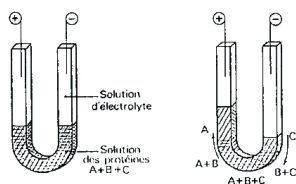

Electrophorèse capillaire : notions fondamentales

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

UN PEU D'HISTOIRE ...

1937



**Séparation de protéines
dans le sérum humain**



**The Nobel Prize in
Chemistry
1948**



Arne Wilhelm Kaurin Tiselius

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

d'après J.L. Veuthey, Univ. de Genève

Plan du cours

1. La migration en électrophorèse capillaire

- 1.1 Mobilité électrophorétique
- 1.2 Phénomène d'électroosmose

2. La séparation en électrophorèse capillaire

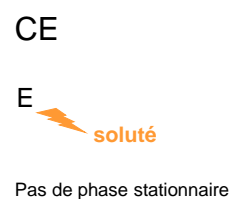
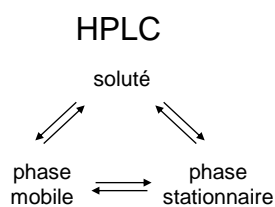
- 2.1 Efficacité
- 2.2 Résolution

3. L'amélioration de la sélectivité

4. L'analyse quantitative

- 4.1 Injection
- 4.2 Détection
- 4.3 Mesure des surfaces de pics

Une technique séparative



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

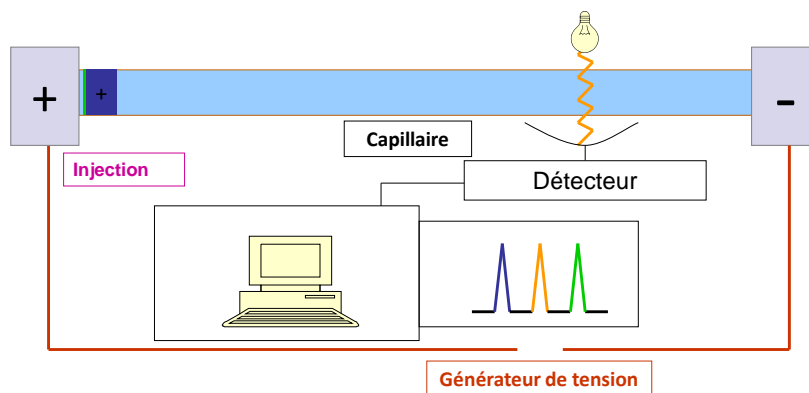
faibles volumes d'échantillon, d'électrolyte
 ➤ COÛT

EFFICACITE de séparation élevée

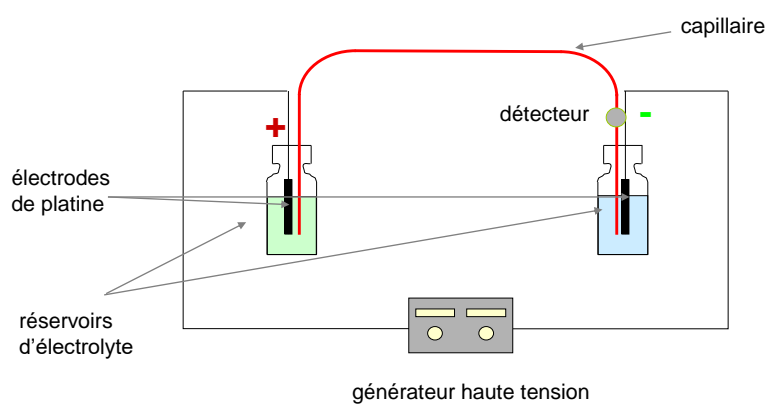
😞 faible SENSIBILITE DE DETECTION

Introduction électrophorèse capillaire

Principe

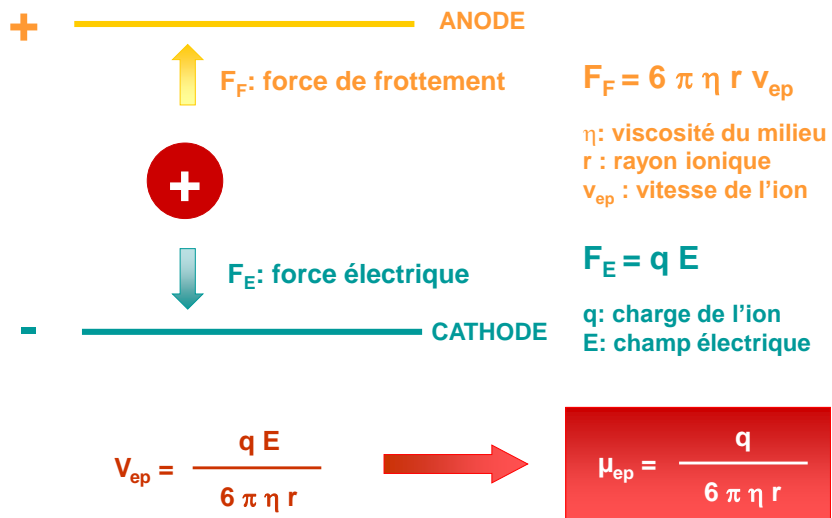


Dispositif expérimental

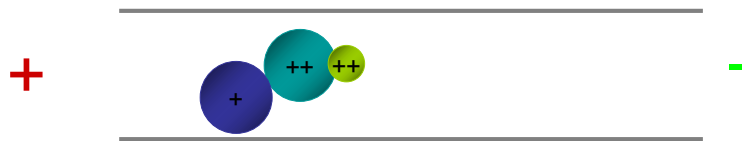


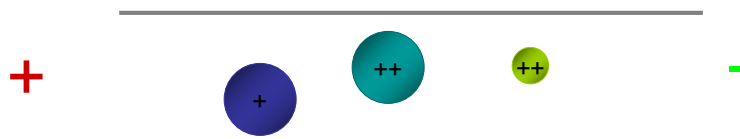
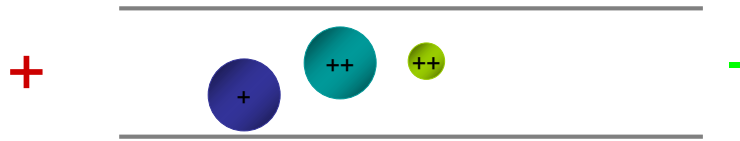
Capillaires conventionnels : silice
longueur : 20 - 100 cm
diamètre interne : 20 - 100 μm
Différences de potentiel : 10 - 40 kV

Electrophorèse





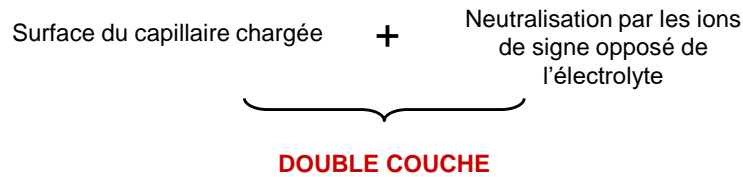




L'ELECTROPHORESE peut donc séparer :

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

Electrosmose



Origine du phénomène : orientation des molécules différente

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

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

Flux électrosmotique

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

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

ζ : potentiel zéta

ε : constante diélectrique du milieu

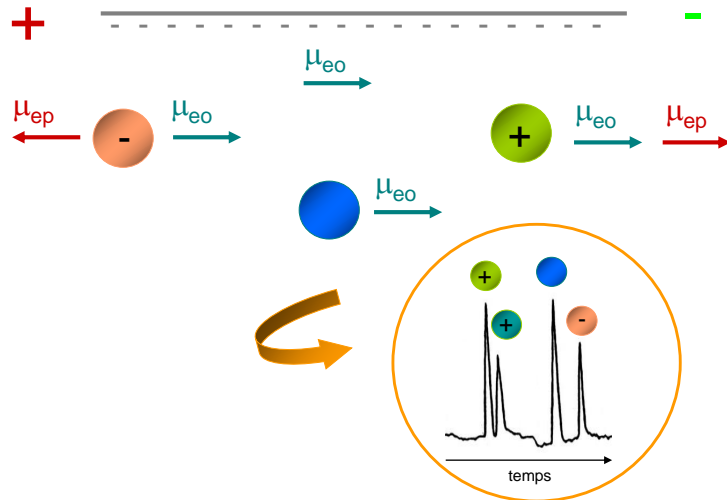
η : viscosité de la solution

Ordre de grandeur : de 0,1 à 1 cm.s⁻¹ pour des champs de l'ordre de 1500V.cm⁻¹.

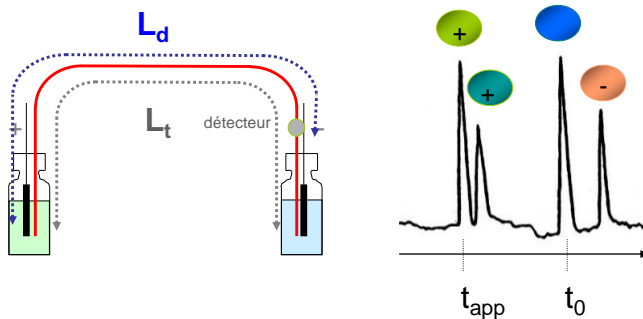
BILAN

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

➤ capillaire de silice:



Measurement of mobilities



Electroosmotic mobility

$$v_{eo} = \mu_{eo} \cdot E$$

$$\mu_{eo} = v_{eo} / E$$

$$\mu_{eo} = \frac{L_t * L_d}{t_0 * V}$$

Apparent mobility

$$v_{app} = \mu_{app} \cdot E$$

$$\mu_{app} = v_{app} / E$$

$$\mu_{app} = \frac{L_t * L_d}{t_{app} * V}$$

Electrophoretic mobility

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



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

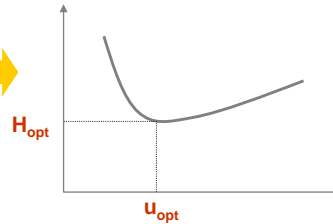
Efficacité de la séparation



Elargissement de bande selon le modèle de Van Deemter

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

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



Chemins préférentiels (A):



Diffusion moléculaire (B) :

fonction à la fois du soluté et de la phase mobile

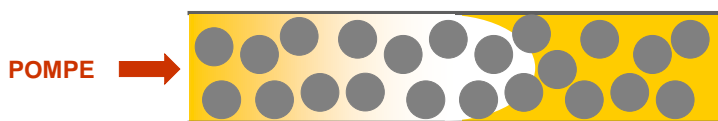
Transfert de masse (C) :

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

Profils d'écoulement

HPLC

FLUX HYDRODYNAMIQUE : profil parabolique



CE

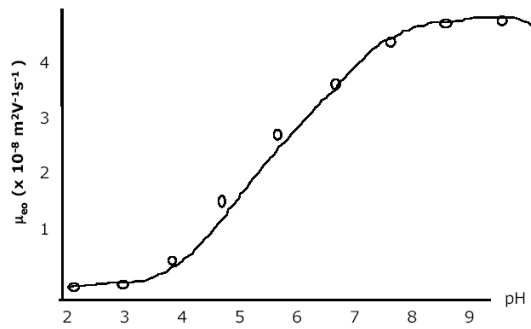
FLUX ELECTROSMOTIQUE : profil plat



EFFICACITE ELEVEE

Influence du pH sur la paroi du capillaire

Capillaire de silice
pI ~ 2



Comment jouer sur le paramètre μ_{eo}

Modification de la surface interne du capillaire

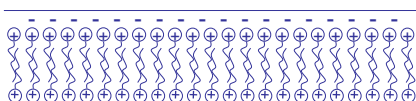
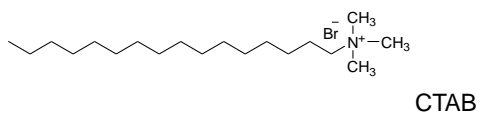
Greffages « dynamiques » :

- ▶ Présence d'additifs dans l'électrolyte

Greffages permanents

- ▶ Greffage chimique
 - 1- activation de la silice par un réactif de silanisation
 - 2- greffage par des groupements fonctionnels
- ▶ Immobilisation thermique

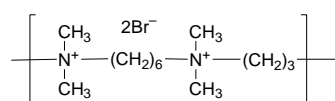
Amino « quenchers » : surfactants



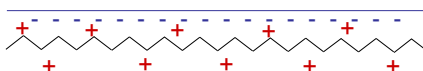
	C ₁₈	C ₁₆	C ₁₄	C ₁₂
concentration (M) pour $\zeta = 0$	8.10 ⁻⁶	7.10 ⁻⁵	5.10 ⁻⁴	2,5.10 ⁻³

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

Amino « quenchers » : polymères polycationiques



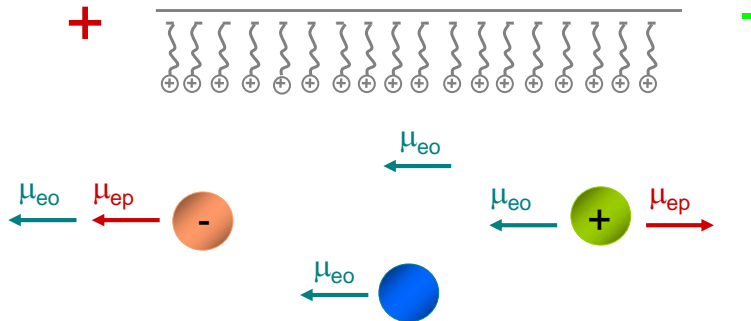
polybrene



BILAN

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

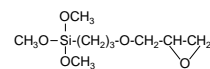
➤ surface chargée positivement



Greffages permanents

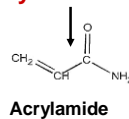
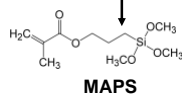
- Par liaison covalente

Silylation



γ -GPTMS

Silylation et polymérisation



- Par immobilisation thermique

Alcool polyvinylique (PVA)

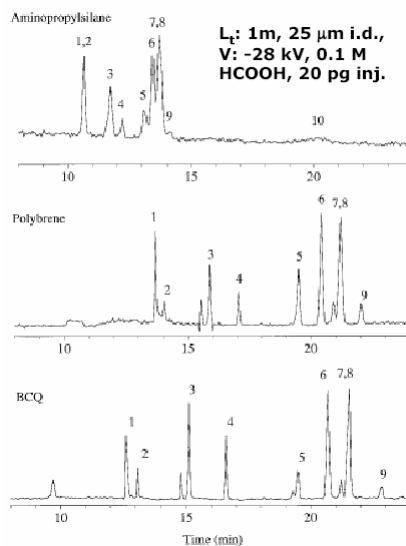
Hydroxypropylméthylcellulose (HPMC)

Insolubles dans les solutions aqueuses après chauffage

Modifier la surface, COMMENT ?

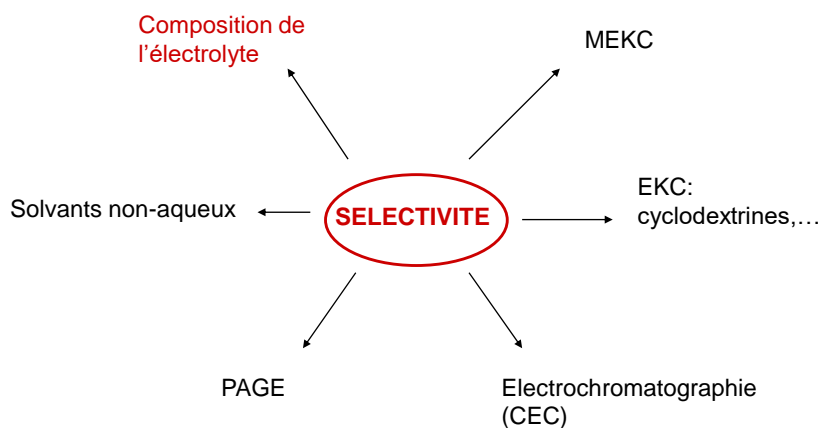
Table 1. Comparison of separation efficiencies for different capillary coatings^a

	Peptides	m/z	Theoretical plates		
			APS	Polybrene	BCQ
1	Leu-enkephalin	556	62 000	185 000	352 000
2	Glu-Fibrinogen	786	38 000	185 000	380 000
3	Substance P _{9,11}	548	76 000	249 000	505 000
4	Cholecystokinin _{10,28}	418	49 000	273 000	312 000
5	Substance P _{1,9}	553	29 000	355 000	355 000
6	Angiotensin I	433	31 000	230 000	237 000
7	Val ₄ 11 ₇ Angiotensin III	442	26 000	152 000	152 000
8	ACTH _{1,18}	482	60 000	111 000	256 000
9	pGlu ₇ -MBP _{1,14}	459	18 000	268 000	288 000



Rapid Commun. in Mass Spectrom., 1997, 11, 307

AMELIORER LA SELECTIVITE



Facteurs affectant la mobilité électroosmotique

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

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

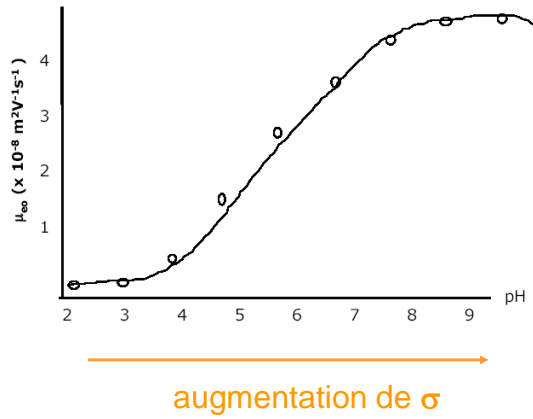
Facteurs affectant la mobilité électrophorétique

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

- ▶ **pH** : modification de l'intensité de la charge portée par les espèces
- ▶ **composition ionique de l'électrolyte** : influence sur les interactions entre les groupements ionisables des solutés et les ions de l'électrolyte (Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Cl⁻, PO₄³⁻, ...)
- ▶ **ajout de modificateur organique**
- ▶ **température**

Influence du pH sur la paroi du capillaire : μ_{eo}

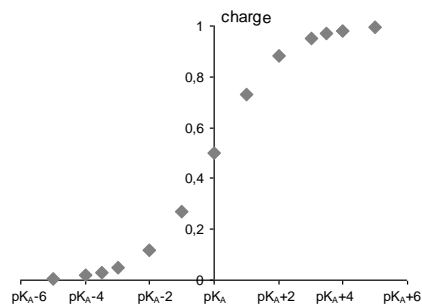
Capillaire de silice



Notions de pK_A



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



Tampons couramment utilisés en électrophorèse capillaire

Solution tampon	pK _A	
Phosphate	2.12 - 7.21 - 12.32	
Citrate	3.06 - 4.74 - 5.40	
Formate	3.75	
Succinate	4.19 - 5.57	
Acétate	4.74	
Borate	9.24	
Tampons zwitterioniques		
MES	6.15	} Conductivité faible
HEPES	7.55	
TRIS	8.30	

Influence de la force ionique

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

σ : densité de charge à la surface du capillaire

η : viscosité de la solution

δ : épaisseur de la double couche



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

Influence de la force ionique

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

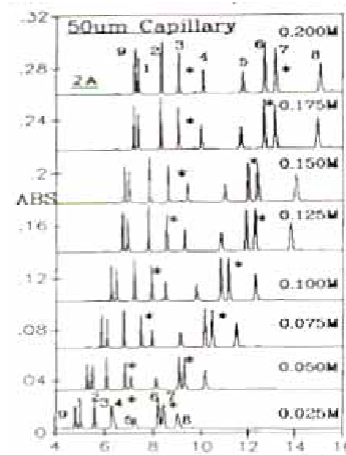
lorsqu'on augmente la concentration de l'électrolyte

➤ diminution de δ

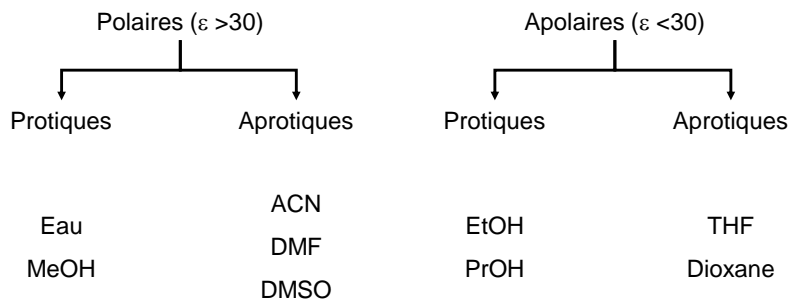
Tampon phosphate
(0.025-0.2M, pH 2.4),
V: 30 kV, Ld: 0.5 m.

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

Tech. Prot. Chem. II, 3-19 (1991).



Influence du modificateur organique



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

Influence du modificateur organique

► Influence sur la viscosité

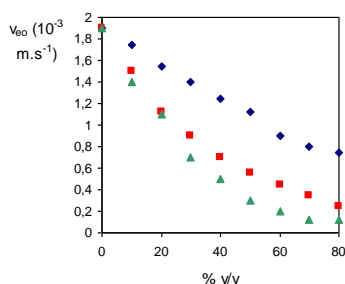
► Influence sur le pH

► Influence sur la solvation

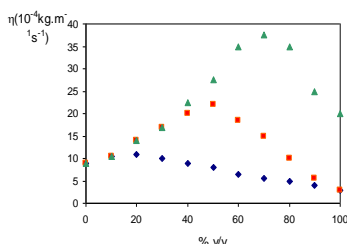
Solvant	Cations	Anions
Eau	++	++
Méthanol	+/-	++
Ethanol	-	++
Acétonitrile	--	--

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

Influence du modificateur organique



► Influence sur la viscosité



▲ DMSO ■ acétone ◆ ACN

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

► Influence sur le potentiel zéta

Solvants polaires (ex : eau): potentiels ζ qui peuvent atteindre 100mV.

Solvants apolaires (ex : heptane): pas de potentiel ζ , sauf en présence d'additifs.

Augmentation du pourcentage de modificateur organique

► diminution de ζ

ACN < acétone < MeOH < EtOH, PrOH < DMSO

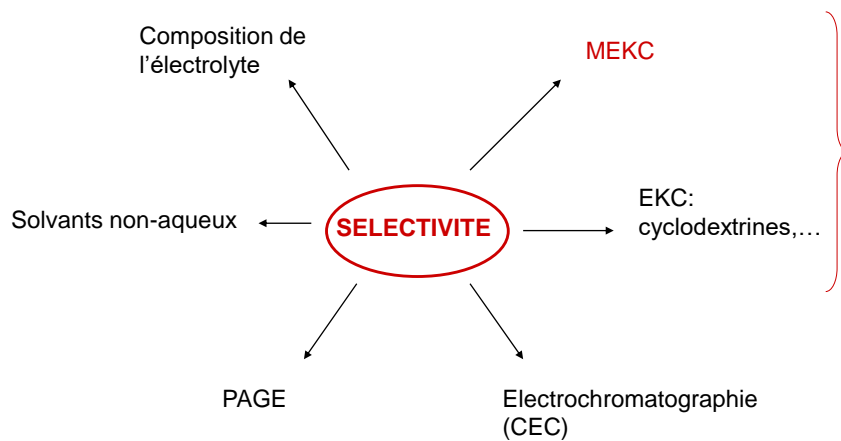
Règles générales :

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

- ✓ lorsqu'on diminue le pH
 - diminution de σ
- ✓ lorsqu'on augmente la concentration de l'électrolyte
 - diminution de δ
- ✓ lorsqu'on augmente le pourcentage de modificateur organique
 - diminution de ζ

ACN < acétone < MeOH < EtOH, PrOH < DMSO

AMELIORER LA SELECTIVITE



Chromatographie électrocinétique

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

↻ Partage phase mobile/ phase « stationnaire » du soluté

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

➡ Pas de développement instrumental différent

➡ **Séparation des molécules neutres**

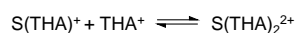
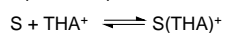
Séparation de molécules neutres

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

Stratégies :

1. Formation de complexes chargés

ex : composés faiblement hydrophiles en présence de tetrahexylammonium (THA⁺)



ex : catéchols en présence d'acide borique

2. Micelles ioniques

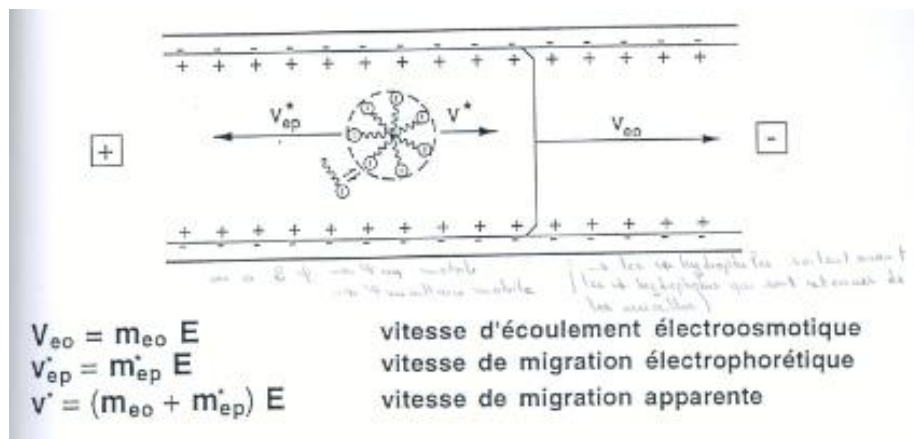
- le plus couramment utilisé

Chromatographie électrocinétique micellaire

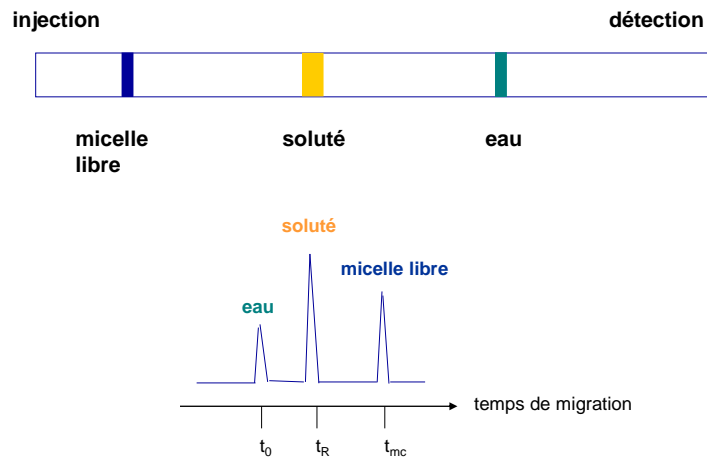
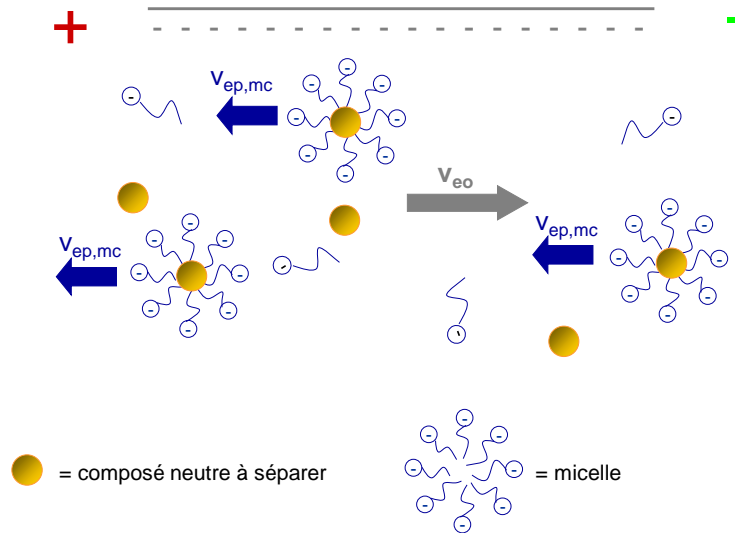
- assez solubles dans l'électrolyte pour former des micelles
- transparents à l'UV
- micelles homogènes
- micelles de faible viscosité

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

Chromatographie électrocinétique micellaire

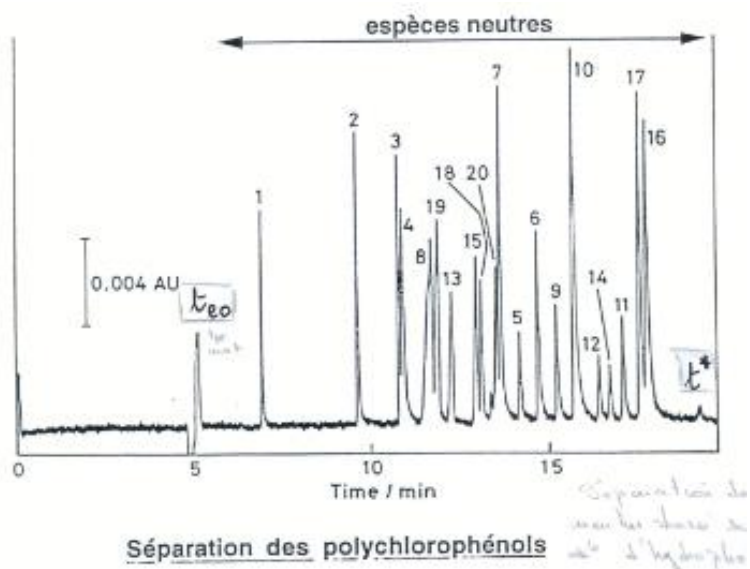


Chromatographie électrocinétique micellaire



⇒ $t_0 < t_R < t_{mc}$ > Fenêtre de détection

Chromatographie électrocinétique micellaire



Pseudo-phases utilisées en MEKC

Micelles anioniques

alkylsulfates, alkylsulfonates (C₁₀-C₁₆)
sels biliaires (cholate, taurocholate)
N-dodecanoyl-acide aminé

Micelles cationiques

alkyltriméthylammonium (C₁₀-C₁₆)

Micelles mixtes

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

Micelles polymérisées

poly(N-undécylényl-L-valinate)

Polymères ioniques

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

Microémulsions

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

Cyclodextrines ionisées

Dendrimères

polyamidoamines

Plan du cours

1. La migration en électrophorèse capillaire

- 1.1 Mobilité électrophorétique
- 1.2 Phénomène d'électroosmose

2. La séparation en électrophorèse capillaire

- 2.1 Efficacité
- 2.2 Résolution

3. L'amélioration de la sélectivité

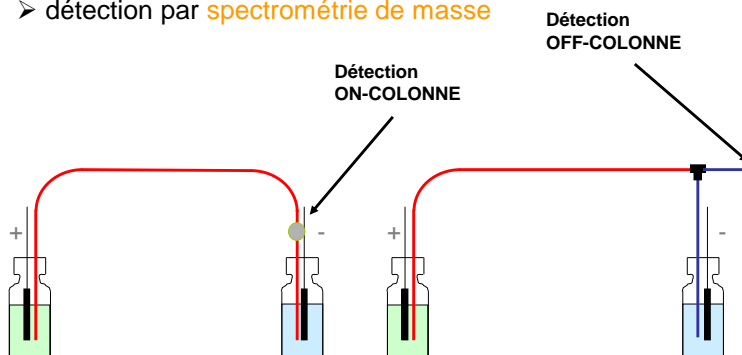
4. L'analyse quantitative

- 4.1 Injection
- 4.2 Détection
- 4.3 Mesure des surfaces de pics

DETECTION

LES PLUS COURANTS:

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



ON-COLONNE : MODE DIRECT

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

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

➤ Détection UV

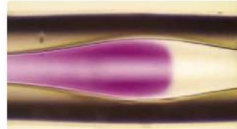
↘ nécessite l'utilisation de capillaires transparents jusqu'à 170nm si possible

équipe la plupart de appareils commerciaux

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

ex : phénol, LOD = 67 fmol

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



ON-COLONNE : MODE DIRECT

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

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

➤ Détection par fluorescence

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

généralement réalisée par dérivatisation préalable des solutés :

❖ dérivés dansyl/fluorescein-thiocarbamyl des acides aminés

❖ fluorescamine pour les acides aminés, les peptides

ex : α -chymotrypsinogène, LOD = 2 fmol

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

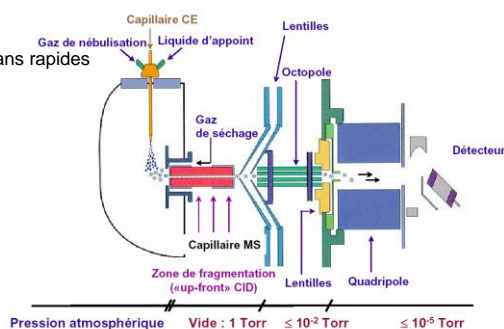
CE-LIF commercialisée avec un laser argon à 488nm

OFF-COLONNE

> Détection par spectrométrie de masse

📌 nécessité de concevoir une interface adaptée

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



Interface basée sur le mode ESI/MS

appliquée aux sels d'ammonium, amines, dipeptides

ex : pour les ions simples, LOD = 10 amol

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