55990; J. S. KIM et al., "Microfabrication of polydimethylsiloxane electrospray ionization emitter", Journal of Chromatography, A (2001), 924(1-2), 137-145; J.-S. KIM et al., "Microfabricated PDMS multichannel emitter for electrospray ionization mass spectrometry", Journal of the American Society for Mass Spectrometry (2001), 12(4), 463-469; J.-S. KIM et al., "Miniaturized multichannel electrospray ionization emitters on poly(dimethylsiloxane) microfluidic devices",

Electrophoresis (2001), 22(18), 3993-3999). L'orifice de nébulisation est rectangulaire et de dimensions variables allant de 30 × 100 µm à 30 × 50 µm selon le procédé de microtechnologie utilisé pour leur fabrication. Dans les différents cas, la tension de nébulisation allait de 2,5 kV à 3,7 kV pour des solutions à 1 à 10 µM et des débits élevés de quelques 100 nL/min à plusieurs µL/min.

• Enfin, le polyimide, autre matériau de type polymère relativement hydrophobe a été utilisé pour la fabrication de sources de nébulisation (GB-A-2 379 554; V. GOBRY et al., "Microfabricated polymer injector for direct mass spectrometry coupling", Proteomics (2002), 2(4), 405-412; J. S. ROSSIER et al., "Thin-chip microspray system for high-performance Fourier-transform ion-cyclotron resonance mass spectrometry of biopolymers", Angewandte Chemie, International Edition (2003), 42(1), 54-58) intégrées sur un microsystème, ou tout du moins, connectées à un microcanal de section 120 × 45 µm. Le système, le microcanal et la structure en pointe sont fabriqués par gravure plasma du polyimide. Le couvercle du système est en polyéthylène/polyéthylène téréphtalate. Le fonctionnement desdites sources en électronébulisation a été validé pour des échantillons de peptides standard à 5 µM, s'écoulant à 140 nL/min et pour des tensions de nébulisation de 1,6 à 1,8 kV. Un autre dispositif fabriqué dans le même matériau a été présenté, différant du précédent de par sa topologie ouverte et la finesse de l'épaisseur (50 µm) de matériau utilisée pour sa fabrication. Cette structure dite mince a été

testée pour des tensions d'ionisation de 1 à 2,3 kV appliquées ici sur une électrode de carbone intégrée sur le dispositif.

Globalement, les dispositifs de nébulisation recensés ci-dessus présentent des conditions de fonctionnement non conformes pour une nébulisation à petite échelle (dimensions trop grandes, tensions de nébulisation trop élevées) et résultent le plus souvent de procédés de fabrication fort complexes. De plus, le type de structure choisi pour ces différents dispositifs est pratiquement indissociable du matériau utilisé pour leur réalisation.

Pour les différents dispositifs présentés ci-dessus, la tension de nébulisation est le plus souvent appliquée au niveau du réservoir du dispositif, si le système inclut un réservoir, ou, dans le cas contraire, au niveau de l'alimentation en liquide qui est effectuée à l'aide d'un capillaire connecté au dispositif. Dans ce cas, soit le capillaire est conducteur (en acier inoxydable par exemple), soit la connexion repose sur un raccord métallique. Cependant, il a été proposé d'intégrer, sur le dispositif de nébulisation, une électrode ou zone conductrice sur laquelle est appliquée la tension de nébulisation (T. C. ROHNER et al., "Polymer microspray with an integrated thick-film microelectrode", Analytical Chemistry (2001), 73(22), 5353-5357). Cette zone conductrice est réalisée à base d'encre de carbone dans l'exemple cité.

Enfin, l'application de ces dispositifs est ciblée pour de l'électronébulisation précédant une

analyse par spectrométrie de masse et ne se prête pas à un autre type d'application.

Par ailleurs, les dispositifs de dépôt de gouttes calibrées issus de la microtechnologie ne reposent pas sur la nébulisation de la solution mais sur un effet mécanique avec la mise en contact de la pointe microfabriquée sur la surface de dépôt. Ainsi :

- Une structure mimant celle d'un stylo plume a été décrite pour l'élaboration de plaques de type des puces à ADN avec la déposition régulière de gouttes calibrées sur une surface lisse (voir la demande internationale WO-A-03/53583). Le dispositif comprend une tranchée gravée dans le matériau se terminant sur une pointe par laquelle le liquide sort. Cette structure est dite flexible et le liquide à déposer sort par mise en contact de la pointe flexible avec le substrat de dépôt, l'angle de contact étant de 20-30° par rapport à la verticale. L'application majeure ciblée par cette invention est la préparation de puces à ADNs ou autres composés à analyser.

- P. BELAUBRE et al. dans l'article "Fabrication of biological microarrays using microcantilevers", Applied Physics Letters (2003), 82(18), 3122-3124, proposent une structure de type poutre ouverte pour le dépôt de gouttes de taille reproductible. L'application du dispositif est la préparation de puces à ADN ou à protéines de façon automatisée. La structure de type poutre est tout d'abord plongée dans la solution à déposer, puis est mise en contact avec la surface de dépôt. L'éjection du liquide est provoquée par la mise en contact entre la

pointe et ladite surface. Une particularité de ce dispositif est l'intégration dans la structure de type poutre d'électrodes en aluminium qui permettent d'accroître le chargement en liquide de la pointe lorsque cette dernière est trempée dans la solution à déposer, par effet électrostatique. Ces structures de type poutre, qui ont une largeur de 210 µm en leur pointe, sont fabriquées en parallèle sur un même système. Elles permettent l'éjection de gouttes ayant un volume dans la gamme du femtolitre jusqu'au picolitre, le volume déposé dépendant linéairement du temps de contact entre la pointe et la surface, avec un débit pouvant atteindre 100 dépôts par minute.

Enfin, l'écriture moléculaire à des échelles de l'ordre du nanomètre est principalement décrite avec une pointe de microscopie AFM (Microscopie à Force Atomique) qui est trempée dans une solution chimique, à l'image d'une plume de stylo (G. AGARWAL et al., "Dip-Pen Nanolithography in Tapping Mode", Journal of the American Chemical Society (2003), 125(2), 580-583; les demandes internationales WO-A-03/48314 et WO-A-03/52514; H. ZHANG et al., "Direct-write dip-pen nanolithography of proteins on modified silicon oxide surfaces", Angewandte Chemie, International Edition (2003), 42(20), 2309-2312; L. FU et al., "Nanopatterning of "Hard" Magnetic Nanostructures via Dip-Pen Nanolithography and a Sol-Based Ink", Nano Letters (2003), 3(6), 757-760; H. ZHANG et al., "Fabrication of sub-50-nm solid-state nanostructures on the basis of dip-pen nanolithography", Nano Letters (2003), 3(1), 43-45). L'écriture a ensuite lieu par

mise en contact ou après rapprochement, suivant le mode d'utilisation de l'AFM sélectionné, de la pointe et d'une surface lisse. La solution chimique peut aussi être une solution qui attaque le matériau sur lequel elle est déposée et servir ainsi à la gravure de canaux ou d'autres structures. La technique de microscopie AFM présente l'avantage d'une forte résolution et d'une très grande précision d'écriture. Trois modes de fonctionnement sont possibles, et suivant le mode choisi, l'état de surface peut être contrôlé avant et après passage de la solution chimique d'écriture moléculaire. Néanmoins, cette technique impose l'utilisation d'un appareillage lourd, encombrant, onéreux et complexe.

Deux dispositifs d'écriture moléculaire décrits dans la littérature peuvent également être cités. Ils dérivent de la technique utilisant une pointe de microscopie AFM mais reposent sur l'utilisation d'une pointe microfabriquée. Le premier dispositif (A. LEWIS et al., "Fountain pen nanochemistry: Atomic force control of chrome etching", Applied Physics Letters (1999), 75(17), 2689-2691 ; H. TAHA et al., "Protein printing with an atomic force sensing nanofountainpen", Applied Physics Letters (2003), 83(5), 1041-1043), se présente sous forme d'une micropipette fabriquée à l'aide de techniques de microtechnologie et dont la pointe peut avoir des dimensions aussi petites que 3 et 10 nm pour ses diamètres internes et externes respectivement. Cette micropipette est néanmoins intégrée dans un appareillage AFM pour son utilisation. L'éjection de la

solution est ici provoquée non pas par une mise en contact mais en exerçant une pression sur la colonne de liquide. Ce dispositif a été testé pour son aptitude à délivrer des solutions de gravure d'une couche de chrome déposée sur une plaque de verre. Le deuxième dispositif (I. W. RANGELOW et al., ""NANOJET": Tool for the nanofabrication", Journal of Vacuum Science & Technology, B: Microelectronics and Nanometer Structures (2001), 19(6), 2723-2726; J. VOIGT et al., "Nanofabrication with scanning nanonozzle 'Nanojet'", Microelectronic Engineering (2001), 57-58 1035-1042) consiste en des pointes réalisées en silicium couvert de Cr/Au, ayant une forme pyramidale et un orifice de sortie de taille inférieure à 100 nm. Ce dispositif délivre non pas une solution chimique comme dans l'exemple précédent, mais des radicaux libres en phase gazeuse produits par une décharge plasma qui viennent attaquer le matériau mis en regard de la pointe. Ainsi, le dispositif ne consiste-t-il pas uniquement en une pointe microfabriquée mais inclut-il également une machinerie de production d'espèces très réactives, comme une décharge plasma radiofréquence ou microonde, qui peuvent attaquer le substrat.

Ces deux exemples présentent certes une pointe microfabriquée qui remplace la pointe conventionnelle de microscopie AFM, mais ils ne permettent pas de s'affranchir de la machinerie périphérique lourde et onéreuse nécessaire à leur fonctionnement. D'autre part, cette technique repose sur une mise en contact ou quasi-mise en contact de la pointe et du substrat. De ce fait, les paramètres de

fonctionnement doivent être très minutieusement contrôlés pour éviter toute détérioration de l'état de surface due à une trop grande force exercée au niveau de la pointe.

EXPOSÉ DE L'INVENTION

La présente invention concerne un dispositif d'électronébulisation bidimensionnel ayant une géométrie de type plume de calligraphie, dont la pointe tient lieu de siège pour la nébulisation.

L'invention a donc pour objet une source d'électronébulisation comportant une structure comprenant au moins une pointe plate et mince en porte-à-faux par rapport au reste de la structure, ladite pointe étant pourvue d'une fente capillaire pratiquée dans toute l'épaisseur de la pointe et qui aboutit à l'extrémité de la pointe pour former l'orifice d'éjection de la source d'électronébulisation, la source comprenant des moyens d'approvisionnement de la fente capillaire en liquide à nébuliser et des moyens d'application d'une tension d'électronébulisation sur ledit liquide.

Selon un mode avantageux, les moyens d'approvisionnement comprennent au moins un réservoir en communication fluidique avec la fente capillaire.

De préférence, la structure comprend un support et une plaque solidaire du support et dont une partie constitue ladite pointe. Les moyens d'approvisionnement peuvent comprendre un réservoir constitué par un évidement formé dans ladite plaque et en communication fluidique avec la fente capillaire.

Les moyens d'application d'une tension d'électronébulisation peuvent comprendre au moins une électrode disposée de façon à être en contact avec ledit liquide à nébuliser.

Dans le cas où la structure comprend un support et une plaque solidaire du support, les moyens d'application d'une tension d'électronébulisation peuvent comprendre le support, au moins partiellement électriquement conducteur, et/ou la plaque au moins partiellement électriquement conductrice. Avantageusement, la plaque présente une surface hydrophobe au liquide à nébuliser.

Les moyens d'application d'une tension d'électronébulisation peuvent comprendre un fil électriquement conducteur disposé pour pouvoir être en contact avec ledit liquide à nébuliser.

Les moyens d'approvisionnement peuvent comprendre un tube capillaire. Ils peuvent comprendre un canal réalisé dans un microsystème supportant ladite structure et en communication fluidique avec la fente capillaire.

Selon un mode avantageux, les moyens d'application de la tension (électrode, support, plaque, fil) permettent également l'application des tensions nécessaires pour tout dispositif placé en amont en continuité fluidique avec l'objet de la présente invention.

L'invention a aussi pour objet un procédé de fabrication d'une structure étant une source d'électronébulisation, comprenant :

- la réalisation d'un support à partir d'un substrat,

- la réalisation d'une plaque comportant une partie constituant une pointe plate et mince, ladite pointe étant pourvue d'une fente capillaire, pour véhiculer un liquide à nébuliser, pratiquée dans toute l'épaisseur de la pointe et qui aboutit à l'extrémité de la pointe,

- la solidarisation de ladite plaque sur le support, la pointe étant en porte-à-faux par rapport au support.

Ce procédé peut comprendre les étapes suivantes :

- la fourniture d'un substrat pour réaliser le support,

- la délimitation du support au moyen de tranchées gravées dans le substrat,

- le dépôt, sur une zone du substrat correspondant à la future pointe de la structure, de matériau sacrificiel selon une épaisseur déterminée,

- le dépôt de la plaque sur le support délimité dans le substrat, la pointe de la plaque étant située sur le matériau sacrificiel,

- l'élimination du matériau sacrificiel,

- le détachement du support par rapport au substrat par clivage au niveau desdites tranchées.

L'étape de dépôt de la plaque peut être un dépôt d'une plaque comprenant en évidement en communication fluidique avec la fente capillaire afin de constituer un réservoir. Le procédé peut comprendre en outre une étape de dépôt d'au moins une électrode

destinée à assurer un contact électrique avec le liquide à nébuliser.

La source d'électronébulisation selon l'invention peut être utilisée pour obtenir une ionisation d'un liquide par électronébulisation avant son analyse en spectrométrie de masse. Elle peut aussi être utilisée pour obtenir une production de gouttes de liquide de taille calibrée ou l'éjection de particules de taille fixée. Elle peut encore s'appliquer à la réalisation d'une écriture moléculaire à l'aide de composés chimiques. Elle peut encore s'appliquer à la définition du potentiel électrique de jonction d'un dispositif en continuité fluidique.

BRÈVE DESCRIPTION DES DESSINS

L'invention sera mieux comprise et d'autres avantages et particularités apparaîtront à la lecture de la description qui va suivre, donnée à titre d'exemple non limitatif, accompagnée des dessins annexés parmi lesquels :

- les figures 1A et 1B sont des vues respectivement de dessus et de côté d'une source d'életronébulisation selon la présente invention,

- la figure 2 est une vue en perspective de l'extrémité de la pointe d'une source d'électronébulisation selon la présente invention,

- les figures 3A à 3H sont des vues de dessus illustrant un procédé de fabrication de la source d'électronébulisation représentée aux figures 1A et 1B,

- les figures 4A et 4B illustrent une technique de clivage utilisable pour la mise en œuvre du procédé de fabrication illustré par les figures 3A à 3H,

- la figure 5 représente un montage utilisé lors d'un test au cours duquel une source d'électronébulisation selon l'invention est associée à un spectromètre de masse,

- la figure 6 est un graphe représentant le courant ionique total obtenu au cours du test utilisant une source d'électronébulisation selon l'invention, dans le montage de la figure 5,

- la figure 7 est un spectre de masse obtenu au cours du test utilisant une source d'électronébulisation selon l'invention dans le montage de la figure 5,

- la figure 8 représente un autre montage utilisé lors d'un test au cours duquel une source d'életronébulisation selon l'invention est associée à un spectromètre de masse,

- la figure 9 est un graphe représentant le courant ionique total obtenu au cours du test utilisant une source d'électronébulisation selon l'invention, dans le montage de la figure 8,

- la figure 10 est un spectre de masse obtenu cours du test utilisant une source d'électronébulisation selon l'invention dans le montage de la figure 8,

- la figure 11 représente un spectre de masse de fragmentation du glu-fibrinopeptide obtenu

avec une source d'électronébulisation selon la présente invention,

- la figure 12 représente un spectre de masse obtenu pour un digestat de Cytochrome C par l'intermédiaire d'une source d'électronébulisation selon la présente invention,

- la figure 13 est un graphe représentant le courant ionique total obtenu au cours d'un test utilisant une source d'électronébulisation selon l'invention,

- la figure 14 représente un spectre de masse obtenu au cours d'un test utilisant une source d'électronébulisation selon la présente invention,

- la figure 15 est un graphe représentant le courant ionique total enregistré sur un spectromètre de masse de type trappe ionique lors d'un test en couplage utilisant une source d'électronébulisation selon la présente invention,

- la figure 16 représente le spectre de masse correspondant au graphe de la figure 15.

EXPOSÉ DÉTAILLÉ DE MODES DE RÉALISATION PARTICULIERS

La présente invention s'inspire de la structure et du mode de fonctionnement d'une plume de calligraphie. Les sources planaires qui font l'objet de la présente invention sont constituées des mêmes éléments qu'une plume de calligraphie : un réservoir à liquide et une fente capillaire bidimensionnelle formée dans une pointe. La présente invention peut comporter, si cela est nécessaire, une zone de contact électrique sur laquelle est appliquée la tension nécessaire à

l'établissement d'un nébulisat. Cette zone de contact peut être structurée avec des contacts multiples et indépendants et en particulier trois contacts correspondant à une électrode de travail, permettant également d'appliquer la tension d'électronébulisation, une électrode de référence et une électrode de mesure pour permettre la modification chimique par électrochimie en vue de favoriser le processus d'électronébulisation ou de l'étudier. Ces électrodes permettent également le contrôle du processus d'électronébulisation par synchronisation sur sa fréquence propre. De même que dans la plume de calligraphie, le liquide est amené par capillarité dans la fente vers l'extrémité de la pointe de la structure de type plume où il est éjecté. L'éjection a lieu non pas par action mécanique, mais sous forme de nébulisation par application d'une haute tension sur le liquide.

Une source d'électronébulisation selon la présente invention est représentée aux figures 1A et 1B, la figure 1A étant une vue de dessus et la figure 1B une vue de côté.

Cette source d'électronébulisation comprend un support 1 et une plaque 2 solidaire du support 1. Une partie de la plaque 2 forme une pointe 3 en porte-à-faux par rapport au support 1. La plaque 2 comporte en son centre un évidement 4 révélant la surface du support 1 et constituant un réservoir. Une fente capillaire 5, révélant également le support 1, relie le réservoir 4 à l'extrémité 6 de la pointe 3 qui forme un

orifice d'éjection pour la source d'électronébulisation.

Le fonctionnement du dispositif repose sur les principes énoncés suivants. Le réservoir de liquide 4 contient le liquide ou sert de transit pour l'alimentation en liquide. Le liquide est ensuite guidé par la fente capillaire 5 en amont de laquelle est situé le réservoir 4 de liquide. La pointe de la structure permet l'établissement d'un électronébulisat.

Il en découle le mode de fonctionnement suivant. Le liquide d'intérêt est déposé ou acheminé dans le réservoir de liquide 4 par une méthode adéquate. Il est guidé vers l'extrémité 6 de la structure par capillarité. La source est amenée sur son site d'utilisation (par exemple devant un spectromètre de masse). Un potentiel est appliqué au liquide de façon à observer le nébulisat à l'extrémité 6 de la pointe.

La physique de la source ayant une géométrie de type plume repose sur les propriétés des matériaux qui la constituent et sur les dimensions de ses différents éléments. La figure 2 représente une vue tridimensionnelle de la fente capillaire au niveau de l'extrémité 6 de la pointe 3.

Le rôle du réservoir 4 est de contenir le liquide à nébuliser et d'alimenter progressivement la fente capillaire 5. La topologie de la structure est bidimensionnelle. La plaque 2 est en un matériau à caractère hydrophobe, et même plus hydrophobe que celui constituant le support 1 supportant la plaque 2, matériau qui tapisse le fond du réservoir. Ceci permet

de limiter les pertes de liquide hors du réservoir. Il est intéressant de noter à ce point que les liquides envisagés pour la nébulisation seront a priori à caractère plutôt hydrophile, tels que des solutions purement aqueuses ou mi-aqueuses mi-alcooliques, par exemple des mélanges méthanol/eau 50/50.

La fente capillaire 5 et l'extrémité 6 de la pointe 3 sont constituées dans le matériau formant la plaque 2 et leurs dimensions sont déterminées lors du procédé de fabrication. Sur la figure 2 sont indiquées des dimensions à considérer pour le fonctionnement de la source d'électronébulisation : la largeur w de la fente, sa hauteur h et sa longueur l. On suppose que du liquide est présent dans la fente capillaire 5. Lorsque la source d'électronébulisation est présenté en regard de la zone où la nébulisation est souhaitée, l'effet de gravité sur ce liquide est négligeable. Les facteurs qui vont intervenir pour le remplissage de la fente capillaire par le liquide sont : l'angle de contact (α) du liquide sur le matériau constituant la plaque 2, la tension de surface (γ) du liquide et les dimensions (l et h) de la fente capillaire 5. D'après l'équation 1, régissant l'effet de capillarité d'un liquide dans un tube capillaire, le cosinus de l'angle de contact α doit être positif pour observer l'effet de capillarité, et ceci, indépendamment de l'effet de gravité.

$$h_r = \frac{2\gamma \cos\alpha}{\rho g r} \qquad \text{(Equation 1)}$$

où (r) est le rayon interne du capillaire, (h_r) la hauteur dont monte le liquide dans le tube capillaire, (ρ) la densité du liquide, (α) est l'angle de contact du liquide sur les parois internes du tube capillaire et (g) est l'accélération de la pesanteur.

$$\gamma \cos\alpha = \gamma_{SV} - \gamma_{SL} \qquad \text{(Equation 2)}$$

où γ_{SV} est la tension de surface à l'interface solide-vapeur et γ_{SL} est la tension de surface à l'interface solide-liquide.

Tout d'abord, dans le cas où $\alpha < 90°$ ($\cos\alpha > 0$), l'équation de Young (équation 2) implique que $\gamma_{SV} > \gamma_{SL}$ et donc que l'interaction solide-liquide soit favorisée comparée à celle solide-vapeur. Le terme r apparaît dans l'équation 1. De sa valeur dépend l'observation ou non de l'effet de capillarité. Le terme r correspond au rayon du tube capillaire et, dans le cas du dispositif faisant l'objet de la présente invention, à la dimension de la fente capillaire 5. Si le liquide pénètre dans la fente capillaire, il se forme un pont-liquide entre les deux parois de la fente capillaire. On peut ainsi définir un rapport de forme R pour la fente capillaire 5, correspondant au rapport h/w. Il résulte de ce qui précède que R doit être supérieur à une valeur critique pour observer un effet de capillarité dans la fente capillaire 5 et pour que la formation du pont-liquide dans la fente capillaire 5 soit favorisée du point de vue énergétique.

Le dispositif de nébulisation peut ou non inclure des zones conductrices (voir la figure 3H). Ces zones conductrices si elles sont situées au niveau de réservoir de liquide 4 servent d'électrodes pour amener la tension de nébulisation. Par contre, si elles se situent au niveau de la fente capillaire 5, ces électrodes serviront à modifier les espèces présentes dans le liquide. Dans le cas d'une application de type électronébulisation avant analyse par spectrométrie de masse, des processus électrochimiques interviennent lors de l'ionisation des molécules. Les zones conductrices implantées de part et d'autre de la fente capillaire 5 au niveau de l'extrémité 6 de la pointe 3 permettraient de les étudier. Par ailleurs, ces phénomènes conduisent à une augmentation du rendement d'ionisation et, de ce fait, à une amélioration des conditions d'analyse. Dans le cas d'une application de type écriture moléculaire, la présence d'une quantité plus importante d'espèces radicalaires accroît la vitesse de gravure du substrat.

Néanmoins, suivant la nature du matériau choisi pour réaliser le support 1 de la source d'électronébulisation, ces zones conductrices, en particulier si leur rôle est d'amener la tension de nébulisation, peuvent ne pas être nécessaires. En effet, si un matériau conducteur (métal, Si..) est utilisé pour réaliser le support 1 ou la plaque 2, la tension sera directement appliquée sur ce matériau conducteur. Enfin, un dispositif ne comprenant pas de zones conductrices et pour lequel les matériaux ne sont pas conducteurs peut être utilisé en

électronébulisation pourvu que le contact électrique soit réalisé via le liquide. Un fil métallique plongeant dans la solution à nébuliser, au niveau du réservoir 4 ou tout autre contact conducteur assurera ainsi le rôle d'application de la tension de nébulisation.

Le dispositif peut être également connecté à une source d'alimentation en liquide en amont du réservoir 4, comme un capillaire amenant une solution provenant d'un autre appareil, d'une autre structure. Par exemple, pour une application de type spectrométrie de masse, le capillaire peut correspondre à une sortie de colonne de séparation. Pour une application de type dépôt de gouttes de taille calibrée ou écriture moléculaire, ce capillaire amène le liquide vers le dispositif de nébulisation depuis sa localisation initiale. Ledit capillaire peut être un capillaire classique commercial en silice fondue. Il peut également être un capillaire microfabriqué, c'est-à-dire un microcanal intégré sur le système supportant la source. Le capillaire peut être une piste hydrophile matérialisée sur le support 1. Dans ces deux derniers cas, la plaque 2 est intégrée sur un microsystème fluidique et joue le rôle d'interface entre ledit microsystème et le monde extérieur où la solution sortant du microsystème est utilisée. Enfin, les propriétés conductrices du dispositif ou d'un de ses éléments peuvent être utilisées pour alimenter électriquement tout système en relation fluidique avec le dispositif.

De surcroît, lesdites plaques de type plume peuvent être utilisées de façon isolée ou être intégrées en grand nombre sur un même support, et ce, en vue de la parallélisation de la nébulisation. Dans ce cas, lesdites plaques de type plumes sont indépendantes ou non les unes des autres et les solutions nébulisées sont, soit les mêmes afin d'accroître la nébulisation de ladite solution, soit différentes et, dans ce cas, les plumes fonctionnent de façon séquentielle en nébulisation. L'intégration desdites plaques de type plume peut être réalisée de façon linéaire avec un alignement desdites plaques sur un côté du support ou de façon circulaire sur un support rond. Le passage d'une source à l'autre s'effectue alors respectivement par translation ou par rotation du support.

Une large gamme de matériaux est aujourd'hui envisageable pour des fabrications microtechnologiques et en particulier de microsystèmes fluidiques : verre, matériaux à base de silicium (Si, SiO_2, nitrure de silicium...), quartz, céramiques ainsi qu'un grande nombre de matériaux macromoléculaires, plastiques ou élastomères.

La géométrie retenue pour la présente invention est compatible avec des fabrications utilisant tout type de matériaux, et ce, pour les différentes parties composant la source d'électronébulisation : le support 1, la plaque de type plume 2 et les zones conductrices. Le procédé de fabrication technologique fait de plus intervenir un ou plusieurs autre(s) matériau(x) dont le choix est adapté

en fonction des matériaux retenus pour les éléments 1, 2 et 3.

Un procédé générique de fabrication de sources d'électronébulisation selon l'invention est représenté aux figures 3A à 3H. Ce procédé de fabrication peut être découpé en sept étapes majeures qui sont détaillées ci-dessous, de façon à être applicable à n'importe quel type de matériau.

La première étape de ce procédé de fabrication est le choix du substrat destiné à constituer le support de la source d'électronébulisation. Ce substrat 10 (voir la figure 3A) peut être en matériau macromoléculaire, en verre ou bien en silicium ou encore en métal. Dans le cas de cet exemple de réalisation, c'est un substrat de silicium de 250 µm d'épaisseur.

Le début du procédé conditionne la fin de la fabrication des dispositifs d'électronébulisation. Il s'agit de la matérialisation sur le support du dispositif de lignes qui aideront au clivage du substrat afin de libérer la pointe de la source et permettre la nébulisation.

Selon la deuxième étape, une couche 11 de matériau dit de protection est déposée sur une partie du substrat 10. Le matériau de la couche 11 est choisi en fonction de la nature du matériau du substrat 10 de façon qu'une attaque de la couche 11 n'affecte pas le substrat 10. Dans cet exemple de réalisation, la couche de matériau de protection est une couche d'oxyde de silicium de 20 nm d'épaisseur. La couche 11 est d'épaisseur variable suivant la nature des matériaux du

substrat 10 et de la couche 11. La couche 11 est soumise à une étape de lithographie destinée à révéler les zones du substrat à attaquer pour définir des lignes de clivage délimitant le support de la structure. Les zones correspondantes de la couche 11 sont attaquées afin de fournir des fenêtres 12 révélant le substrat 10 (voir la figure 3B). Une fois ces zones du substrat révélées, elles sont soumises à une attaque appropriée de façon à matérialiser les lignes de clivage 13. Enfin, la couche 11 restante est éliminée. La figure 3C montre le résultat obtenu : les lignes 13, constituées de tranchées à section en V, délimitant le support de la structure à obtenir.

Au cours d'une troisième étape, une couche de matériau sacrificiel est déposée sur le substrat 10. Cette couche de matériau sacrificiel 14 permettra en fin de fabrication à la pointe de la structure de surplomber son support avant l'opération de clivage. Le substrat 10 est recouvert d'une fine couche de matériau sacrificiel d'épaisseur suffisante pour que, après sa suppression, la pointe soit suffisamment séparée du substrat 10, mais néanmoins suffisamment fine pour pouvoir s'affranchir de tout problème de contrainte et de courbure de la pointe en surplomb du support. Dans cet exemple de réalisation, la couche de matériau sacrificiel est une couche de nickel de 150 nm d'épaisseur.

La couche de matériau sacrificiel est alors soumise à une étape de lithographie et d'attaque appropriée afin de ne garder de ce matériau qu'une zone

14 correspondant à la pointe de la structure (voir la figure 3D).

La quatrième étape peut être mise en œuvre. Le substrat 10 est alors recouvert d'une couche d'un matériau destinée à constituer la plaque de la structure. En fonction du matériau du substrat, le matériau de cette couche peut être du silicium ou à base de silicium, un métal ou même un matériau de type polymère ou céramique. Dans cet exemple de réalisation, la couche de matériau destinée à constituer la plaque est une couche de 35 µm d'épaisseur en polymère SU-8 2035 acheté sous forme pré-polymérisée chez Microchem et polymérisé par un procédé photolithographique. L'épaisseur de cette couche est choisie de façon appropriée. De cette épaisseur dépendent en effet les performances en ionisation du dispositif de nébulisation, comme il a été expliqué précédemment. L'épaisseur de cette couche influence directement la hauteur h de la fente capillaire et, d'après ce qui précède, plus h est grand, plus w doit être grand afin de ne pas modifier le rapport R. Or, en fonction de l'application finale de la source de nébulisation, l'enjeu est de diminuer au maximum w afin d'accroître les performances. En revanche, si l'épaisseur de la couche destinée à constituer la plaque est trop fine, la pointe en surplomb peut se courber une fois décollée du support du fait des contraintes exercées sur le matériau. L'homme de l'art est en mesure d'adapter le présent cahier des charges en fonction de la nature du matériau de cette couche et ainsi de définir l'épaisseur optimale de matériau à déposer.

Cette couche subit alors une étape de lithographie et une attaque afin de former la plaque de type plume 2, c'est-à-dire en plus de son encombrement, le réservoir 4, la fente capillaire 5 et la pointe 3 (voir la figure 3E). Cette attaque est adaptée en fonction du matériau de la plaque. Il peut s'agir d'une technique de gravure chimique, d'une attaque physique dans le cas d'un matériau à base de silicium ou d'un métal, d'une attaque physique ou d'une photolithographie suivie d'une révélation dans le cas d'un polymère photolithographiable.

La cinquième étape peut alors être entreprise. Une fois la plaque 2 formée, la zone 14 de matériau sacrificiel sous la pointe 3 peut être ôtée. Le matériau sacrificiel est ôté par une attaque chimique appropriée. La solution pour cette attaque chimique doit être choisie judicieusement de façon à ce que tout le matériau sacrificiel soit supprimé sans que ni le support ni plaque ne soient affectés. Les matériaux de ces éléments ne doivent donc pas être sensibles à cette solution chimique. On obtient la structure montrée à la figure 3F.

La sixième étape concerne l'implantation de zones conductrices sur la structure. Comme mentionné précédemment, cette étape n'est incluse dans le procédé de fabrication que s'il est prévu de telles zones conductrices.

Que ces zones se situent au niveau du réservoir 4 (application de la tension de nébulisation) ou au niveau de la pointe (électrodes d'études physico-chimiques), le procédé le fabrication est le même. La

réalisation des zones conductrices 3 au niveau du réservoir seule sera détaillée ici.

Ces zones conductrices peuvent être en métal ou en carbone. La structure est d'abord soumise à une étape de masquage afin que seules les zones correspondant à la formation des zones conductrices soient dégagées. Le matériau conducteur choisi est alors déposé par une technique de PECVD (déposition en phase vapeur par techniques de plasma chimique) sur la structure. Dans cet exemple de réalisation, les zones conductrices sont en palladium et ont une épaisseur de 400 nm. La figure 3G montre la structure obtenue. Deux zones conductrices 7 et 8 encadrent le réservoir 4 et permettent d'y appliquer un potentiel électrique.

La septième étape de ce procédé de fabrication de la source de nébulisation est le détachement du support 1 par rapport au substrat 10 et notamment, la mise en surplomb de la pointe 3 par rapport au support 1 en utilisant les lignes de clivage 13 matérialisées à la deuxième étape de ce procédé de fabrication. La structure obtenue est représentée à la figure 3H.

Une technique de clivage avantageuse est illustrée par les figures 4A et 4B dans le cas de la mise en surplomb de la pointe. Un fil métallique fixe 20 est placé sous le support 1 au niveau des tranchées de clivage 13 réalisées de part et d'autre de la pointe. Conjointement, deux forces sont exercées sur le substrat aux endroits indiqués sur la figure 4A par des flèches. La séparation préalablement effectuée de la pointe 3 par rapport au support 1 assure ainsi de ne

pas endommager la pointe lors de l'étape de clivage. La figure 4B montre le clivage en cours de réalisation.

Ce procédé de fabrication générique est ensuite adapté en fonction des matériaux choisis pour chaque élément de la source d'électronébulisation.

Le premier champ d'applications ciblé par la présente invention est l'électronébulisation de solutions biologiques ou chimiques à analyser par spectrométrie de masse. La spectrométrie de masse est à l'heure actuelle la technique de choix pour l'analyse, la caractérisation et l'identification des protéines. Or, depuis la fin du décryptage du génome, les biologistes notamment s'intéressent de plus en plus à la protéomique, science qui vise à étudier et à caractériser l'ensemble des protéines d'un individu. Ces protéines, chez tout être humain, sont présentes à raison de plus de 10^6 molécules différentes en incluant les modifications post-traductionnelles. Ce point justifie le besoin à l'heure actuelle, de techniques et d'outils d'analyse compatibles avec une automatisation en vue d'une analyse à haut débit, et ce, notamment pour la spectrométrie de masse du fait de sa pertinence dans le cadre de l'étude des protéines. Les échantillons (ou solutions à analyser) dont dispose le biologiste sont souvent de taille restreinte (inférieure ou égale au 1 µL) et contiennent peu de matériel biologique, ce qui impose de travailler avec une technique d'analyse très sensible et consommant peu d'échantillon. Ceci fait de la spectrométrie de masse avec une ionisation par nanoélectronébulisation une des techniques d'analyse les plus utilisées pour la

caractérisation des protéines. Dans ce contexte, l'enjeu majeur est la diminution au maximum des dimensions de l'extrémité de la pointe de la source. En effet, comme mentionné dans l'introduction, il existe deux régimes d'électronébulisation pour ce type d'application, le plus intéressant en termes d'automatisation et de gain en sensibilité étant le régime de nanoélectronébulisation. Cependant, à l'heure actuelle, la vitesse d'analyse est limitée, le débit d'échantillons restreint du fait que la nanoESI-MS (pour "nano ElectroSpray Ionization - Mass Spectrometry") repose entièrement sur des processus manuels. Les outils actuels ne se prêtent pas à une analyse robotisée et automatisée. Ce contexte explique les motivations pour le développement de la présente invention pour ce type d'applications.

Le deuxième type d'applications ciblé par la présente invention est le dépôt de gouttes calibrées sur une surface lisse ou rugueuse. Ceci est de prime intérêt pour la préparation de puces à ADN, à peptides, à PNA ou tout autre type de molécules. Ce type d'applications requiert un dispositif capable de délivrer du fluide sous forme discrète, des gouttes de liquide de taille calibrée, la taille dépendant le plus souvent de la résolution espérée dans la préparation des plaques d'analyse. Plus les gouttes sont petites, plus leur dépôt peut être rapproché sur la plaque et plus la densité en dépôts et donc en substances à analyser est grande. Le dispositif faisant l'objet de la présente invention peut être utilisé à cette fin. La largeur de la fente capillaire 5, ainsi que la valeur

de la tension appliquée pour l'éjection des gouttes conditionne la taille des gouttes éjectées par ledit dispositif de nébulisation. Ainsi la résolution des plaques d'analyse peut-elle être ajustée en fonction de la largeur de la fente du dispositif. Enfin, la tension de nébulisation peut être alternative et ainsi donner une vitesse de dépôt en gouttes/minute dépendant directement de la fréquence de la tension alternative. Le dépôt de gouttes calibrées comme présenté ci-dessus peut être utilisé pour la préparation de plaques d'analyse comme les puces à ADN. Il peut aussi être appliqué à la préparation de cibles MALDI (pour "Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization") sur lesquelles les échantillons à analyser par spectrométrie de masse avec une ionisation MALDI ici, sont déposés de façon discrète avant leur cristallisation et leur introduction dans le spectromètre de masse. Ainsi, le présent dispositif de nébulisation ayant une géométrie de type plume peut-il être par exemple connecté en sortie de colonne de séparation et permettre un couplage entre une technique séparative et une analyse en ligne par spectrométrie de masse de type MALDI. Les gouttes de liquide enfin peuvent être remplacées par des cellules. Dans ce cas, les cellules sont de même éjectées de façon discrète et déposées par exemple sur une plaque en vue de l'élaboration de puces à cellules.

La troisième application ciblée par la présente invention est l'écriture moléculaire à des échelles de l'ordre de la centaine de nanomètres. A l'heure actuelle, ce type d'opérations est réalisé à

l'aide de pointes de microscopie AFM, fonctionnant à l'aide d'un appareillage lourd et encombrant. L'éjection du liquide repose sur une mise en contact ou quasi-contact de la pointe et du substrat de dépôt dans le cas de l'AFM ou sur l'application d'une pression sur le liquide. Une adaptation de cette technique est d'éjecter le liquide sous l'action d'une tension et non à l'aide d'une pression ou d'une mise en contact. En effet, dans les deux cas, l'éjection est provoquée lorsque les forces de tension du liquide au niveau de la pointe de la pipette sont « dépassées » par une autre force appliquée à la colonne de liquide. Ceci est envisageable avec un dispositif d'électronébulisation où la force électrique vient surpasser celle de tension du liquide et ainsi engendrer la formation de gouttelettes. D'autre part, la formation d'espèces réactives est intrinsèque au processus d'électronébulisation. Cette technique d'éjection du fluide supprime tout appareillage complexe de production d'espèces réactives comme des radicaux libres, tel qu'une décharge plasma ou micro-onde, en amont de la structure qui délivre le liquide.

La présente invention peut donc être utilisée à de telles fins d'écriture moléculaire sur un substrat lisse ou rugueux, la libération de la solution d'écriture (pseudo-encre) étant ici régie par application d'une tension. De même que pour le premier champ d'applications, un enjeu majeur est de minimiser la taille de l'extrémité de la pointe, cette dimension conditionnant la taille des éjections par nébulisation et par conséquent la résolution espérée en écriture sur

le substrat final. La largeur de la pointe est inférieure ou égale au micromètre. Un autre facteur influençant la taille des éjections et le débit de fluide est la tension de nébulisation appliquée au liquide. Enfin, la production d'espèces réactives, si le dispositif est utilisé pour dispenser une solution d'attaque du substrat, peut être accrue avec l'implantation d'électrodes au sein de la structure de type plume qui délivre le fluide. Ces électrodes sont alors le siège de réactions électrochimiques conduisant à la formation d'espèces réactives.

On va maintenant s'intéresser aux exemple suivants.

Exemple 1 : Design de sources de nanoélectronébulisation microfabriquées selon la présente invention.

Un premier exemple concerne les dimensions et les formes choisies pour réaliser un dispositif de nébulisation comme décrit dans la présente invention.

Ce premier dispositif présente de petites dimensions en sa pointe du fait du domaine d'applications visé, c'est-à-dire une nanoélectronébulisation pour l'ionisation de solutions avant leur analyse par spectrométrie de masse. Le dispositif est réalisé conformément aux figures 1A et 1B. Le réservoir 4 du dispositif a pour dimensions 2,5 mm × 2,5 mm × e (µm) où e est l'épaisseur de la couche de matériau utilisée pour réaliser la plaque 2. La valeur de e est proche de celle de h, considérée ci-après, l'épaisseur de matériau sacrificiel étant de

l'ordre de la centaine de nanomètres. La largeur de la fente capillaire 5 est de 8 µm à l'extrémité 6 de la pointe 3. De la valeur de cette largeur de fente découle l'épaisseur de la plaque 2 de façon à observer l'effet de capillarité et la pénétration effective du liquide dans la fente capillaire 5. Ceci est régi par la valeur du paramètre R défini comme le rapport entre la hauteur h et la largeur w de la fente, R = h/w. Il apparaît que ce rapport doit être supérieur à 1 pour que l'effet de capillarité soit observé. Ainsi, l'épaisseur de la plaque doit-elle être supérieure à une dizaine de micromètres. Par ailleurs, pour s'affranchir des problèmes de contraintes mécaniques qui se traduisent par un recourbement de la structure en extrémité 6, cette épaisseur a été fixée à 35 µm.

Exemple 2 : Fabrication des sources de design décrit dans l'exemple 1 à l'aide des matériaux silicium et SU-8.

Le deuxième exemple concerne la fabrication par microtechnologie des sources de nébulisation, comme décrit dans l'exemple 1. Les matériaux utilisés sont le silicium pour le support 1 et la résine photolithographiable négative SU-8 pour la plaque de type plume 2. Le procédé de fabrication découle du procédé décrit ci-dessus. Il est adapté aux matériaux choisis.

Un substrat de silicium orienté (100) et dopé n, de 3 pouces, est recouvert d'une couche de 200 nm d'oxyde de silicium (SiO_2), puis masqué par lithographie. La couche de SiO_2 est attaquée par une

solution acide de HF:H_2O sur les zones non masquées. Le silicium exposé est ensuite attaqué par une solution de soude (KOH) de façon à matérialiser les lignes de clivage. Une couche de 150 nm de nickel est ensuite déposée sur la surface de silicium par technique de pulvérisation sous argon (Plassys MP 450S). La couche de nickel est attaquée de façon locale par photolithographie UV (résine positive photosensible AZ1518 [1,2µm], solution de gravure HNO_3/H_2O (1:3)) de façon à ce qu'il ne reste du nickel que sous la pointe de la plume. Après suppression de toute trace de résine photolithographiable, la plaque de silicium est déshydratée à 170°C pendant 30 min, de façon à optimiser l'adhésion de la résine SU-8 sur la surface de silicium. Une couche de 35 µm de résine SU-8 est étalée sur le substrat de silicium à l'aide d'une tournette pour en homogénéiser l'épaisseur avant l'étape suivante de photolithographie. La plaque de type plume 2 est réalisée dans cette couche de résine SU-8 à l'aide de techniques classiques de photolithographie UV. Après développement de la résine SU-8 avec le réactif approprié (acétate de 1-méthoxy-2-propanol, PGMEA), la couche de nickel est attaquée avec la solution acide (HNO_3/H_2O) décrite ci-dessus. Cette étape d'attaque chimique du nickel n'affecte pas la résine SU-8 même si ce procédé peut prendre plusieurs heures. Enfin, après séchage du dispositif, le substrat 1 de silicium est scié selon la technique illustrée aux figures 4A et 4B. La technique utilisée ici préserve la structure de la plume, comme cette dernière a été auparavant décollée de son support. Une photographie de

microscopie électronique à balayage (Hitachi S4700) de la source de nébulisation de type plume fabriquée selon ce procédé confirme le décollement correct de la pointe par rapport à son support.

Le procédé de fabrication décrit ci-dessus n'inclut pas la réalisation d'électrodes.

Exemple 3 : Design de dispositif d'éjection de particules d'une centaine de micromètres.

Un troisième exemple concerne les dimensions et les formes choisies pour réaliser un dispositif d'éjection de particules ayant une taille d'une centaine de micromètres, comme décrit dans la présente invention.

Ce dispositif présente des dimensions plus larges que celui décrit dans l'exemple 1. Ici, les dimensions de la fente de capillaire 5 et du réservoir 4 doivent être compatibles avec la manipulation d'objets d'une centaine de micromètres. Du fait de cette gamme de dimensions, le dispositif décrit dans l'exemple 3 s'applique également à la manipulation de cellules de taille avoisinant 100 µm de diamètre, pour la préparation de puces à cellules par exemple.

Le réservoir 4 dudit dispositif a pour dimensions 1 cm × 1 cm × e (µm) où e est l'épaisseur de la plaque 2. De même que dans l'exemple 1, la valeur de e est définie en fonction de la largeur de la fente capillaire 5 de façon à avoir un facteur de forme R en l'extrémité 6 de la plaque qui soit supérieur à 1. Les particules manipulées par ce dispositif ont une taille de la centaine de micromètres, donc la fente capillaire

5 doit avoir une largeur supérieure à 100 µm. Cependant, les particules pouvant avoir tendance à s'agréger, cette largeur ne doit pas être choisie trop grande. Elle est de préférence voisine du double de la taille des particules manipulées. De ce fait, la largeur de la fente est fixée à 150 µm, et l'épaisseur de la plaque à 200 µm.

Le matériau retenu pour la fabrication de la plaque de type plume 2 est ici encore la résine photolithographiable négative SU-8 et le matériau choisi pour le support 1 est le verre. La résine SU-8 est intéressante ici pour la manipulation de particules comme les cellules, car ces cellules n'adhèrent pas sur ce matériau. De ce fait, le support 1 en verre est lui aussi couvert d'une fine couche de résine SU-8 afin de prévenir toute adhésion non désirée des cellules sur le dispositif.

Exemple 4 : Test des sources de nébulisation fabriquées selon l'exemple 2 en spectrométrie de masse. I : Application de la tension à l'aide d'un fil de platine.

L'exemple 4 est le test des sources de nébulisation fabriquées comme décrit dans l'exemple 2 pour une analyse en spectrométrie de masse. Dans ce premier exemple, la tension de nébulisation est appliquée à du liquide à nébuliser à l'aide d'un fil de platine plongé dans le liquide au niveau du réservoir comme illustré sur la figure 5.

Le dispositif de nébulisation est placé sur une pièce mobile 30 pouvant être déplacée en xyz. Cette

pièce mobile 30 comporte une partie métallique 31 sur laquelle est appliquée la tension d'ionisation dans le spectromètre de masse 25. Le support 1 de silicium est précautionneusement isolé de cette partie métallique 31 lors de la fixation du dispositif sur ladite pièce mobile 30 du fait des propriétés semi-conductrices de ce matériau. Le contact électrique entre la partie métallique 31 et le réservoir du dispositif est assuré à l'aide d'un fil de platine 32 introduit dans le réservoir et qui plonge dans la solution à analyser 33. La solution utilisée pour les tests de nébulisation, une solution de peptide standard (Gramicidine S), est déposée dans le réservoir du dispositif et la pièce mobile 30 est introduite dans l'entrée du spectromètre de masse 25. Les tests sont effectués sur un spectromètre de masse de type trappe ionique de chez Thermo Finnigan (LCQ DECA XP+). La tension est alors appliquée au liquide. Une caméra installée sur la trappe ionique permet de visualiser la formation du cône de Taylor, une fois la tension appliquée. La fente capillaire à une largeur de 8 µm.

La figure 6 est un graphe représentant le courant ionique total enregistré par le spectromètre de masse pour une expérience menée pendant 2 minutes avec une solution de Gramicidine S à 5 µM et une tension d'ionisation à 0,8 kV. L'axe des ordonnées représente l'intensité relative I_R. L'axe des abscisses représente le temps. La figure 7 correspond au spectre de masse obtenu avec une solution de Gramicidine S à 5 µM et une tension de 1,2 kV. Le spectre de masse a été moyenné sur 2 minutes d'acquisition du signal soit 80 scans.

Exemple 5 : Test des sources de nébulisation fabriquées selon l'exemple 2 en spectrométrie de masse. II : Application de la tension sur le support en silicium

L'exemple 5 est proche de l'exemple 4, mais ici la tension n'est pas appliquée à l'aide d'un fil de platine mais en exploitant les propriétés semi-conductrices du silicium.

L'exemple 5 est donc le test en spectrométrie de masse de sources de nébulisation fabriquées selon l'exemple 2 avec une application de la tension d'ionisation sur le matériau constituant le support 1 du dispositif de nébulisation.

De même que précédemment, le dispositif de nébulisation est fixé sur une pièce mobile 40 pouvant être déplacée en xyz et comportant une partie métallique 41. Ici, le support 1 de silicium est mis en contact électrique avec la partie métallique 41 de la pièce mobile 40 sur laquelle est appliquée la tension d'ionisation dans le spectromètre de masse 25. Le dispositif est fixé sur la partie mobile 40 à l'aide d'un ruban de téflon qui entoure le dispositif en amont du réservoir. Le test est conduit comme précédemment après introduction de la pièce mobile 40 dans la trappe ionique 25 et application de la tension. La fente capillaire possède une largeur de 8 µm.

Les tests ont été menés avec un autre peptide standard le Glu-Fibrinopeptide B. Les tensions d'ionisation, ici, sont dans la même gamme que précédemment, de 1 à 1,4 kV pour des concentrations en

peptide inférieures à 1 µM. La figure 9 représente le courant ionique total mesuré pendant 3 minutes d'acquisition du signal avec une solution à 0,1 µM et une tension de 1,1 kV. I_R est l'intensité relative et t le temps. La figure 10 est le spectre de masse obtenu pour cette acquisition et moyenné sur la période de 3 minutes soit 120 scans. I_R est l'intensité relative.

Exemple 6 : Test des sources de nébulisation fabriquées selon l'exemple 2 en spectrométrie de masse. III : Expérience de fragmentation (MS/MS).

L'exemple 6 est identique à l'exemple 5 sur la façon de conduire le test. Le montage de test est identique à celui de l'exemple précédent, le dispositif de nébulisation correspond à celui décrit dans l'exemple 1 et réalisé selon le procédé de fabrication décrit dans l'exemple 2. La tension est appliquée directement sur le matériau du support 1, le silicium, via la zone métallique 41 incluse sur la pièce mobile 40 introduite dans le spectromètre de masse 25 (voir la figure 8). La fente capillaire a une largeur de 8 µm.

La solution est la même que précédemment, une solution de peptide standard, le Glu-Fibrinopeptide B à des concentrations inférieures ou égales à 1 µM. Ici, le peptide est soumis à une expérience de fragmentation. Le peptide sous forme dichargée $(M+2H)^{2+}$ est spécifiquement isolé dans la trappe ionique et est fragmenté (paramètre d'énergie de collision normalisée de 30%, facteur d'activation de radiofréquence fixé à 0,25).

La figure 11 représente le spectre de fragmentation obtenu lors de cette expérience avec une solution à 0,1 µM et une tension de 1,1 kV. I_R est l'intensité relative. Le spectre a été moyenné sur 2-3 minutes d'acquisition du signal de nébulisation. Les différents fragments de MS/MS sont annotés avec leur séquence.

Exemple 7 : Test des sources de nébulisation fabriquées selon l'exemple 2 en spectrométrie de masse. IV : Application à l'analyse d'un mélange biologique.

L'exemple 7 est identique à l'exemple 5 (même dispositif fabriqué selon le même procédé et testé dans les même conditions avec application de la tension sur le support 1 en silicium) sauf que l'échantillon analysé ici n'est plus un peptide standard mais un mélange complexe de peptides obtenu par digestion d'une protéine, le Cytochrome C. Ce digestat se compose de 13 peptides de longueurs et de propriétés physico-chimiques différentes. Ce digestat est testé à une concentration de 1 µM et avec une tension d'ionisation de 1,1-1,2 kV. La largeur de la fente capillaire est de 8 µm.

La figure 12 représente le spectre de masse obtenu pour le digestat de Cytochrome C à 1 µM avec une tension de 1,2 kV. I_R est l'intensité relative. Les pics sont annotés avec la séquence du fragment ainsi que son état de charge. Sur les 15 peptides, 11 sont clairement identifiés lors de cette expérience.

Exemple 8 : Test des sources de nébulisation fabriquées selon l'exemple 2 en spectrométrie de masse. V : Alimentation dudit dispositif en continu à l'aide d'un pousse-seringue ou d'une chaîne de nanoLC placé en amont.

L'exemple 8 est identique à l'exemple 5 (même dispositif fabriqué selon le même procédé et testé dans les même conditions avec application de la tension sur le support 1 en silicium) sauf que l'échantillon analysé ici est amené sur ledit dispositif en continu par un capillaire connecté à un pousse-seringue ou une chaîne de nanoLC en amont.

Pour le couplage à un pousse-seringue, le débit de liquide a été fixé à 500 nL/min. La solution pour ce test est identique à celle de l'exemple 5, sauf que la concentration du peptide Glu-Fibrinopeptide B est ici de 1 µM et la tension de nébulisation a été fixée à 1,2 kV. La largeur de la fente capillaire est de 8 µm.

La figure 13 présente le courant ionique total enregistré lors d'un test de nébulisation mené sur une période de 6 minutes dans lesdites conditions. I_R est l'intensité relative et t le temps. La figure 14 représente le spectre de masse correspondant et moyenné sur cette période d'acquisition de 6 minutes soit 240 scans. I_R est l'intensité relative.

Le couplage à une chaîne de nanoLC (chromatographie liquide à un débit de 1 à 1000 nL/min) a été effectué avec des conditions classiques de couplage entre une séparation sur nanoLC et une analyse en ligne par spectrométrie de masse sur une trappe

ionique. Le débit de fluide est de 100 nL/min, la tension d'ionisation de 1,5 kV. L'expérience de séparation est effectuée sur un digestat de Cytochrome C à 800 fmol/µL et 800 fmol de ce digestat sont injectés sur la colonne de séparation. La largeur de la fente capillaire est de 10 µm. La figure 15 représente le courant ionique total détecté sur le spectromètre de masse lors de l'expérience de séparation. I_R est l'intensité relative et t le temps. La figure 16 est le spectre de masse obtenu pour le pic indiqué sur la figure 15 au temps de rétention de 23,8 min. Il correspond à l'élution et à l'analyse du fragment 92-99 du Cytochrome C. I_R est l'intensité relative.

REVENDICATIONS

1. Source d'électronébulisation comportant une structure comprenant au moins une pointe plate et mince (3) en porte-à-faux par rapport au reste de la structure, ladite pointe (3) étant pourvue d'une fente capillaire (5) pratiquée dans toute l'épaisseur de la pointe et qui aboutit à l'extrémité (6) de la pointe (3) pour former l'orifice d'éjection de la source d'électronébulisation, la source comprenant des moyens d'approvisionnement (4) de la fente capillaire (5) en liquide à nébuliser et des moyens d'application d'une tension d'électronébulisation sur ledit liquide.

2. Source d'électronébulisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que les moyens d'approvisionnement comprennent au moins un réservoir (4) en communication fluidique avec la fente capillaire (5).

3. Source d'électronébulisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que la structure comprend un support (1) et une plaque (2) solidaire du support et dont une partie constitue ladite pointe (3).

4. Source d'électronébulisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que les moyens d'approvisionnement comprennent un réservoir (4) constitué par un évidement formé dans ladite plaque (2) et en communication fluidique avec la fente capillaire (5).

5. Source d'électronébulisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que les moyens d'application d'une tension d'électronébulisation comprennent au moins une électrode (7, 8) disposée de façon à être en contact avec ledit liquide à nébuliser.

6. Source d'électronébulisation selon l'une quelconque des revendications 3 ou 4, caractérisée en ce que les moyens d'application d'une tension d'électronébulisation comprennent le support, au moins partiellement électriquement conducteur, et/ou la plaque au moins partiellement électriquement conductrice.

7. Source d'électronébulisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que les moyens d'application d'une tension d'électronébulisation comprennent un fil électriquement conducteur (32) disposé pour pouvoir être en contact avec ledit liquide à nébuliser.

8. Source d'électronébulisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que les moyens d'approvisionnement comprennent un tube capillaire.

9. Source d'électronébulisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que les moyens d'approvisionnement comprennent un canal

réalisé dans un microsystème supportant ladite structure et en communication fluidique avec la fente capillaire.

10. Source d'électronébulisation selon l'une des revendications 3 ou 4, caractérisée en ce que la plaque (2) présente une surface hydrophobe au liquide à nébuliser.

11. Procédé de fabrication d'une structure étant une source d'électronébulisation, comprenant :

- la réalisation d'un support (1) à partir d'un substrat (10),
- la réalisation d'une plaque (2) comportant une partie constituant une pointe plate et mince (3), ladite pointe étant pourvue d'une fente capillaire (5), pour véhiculer un liquide à nébuliser, pratiquée dans toute l'épaisseur de la pointe et qui aboutit à l'extrémité de la pointe,
- la solidarisation de ladite plaque (2) sur le support (1), la pointe (3) étant en porte-à-faux par rapport au support.

12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- la fourniture d'un substrat (10) pour réaliser le support (1),
- la délimitation du support (1) au moyen de tranchées (13) gravées dans le substrat (10),
- le dépôt, sur une zone du substrat correspondant à la future pointe de la structure, de

matériau sacrificiel (14) selon une épaisseur déterminée,

- le dépôt de la plaque (2) sur le support (1) délimité dans le substrat (10), la pointe (3) de la plaque (2) étant située sur le matériau sacrificiel (14),

- l'élimination du matériau sacrificiel (14),

- le détachement du support (1) par rapport au substrat (10) par clivage au niveau desdites tranchées (13).

13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que l'étape de dépôt de la plaque (2) est un dépôt d'une plaque comprenant en évidement en communication fluidique avec la fente capillaire (5) afin de constituer un réservoir (4).

14. Procédé selon l'une des revendications 12 ou 13, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une étape de dépôt d'au moins une électrode (7, 8) destinée à assurer un contact électrique avec le liquide à nébuliser.

15. Application de la source d'électronébulisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 pour obtenir une ionisation d'un liquide par électronébulisation avant son analyse en spectrométrie de masse.

16. Application de la source d'électronébulisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 pour obtenir une production de gouttes de liquide de taille calibrée ou l'éjection de particules de taille fixée.

17. Application de la source d'électronébulisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 à la réalisation d'une écriture moléculaire à l'aide de composés chimiques.

18. Application de la source d'électronébulisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 à la définition du potentiel électrique de jonction d'un dispositif en continuité fluidique.

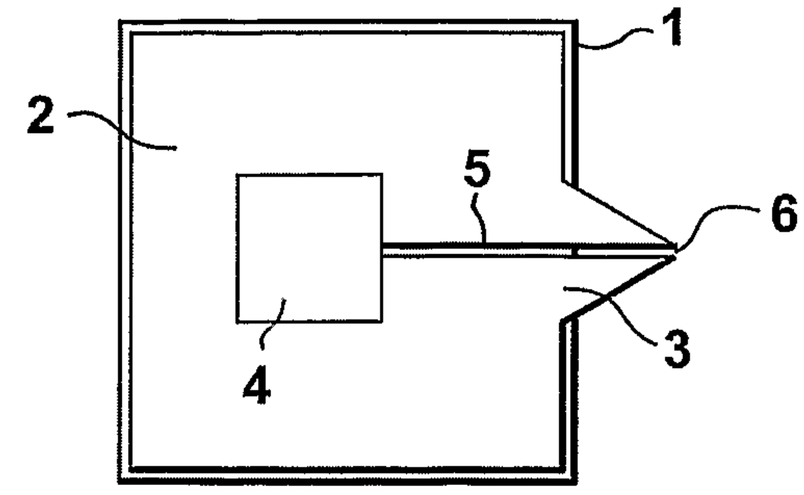


FIG. 1A

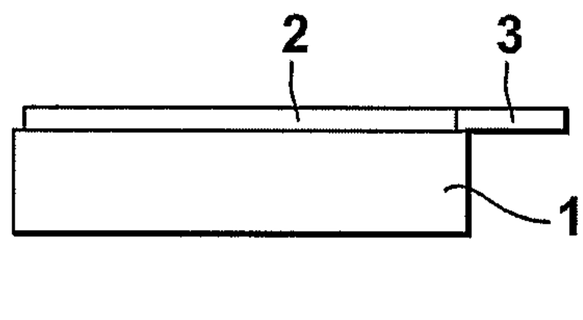


FIG. 1B

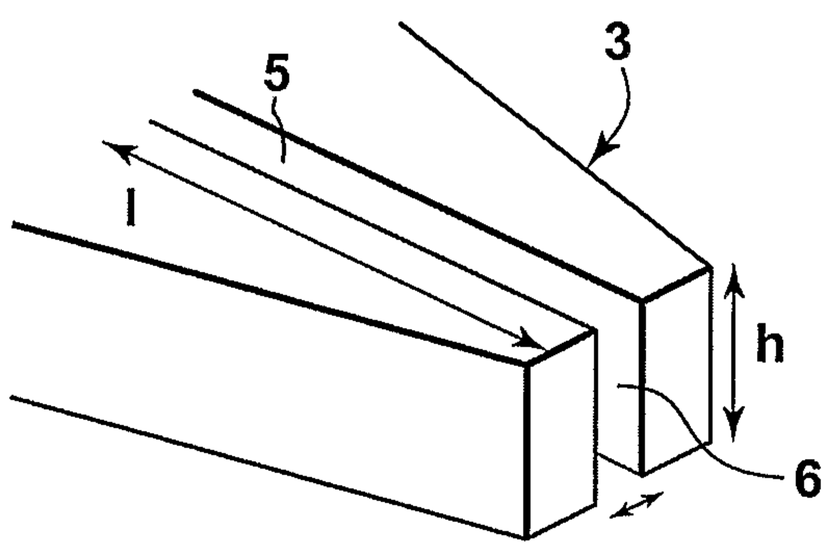


FIG. 2

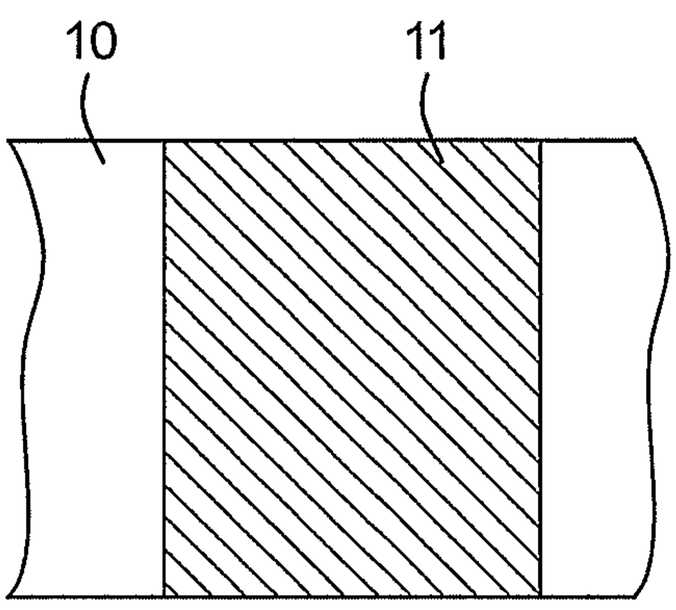


FIG. 3A

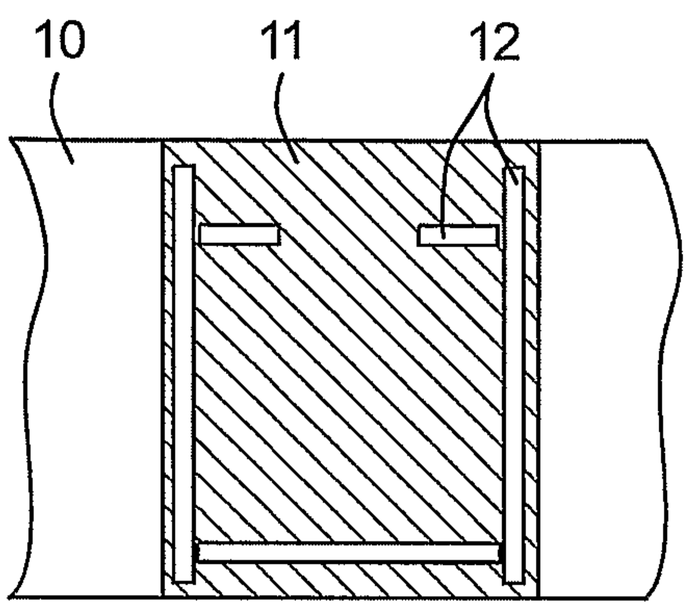


FIG. 3B

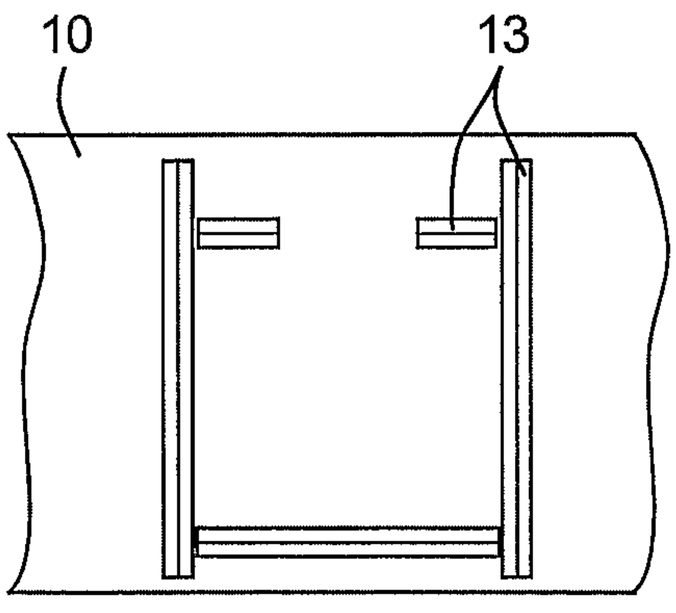


FIG. 3C

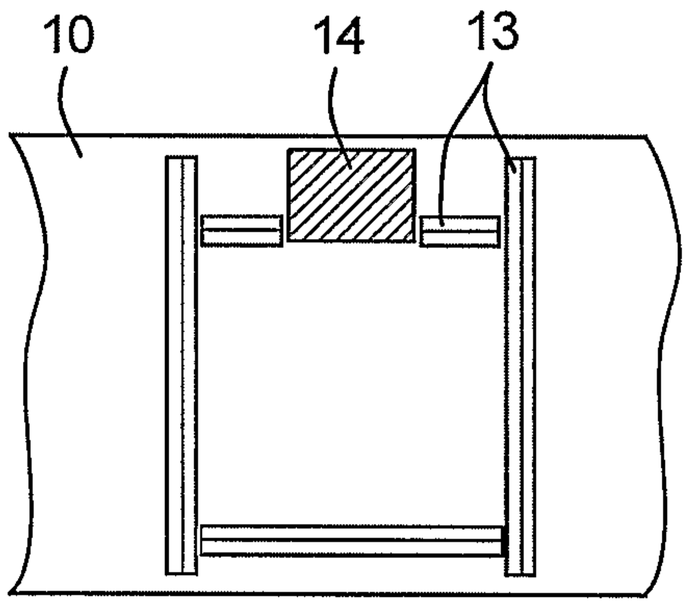


FIG. 3D

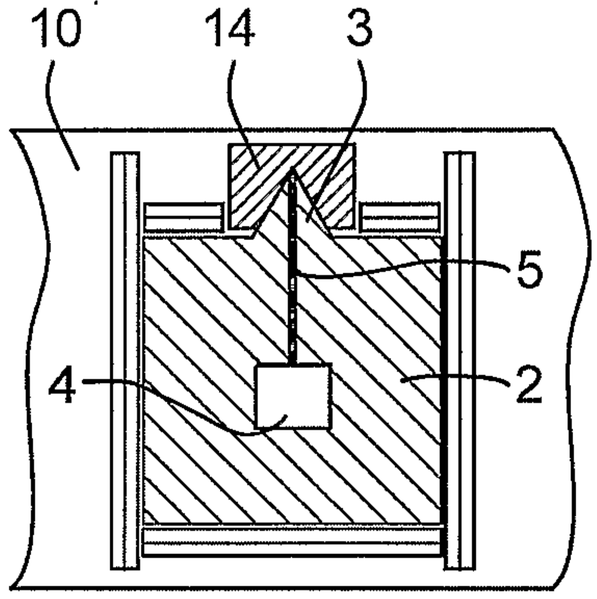


FIG. 3E

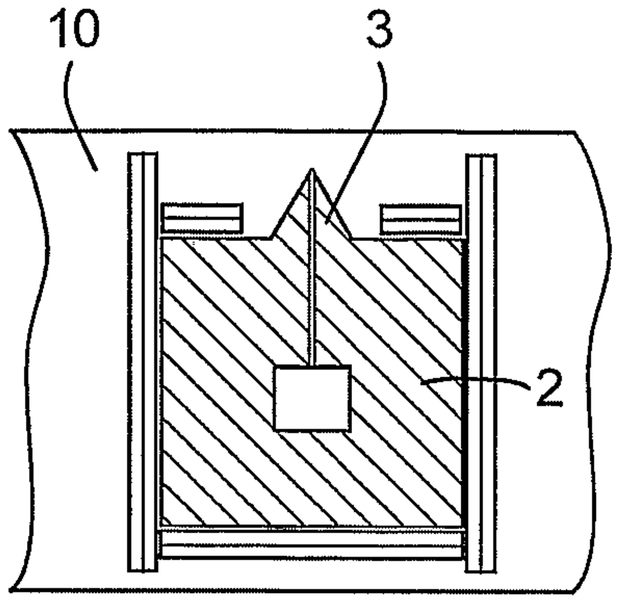


FIG. 3F

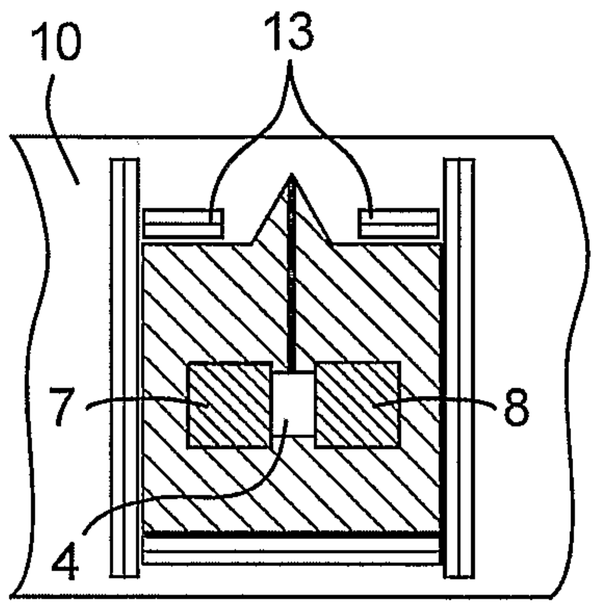


FIG. 3G

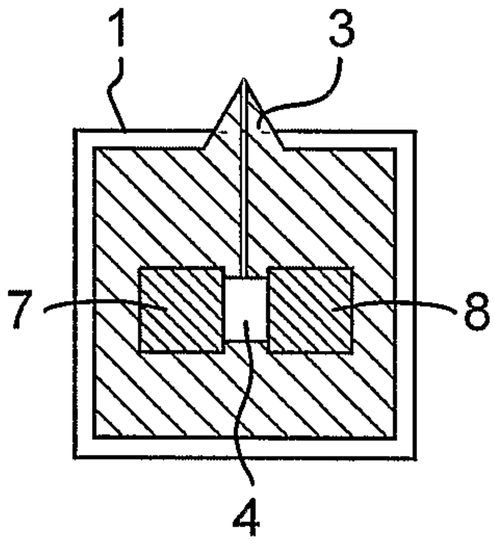


FIG. 3H

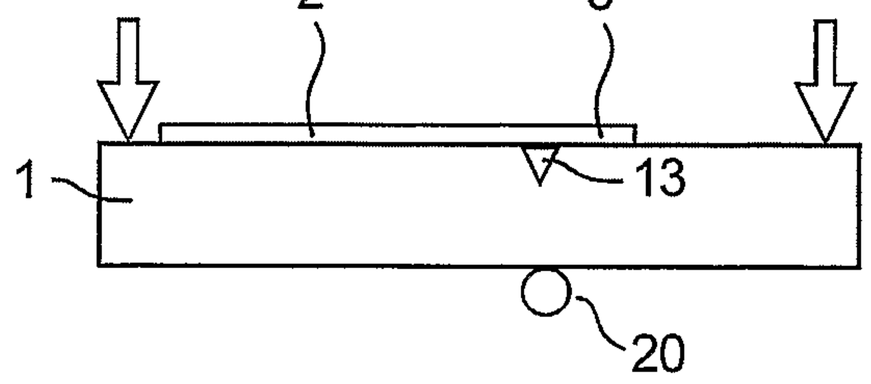


FIG.4A

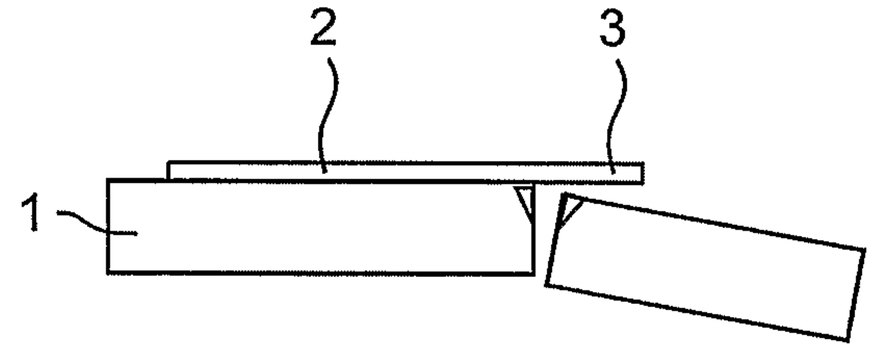


FIG.4B

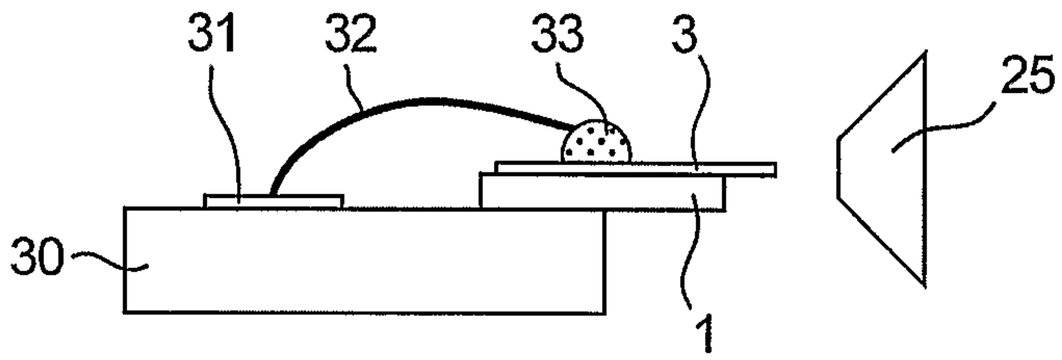


FIG.5

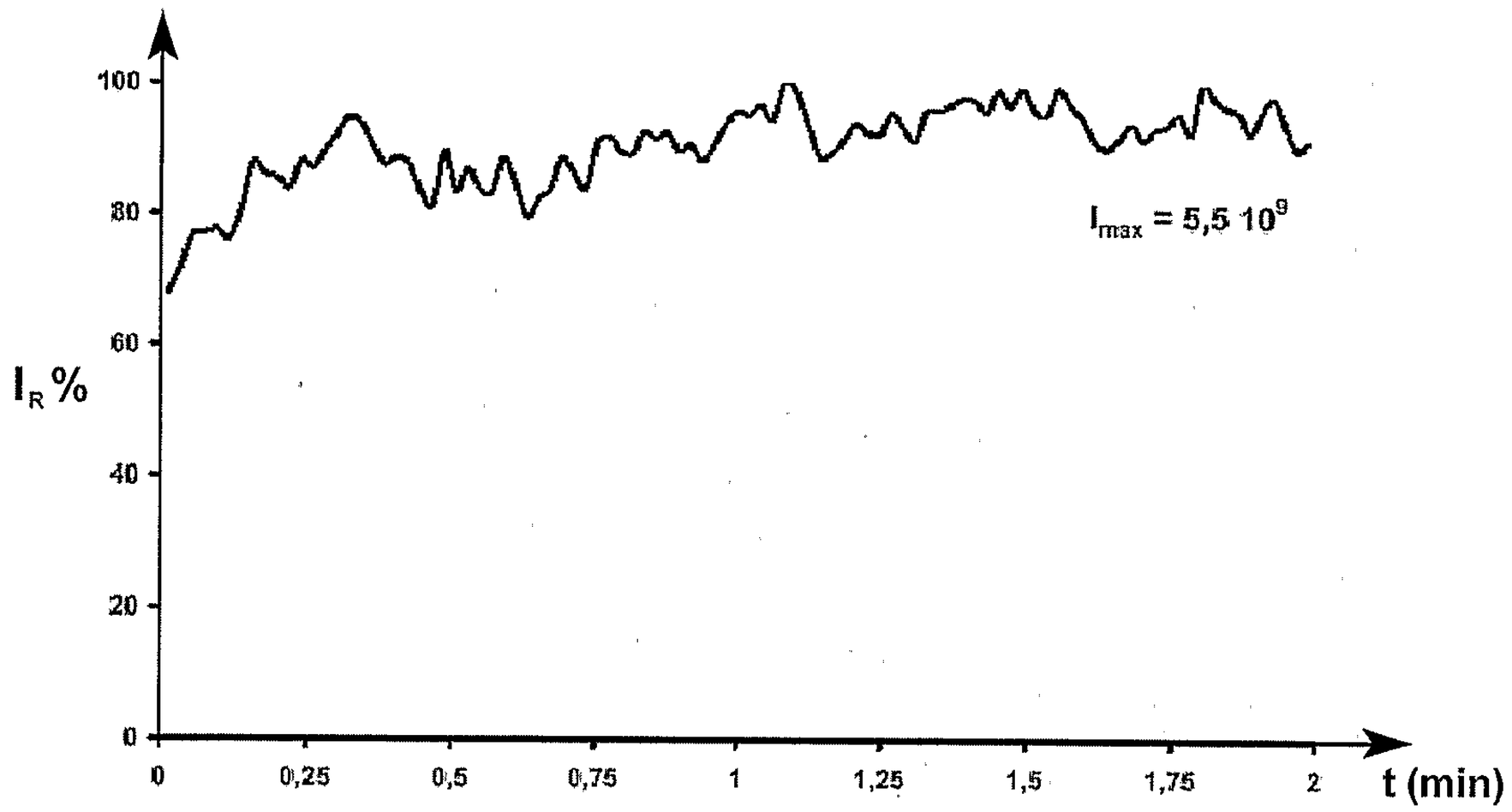

100
80
60
40
20
0
I_R %
I_{max} = 5,5 10^9
0
0,25
0,5
0,75
1
1,25
1,5
1,75
2
t (min)

FIG.6

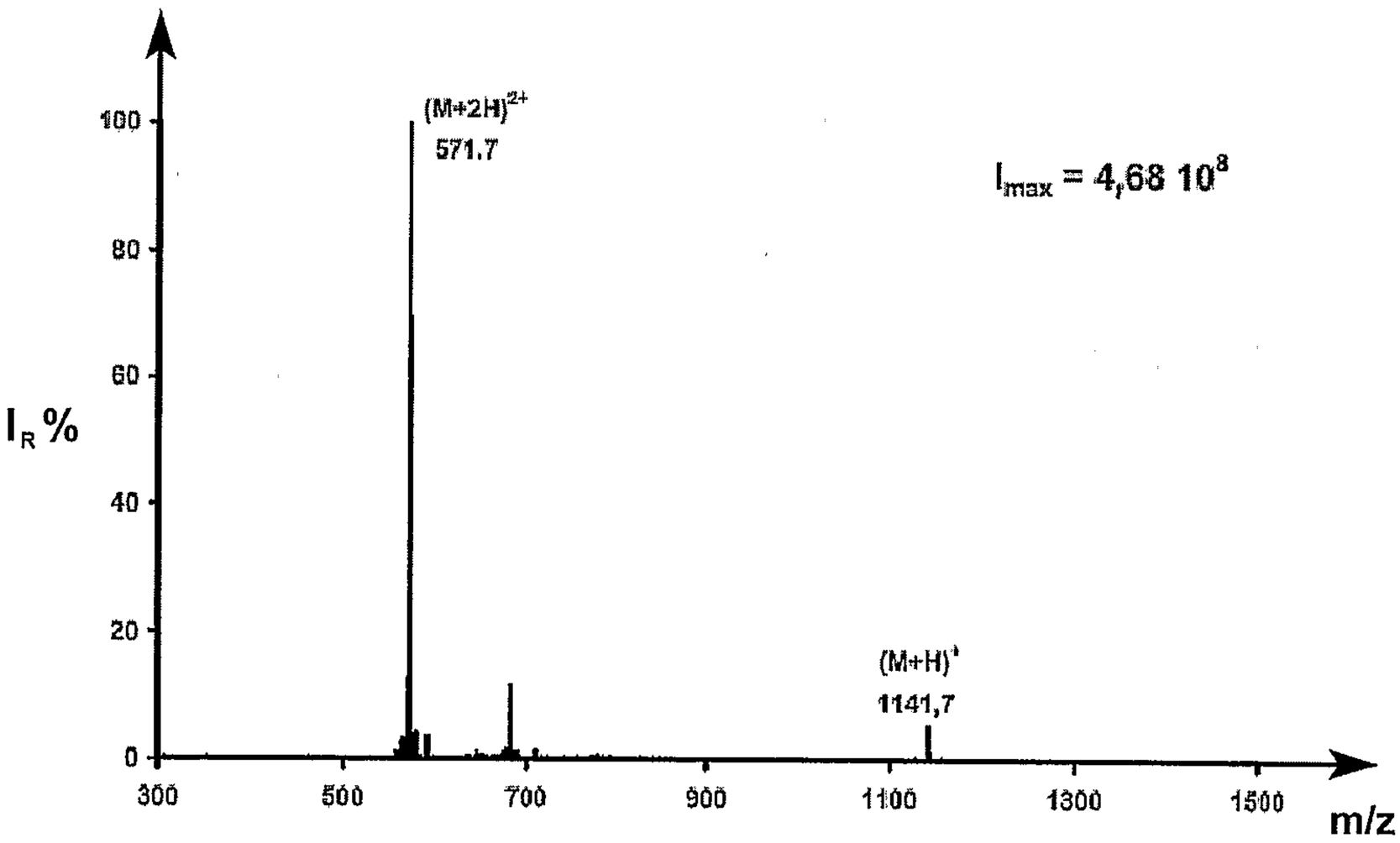

100
80
60
40
20
0
I_R %
$(M+2H)^{2+}$
571.7
I_{max} = 4,68 10^8
$(M+H)^+$
1141,7
300
500
700
900
1100
1300
1500
m/z

FIG.7

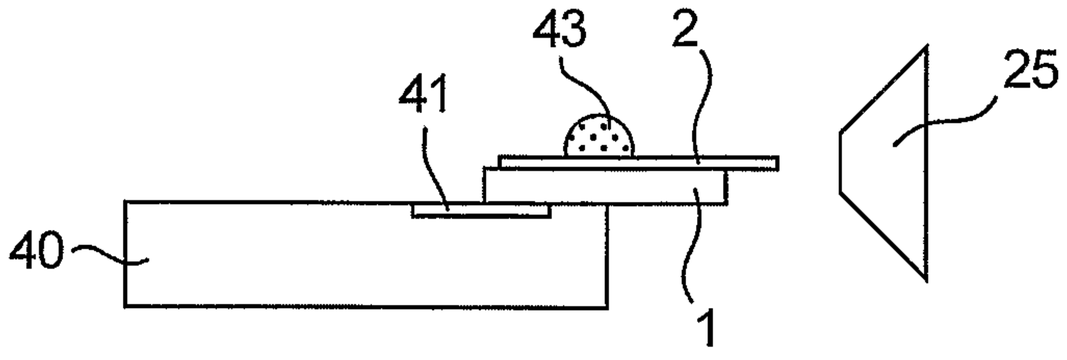


FIG.8

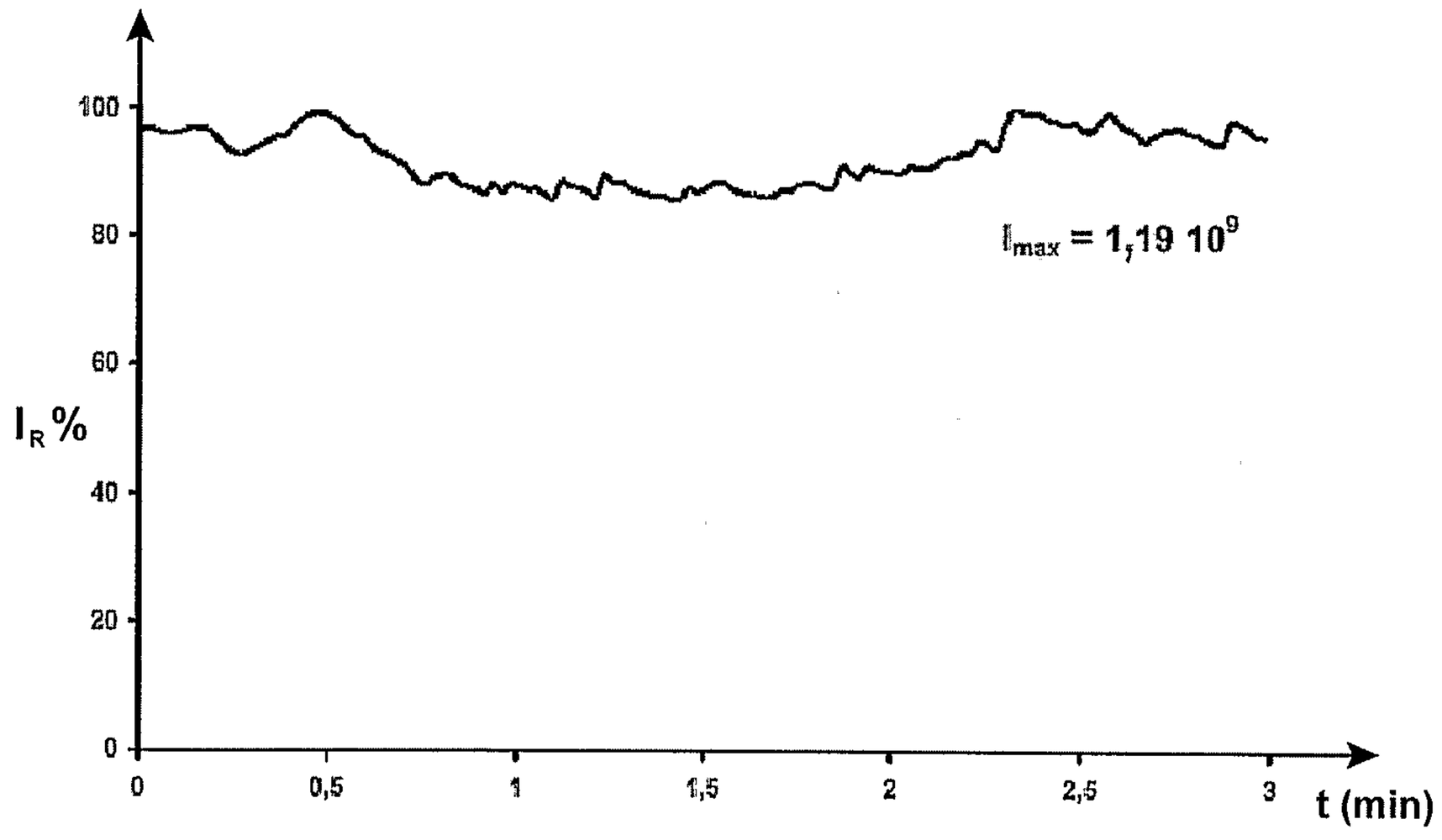


FIG.9

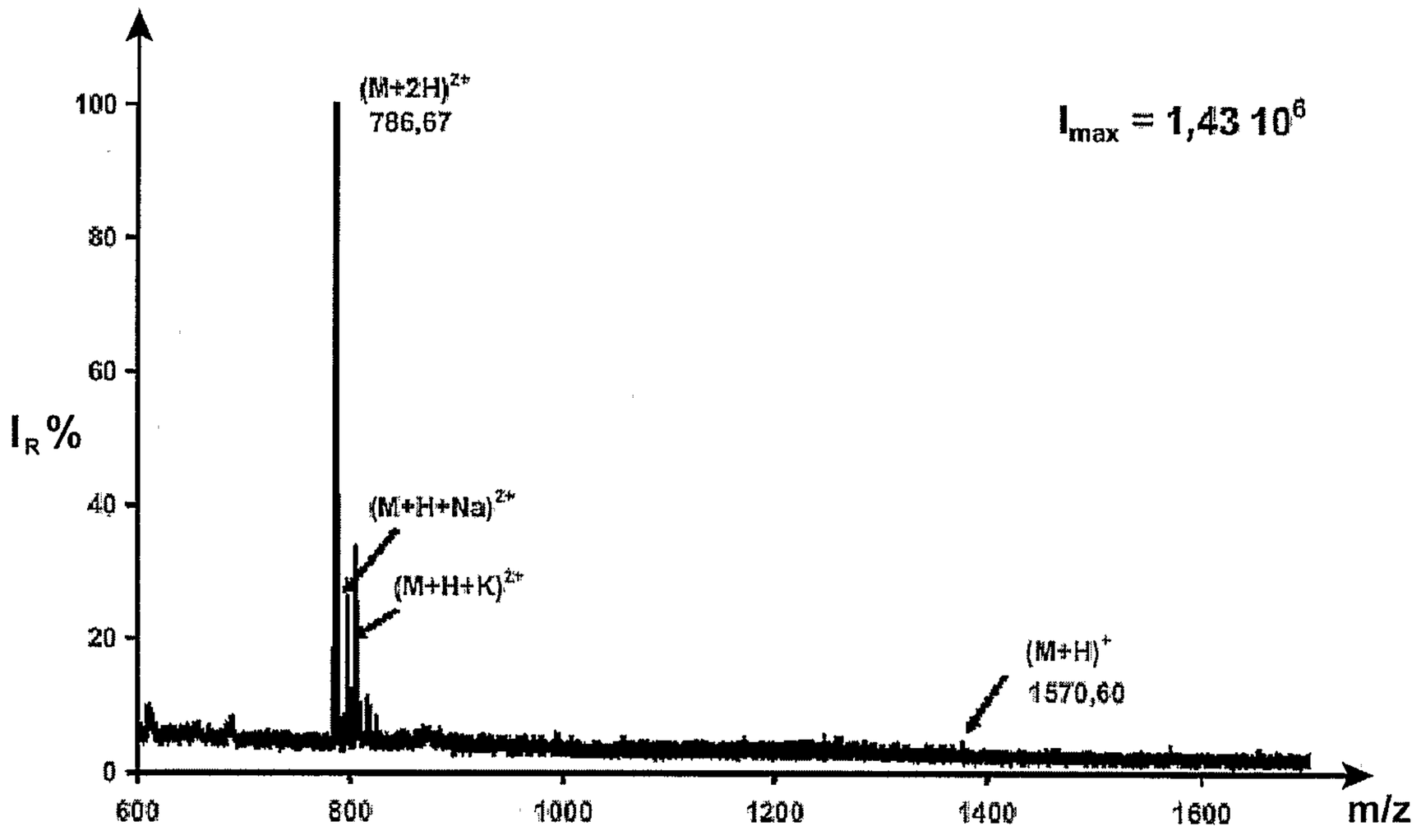

I_{max} = 1,43 10^6
I_R %
100
80
60
40
20
0
600
800
1000
1200
1400
1600
m/z
(M+2H)$^{2+}$
786,67
(M+H+Na)$^{2+}$
(M+H+K)$^{2+}$
(M+H)$^+$
1570,60

FIG. 10

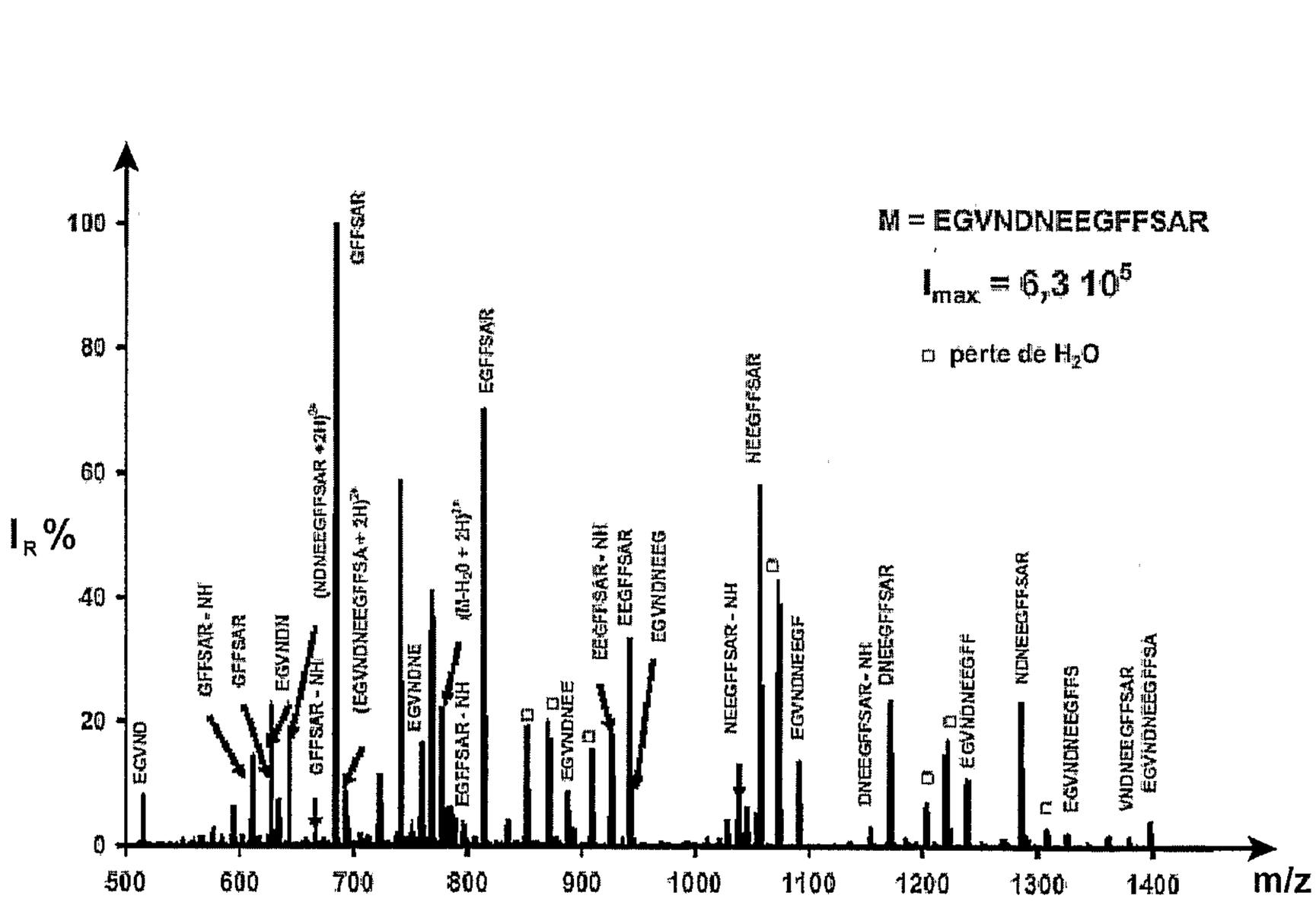

M = EGVNDNEEGFFSAR
I_{max} = 6,3 10^5
□ perte de H_2O
I_R %
100
80
60
40
20
0
500
600
700
800
900
1000
1100
1200
1300
1400
m/z
EGVND
GFFSAR - NH
GFFSAR
EGVNDN
GFFSAR - NH
(EGVNDNEEGFFSAR +2H)$^{2+}$
EGVNDNE
EGFFSAR - NH
(M-H$_2$O + 2H)$^{2+}$
EGFFSAR
EGVNDNEE
EEGFFSAR
EGVNDNEEG
NEEGFFSAR - NH
NEEGFFSAR
EGVNDNEEGF
DNEEGFFSAR - NH
DNEEGFFSAR
EGVNDNEEGFF
NDNEEGFFSAR
EGVNDNEEGFFS
VNDNEEGFFSAR
EGVNDNEEGFFSA

FIG. 11

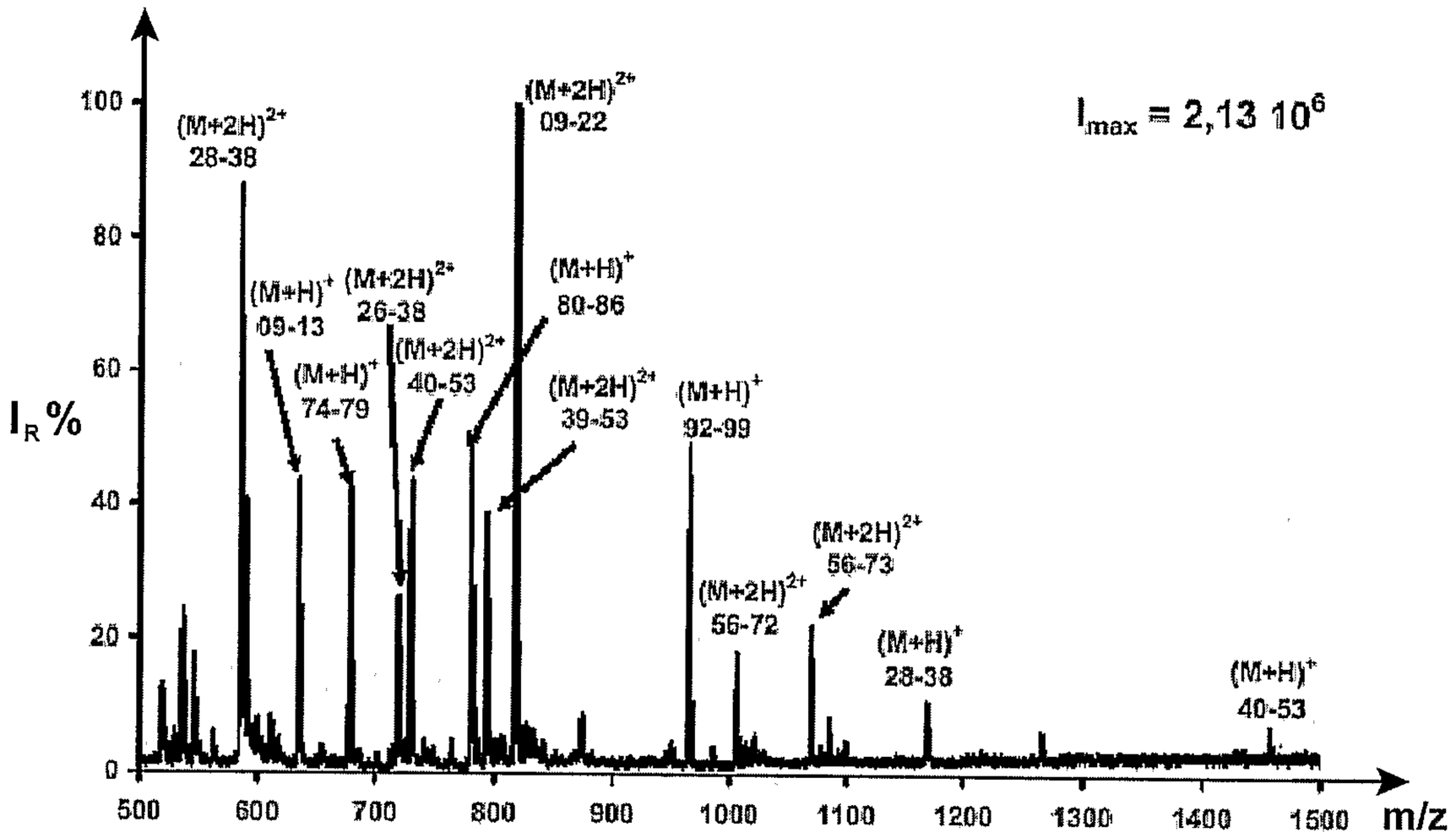

I_{max} = 2,13 10^6
I_R %
100
80
60
40
20
0
500
600
700
800
900
1000
1100
1200
1300
1400
1500
m/z
$(M+2H)^{2+}$ 28-38
$(M+H)^+$ 09-13
$(M+2H)^{2+}$ 26-38
$(M+H)^+$ 74-79
$(M+2H)^{2+}$ 40-53
$(M+2H)^{2+}$ 09-22
$(M+H)^+$ 80-86
$(M+2H)^{2+}$ 39-53
$(M+H)^+$ 92-99
$(M+2H)^{2+}$ 56-72
$(M+2H)^{2+}$ 56-73
$(M+H)^+$ 28-38
$(M+H)^+$ 40-53

FIG. 12

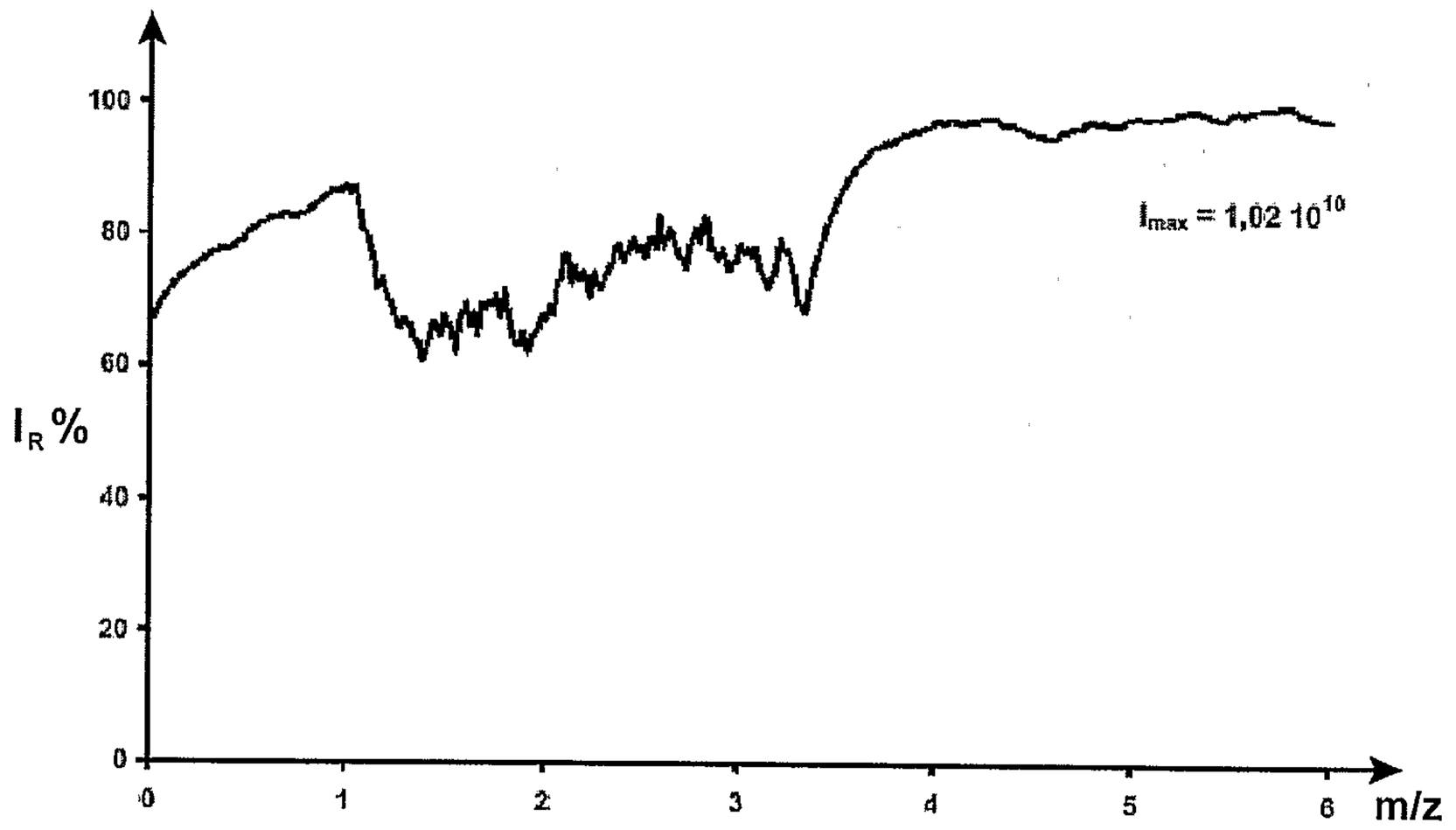

I_{max} = 1,02 10^{10}
I_R %
100
80
60
40
20
0
0
1
2
3
4
5
6
m/z

FIG. 13

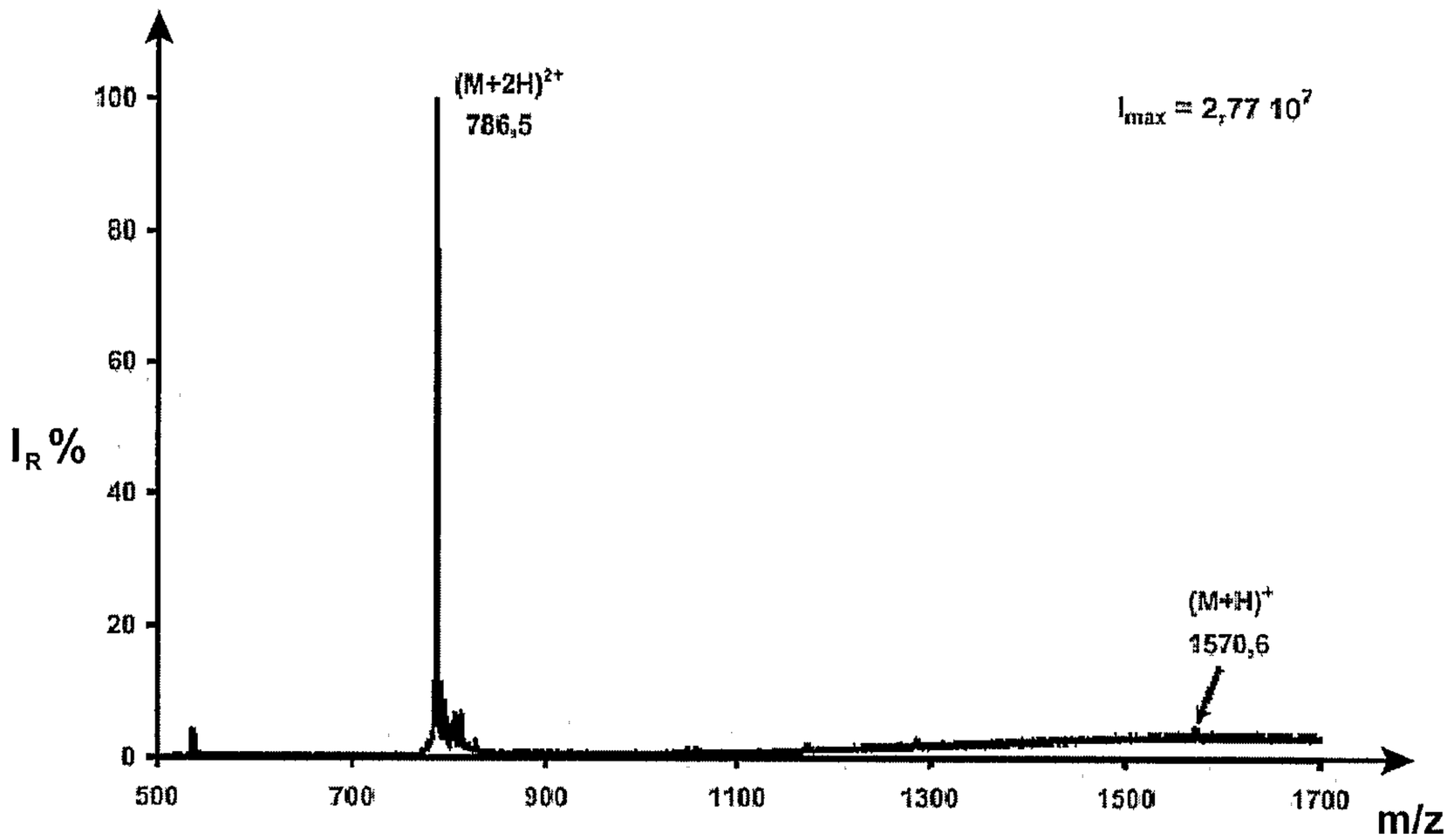

100
80
60
40
20
0
I_R %
500
700
900
1100
1300
1500
1700
m/z
$(M+2H)^{2+}$
786,5
I_{max} = 2,77 10^7
$(M+H)^+$
1570,6

FIG. 14

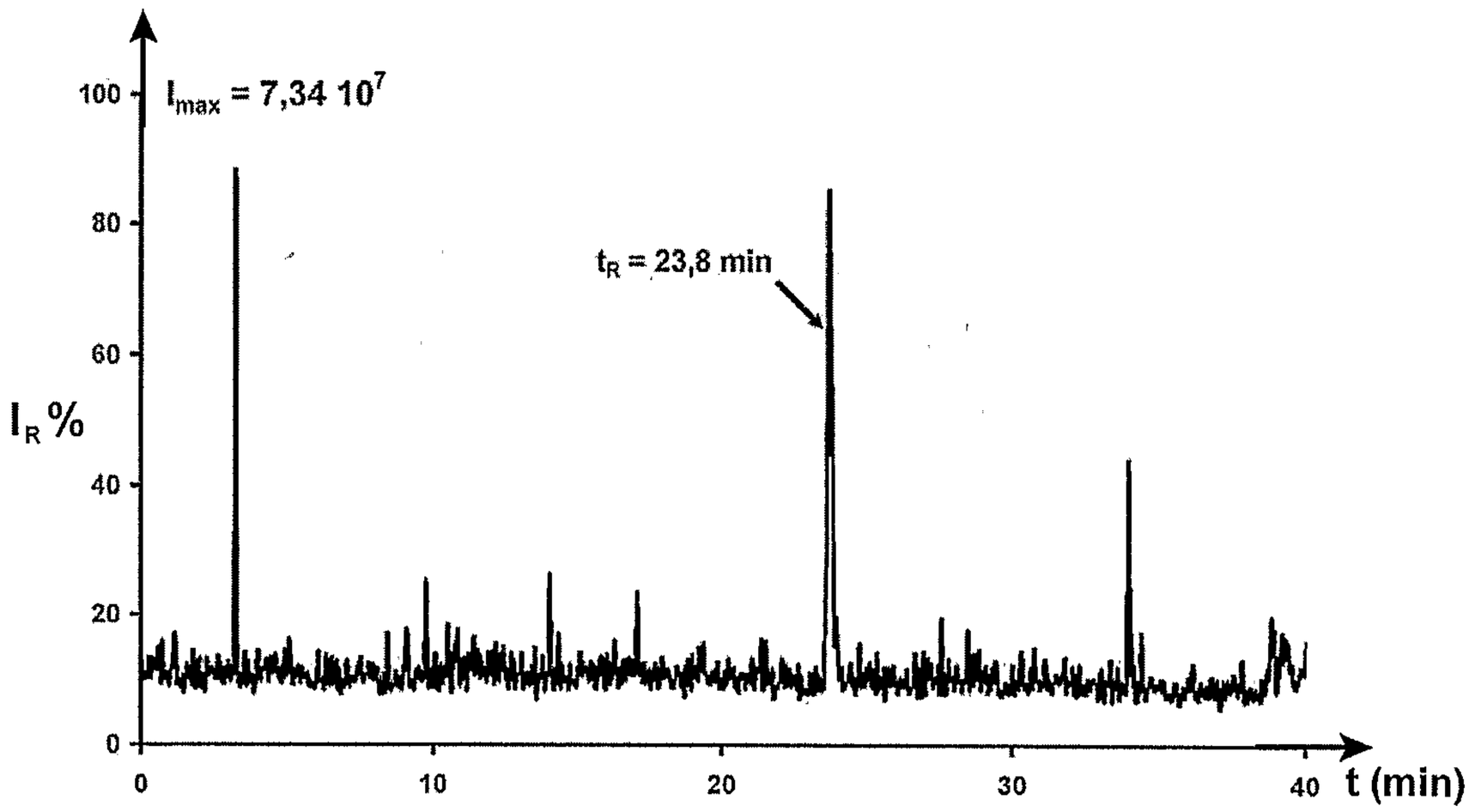

100
80
60
40
20
0
I_R %
I_{max} = 7,34 10^7
t_R = 23,8 min
0
10
20
30
40
t (min)

FIG. 15

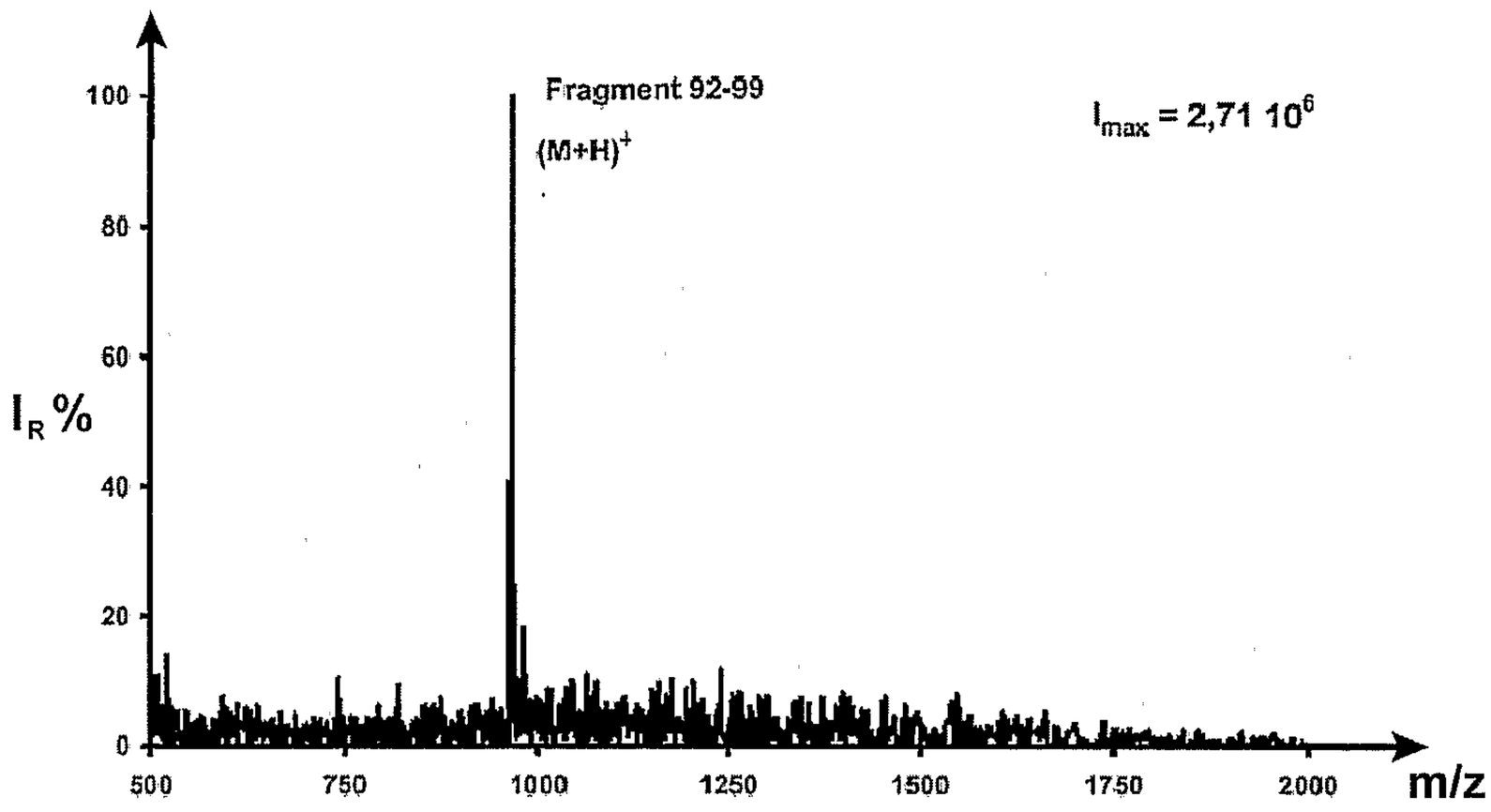
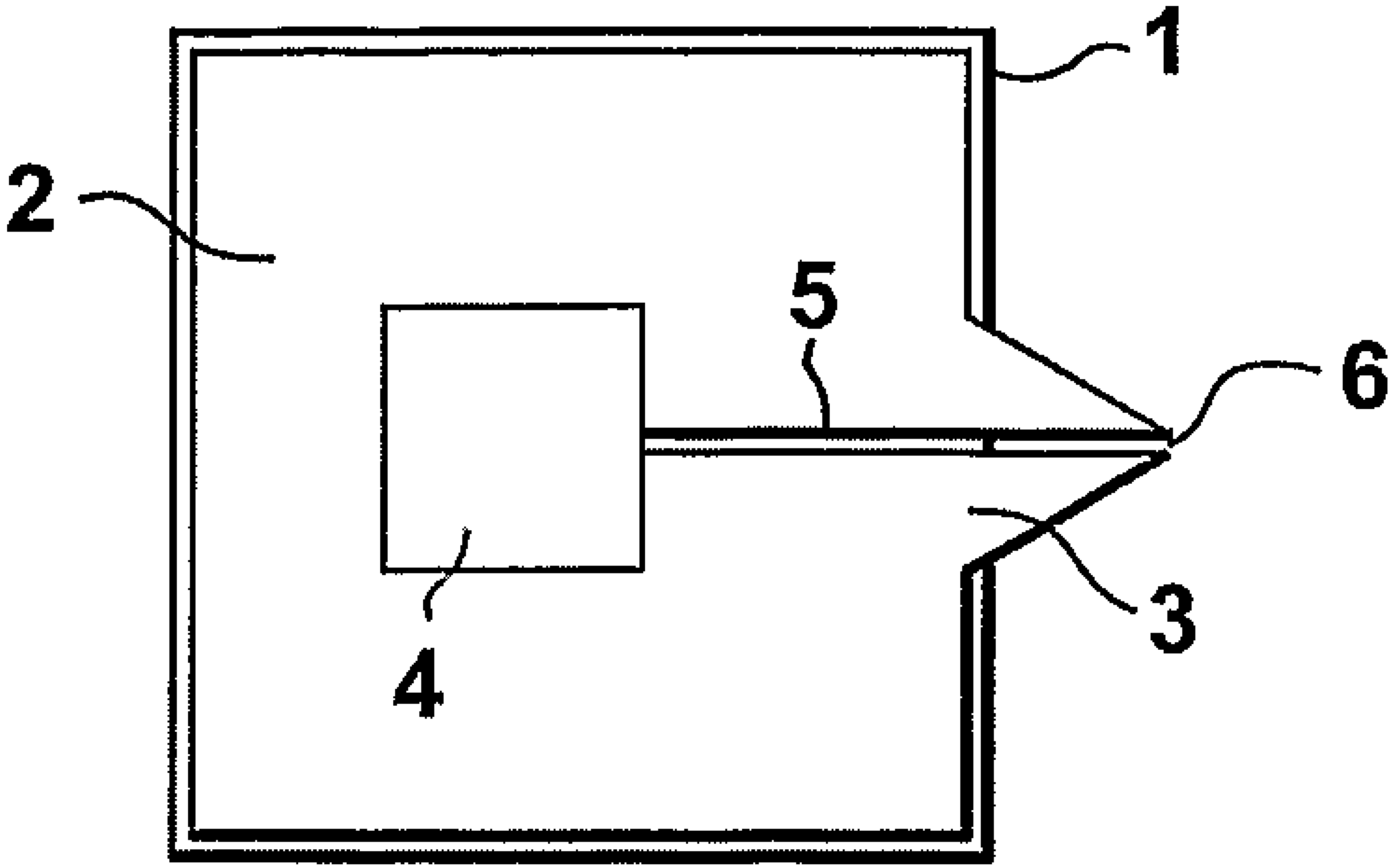

Fragment 92-99
(M+H)+
Imax = 2,71 10^6
IR %
100
80
60
40
20
0
500
750
1000
1250
1500
1750
2000
m/z

FIG. 16


1
2
5
6
4
3