

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

---

**Electrophorèse capillaire :  
notions fondamentales**

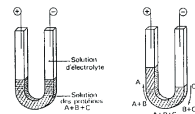
---


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





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"

**Séparation de protéines dans le sérum humain**

d'après J.L. Veuthey, Univ. de Genève

**... ET LA SUITE**

---

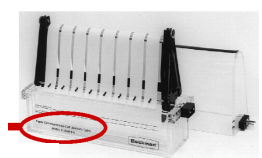
1939

1954

1967

1981

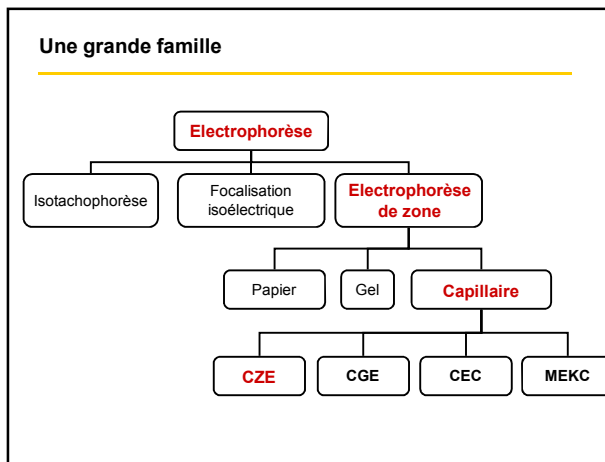
Séparation de protéines par électrophorèse sur papier



S. Hjerten : capillaires de 300 µm i.d.

J. Jorgenson : capillaires de 75 µm i.d.

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**

---

HPLC

soluté

↙ ↘

phase mobile ↔ phase stationnaire

CE

E → soluté

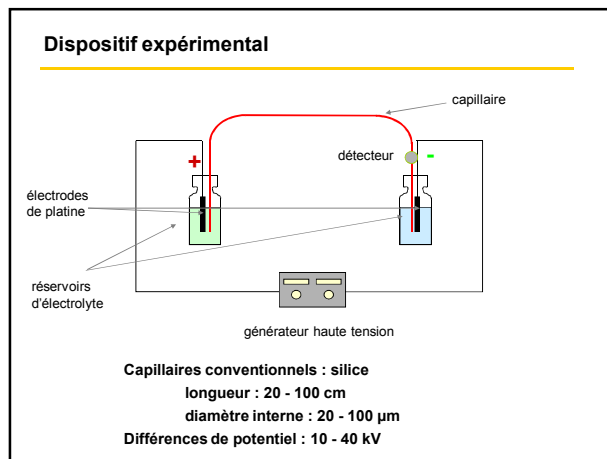
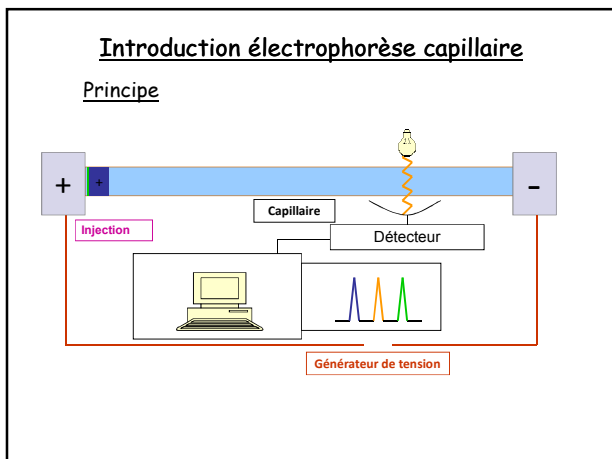
Pas de phase stationnaire

☺ 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



### Electrophorèse

+

↑  $F_f$ : force de frottement

↓  $F_E$ : force électrique

-

CATHODE

ANODE

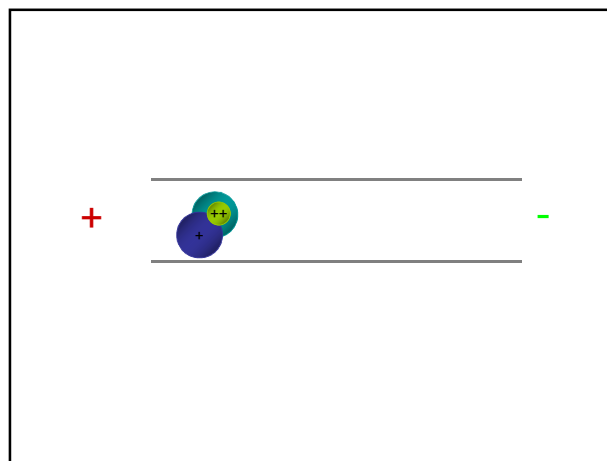
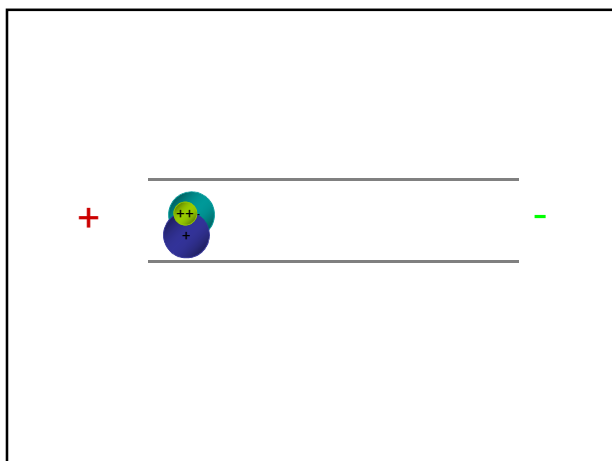
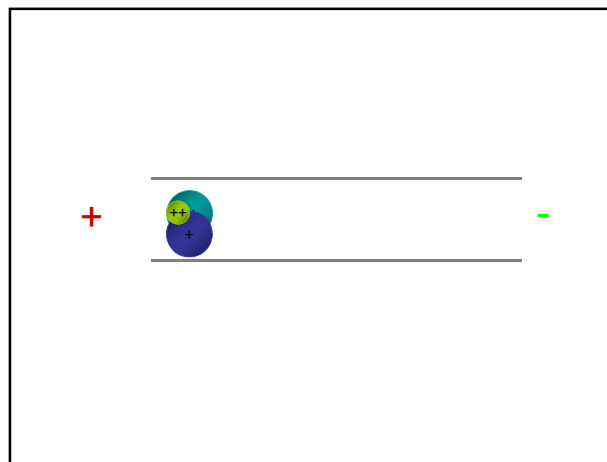
$$F_f = 6 \pi \eta r v_{ep}$$

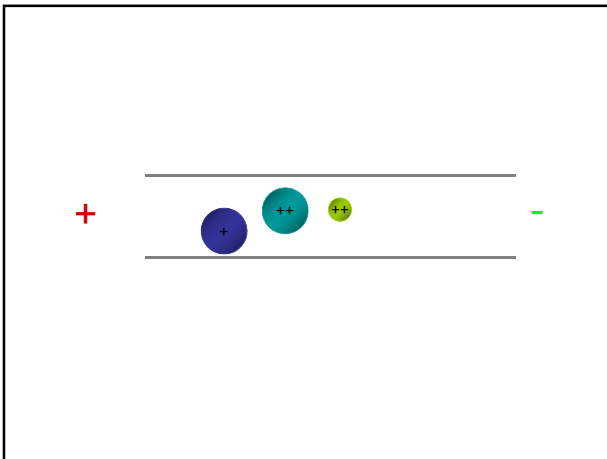
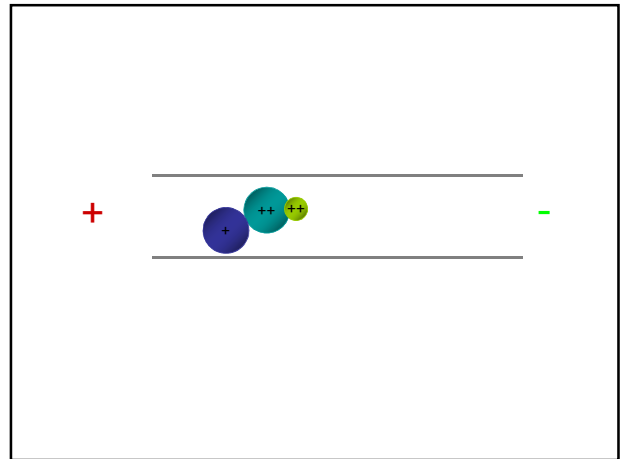
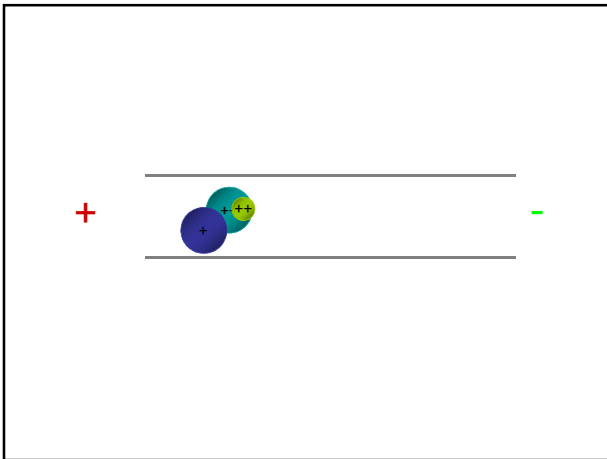
$\eta$ : viscosité du milieu  
 $r$ : rayon ionique  
 $v_{ep}$ : vitesse de l'ion

$$F_E = q E$$

$q$ : charge de l'ion  
 $E$ : champ électrique

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





**L'ELECTROPHORESE peut donc séparer :**

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

### Electrosmose

Surface du capillaire chargée + Neutralisation par les ions de signe opposé de l'électrolyte

**DOUBLE COUCHE**

Origine du phénomène : orientation des molécules différente

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

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

### DOUBLE COUCHE : le modèle de STERN

électrosmose

sein de la solution

couche diffuse

silanols de surface

potentiel  $\Psi_0$   $\Psi_s$   $\zeta$

distance  $1/x$   $\delta$

### Flux électroosmotique

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

$$V_{eo} = \frac{\epsilon \zeta E}{4 \pi \eta} \Rightarrow \mu_{eo} = \frac{\epsilon \zeta}{4 \pi \eta}$$

$\zeta$  : potentiel zéta  
 $\epsilon$  : constante diélectrique du milieu  
 $\eta$  : viscosité de la solution

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

### BILAN

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

➤ capillaire de silice:

### Mesure des mobilités

$t = L_d / v_{app} = L_d / (\mu_{app} \cdot E)$   
 $= L_d \cdot L_t / (\mu_{eo} + \mu_{ep}) \cdot V$

$t_0 = L_d / v_{eo} = L_d / (\mu_{eo} \cdot E)$   
 $= L_d \cdot L_t / \mu_{eo} \cdot V$

### Efficacité de la séparation

Elargissement de bande selon le modèle de Van Deemter s'exprime en termes de *hauteur équivalente à un plateau théorique (H)* :

$$H = A + B/u + C \cdot u$$

Chemins préférentiels (A):

Diffusion moléculaire (B): fonction à la fois du soluté et de la phase mobile

Transfert de masse (C): influencé par le coefficient de partage et donc la solubilité relative du soluté dans la phase stationnaire

### Profils d'écoulement

**HPLC**  
 FLUX HYDRODYNAMIQUE : profil parabolique

**CE**  
 FLUX ELECTROOSMOTIQUE : profil plat

EFFICACITE ELEVÉE

### Influence du pH sur la paroi du capillaire

Capillaire de silice  
 pI ~ 2

Comment jouer sur le paramètre  $\mu_{eo}$

### Modification de la surface interne du capillaire

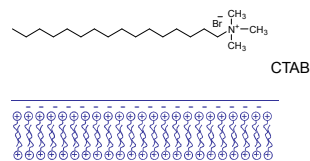
#### Greffages « dynamiques » :

- Présence d'additifs dans l'électrolyte

#### Greffages permanents

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

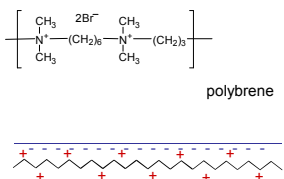
### Amino « quenchers » : surfactants



	C <sub>18</sub>	C <sub>16</sub>	C <sub>14</sub>	C <sub>12</sub>
concentration (M) pour ζ = 0	8.10 <sup>-6</sup>	7.10 <sup>-5</sup>	5.10 <sup>-4</sup>	2.5.10 <sup>-3</sup>

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

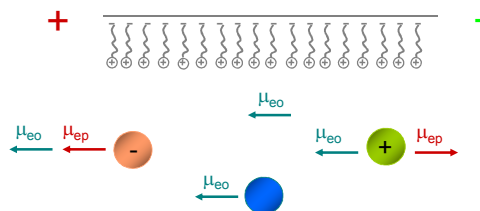
### Amino « quenchers » : polymères polycationiques



### BILAN

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

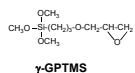
➤ surface chargée positivement



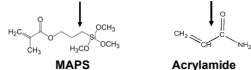
### Greffages permanents

- Par liaison covalente

#### Silylation



#### Silylation et polymérisation



- Par immobilisation thermique

Alcool polyvinylique (PVA)

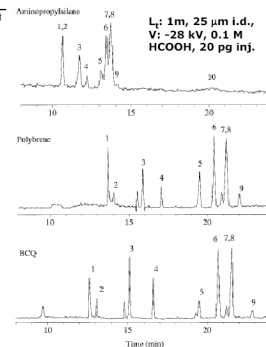
Hydroxypropylméthylcellulose (HPMC)

**Insolubles dans les solutions aqueuses après chauffage**

### Modifier la surface, COMMENT ?

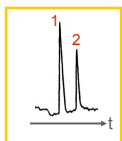
Table 1. Comparison of separation efficiencies for different capillary coatings\*

Peptides	m/z	Theoretical plates	
		APS	BCQ
1 Leu-enkephalin	556	62 000	185 000
2 Glu-Fibrinogen	786	38 000	185 000
3 Substance P <sub>1-28}</sub>	548	76 000	249 000
4 Cholecystokinin <sub>8-28}</sub>	418	49 000	273 000
5 Substance P <sub>1-7}</sub>	553	29 000	355 000
6 Angiotensin I	433	31 000	230 000
7 Val <sup>1</sup> Ily <sup>2</sup> Angiotensin III	442	26 000	152 000
8 ACTH <sub>1-39}</sub>	482	60 000	111 000
9 pGlu <sup>1-27</sup> MBF <sub>1-24}</sub>	459	18 000	268 000



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

### Facteurs de séparation



	HPLC	CE
déplacement	$k'$	$\mu_{ep}$
sélectivité	$\alpha = k'_1/k'_2$	$\alpha = \mu_{ep,1}/\mu_{ep,2}$
résolution	$R_s = \frac{1}{4} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \frac{k'}{k' + 1} \sqrt{N}$	$R_s = \frac{1}{4} \frac{\Delta\mu_{ep}}{\mu_{ep,moy} + \mu_{eo}} \sqrt{N}$

### Efficacité de la séparation

Variance de la zone migratrice (loi de diffusion d'Einstein):  $\sigma^2 = 2D_m t$   
 proportionnelle à la longueur parcourue et à la hauteur équivalente à un plateau théorique :  $\sigma^2 = H.L$

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

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

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

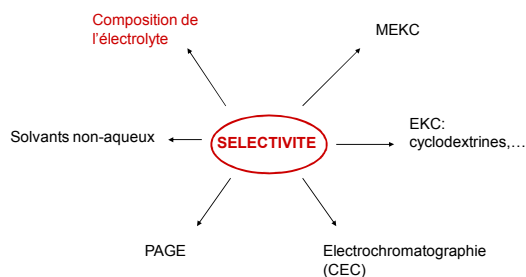
### Optimisation de la séparation

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

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

- ➔  $V$
- ➔  $\Delta\mu_{ep}$
- $\mu_{ep,moy} = -\mu_{eo}$

### AMELIORER LA SELECTIVITE



### Facteurs affectant la mobilité électroosmotique

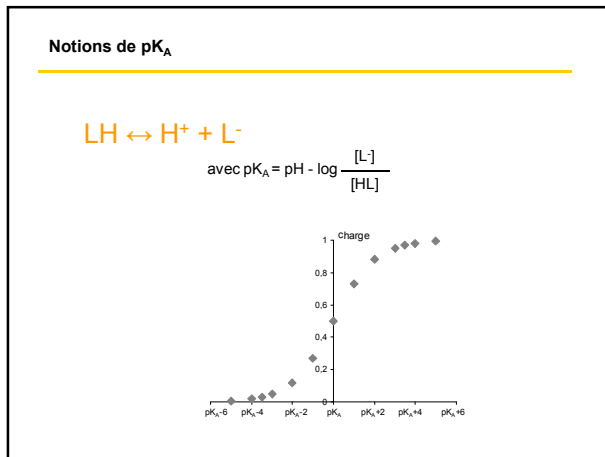
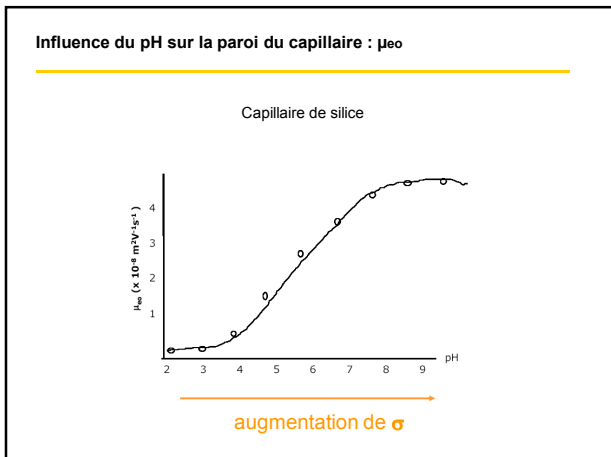
$$\mu_{eo} = \frac{\epsilon \zeta}{4 \pi \eta} \sim \frac{\sigma \delta}{\eta}$$

- 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 ( $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Cl^-$ ,  $PO_4^{3-}$ , ...)
- ajout de modificateur organique
- température



### Tamppons 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
<b>Tamppons zwitterioniques</b>	
MES	6.15
HEPES	7.55
TRIS	8.30

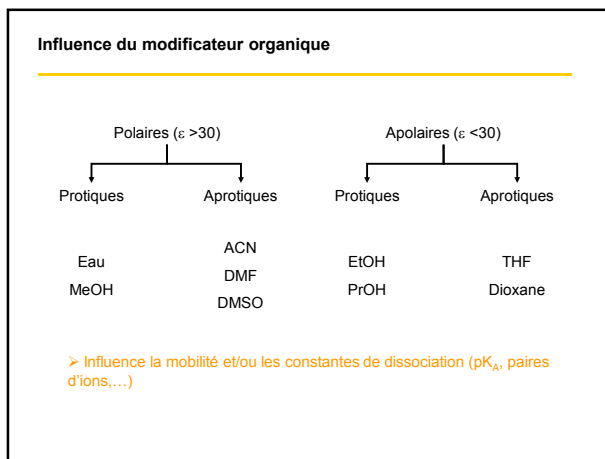
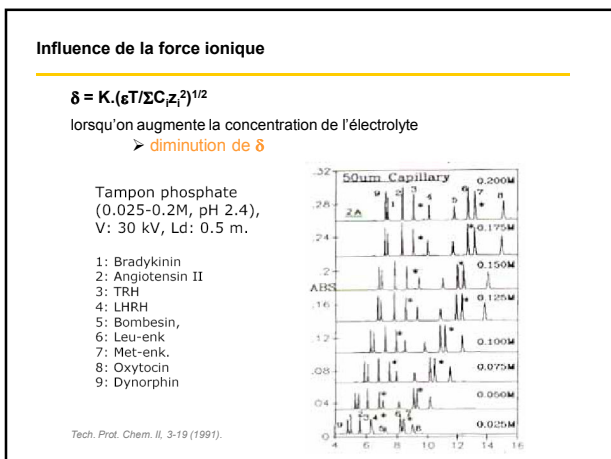
Conductivité faible

### Influence de la force ionique

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

$\sigma$  : densité de charge à la surface du capillaire  
 $\eta$  : viscosité de la solution  
 $\delta$  : épaisseur de la double couche

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



### Influence du modificateur organique

---

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

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

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

### Influence du modificateur organique

---

▶ Influence sur la viscosité  
 ▶ Influence sur le potentiel zéta

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

**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

---

### Intérêt des milieux non-aqueux

---

- ✓ faibles courants
- ❖ augmentation des diamètres des capillaires  
 > semi-préparative
- ❖ augmentation de l'efficacité ( $N/t \propto \epsilon/\eta^2$ )

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

- ✓ modification des sélectivités
- ✓ meilleure compatibilité avec la spectrométrie de masse
- ✓ augmentation des solubilités (ex: cyclodextrines)

### NACE

---

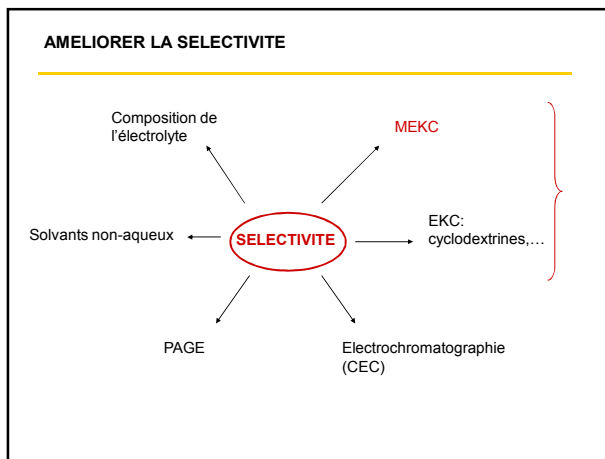
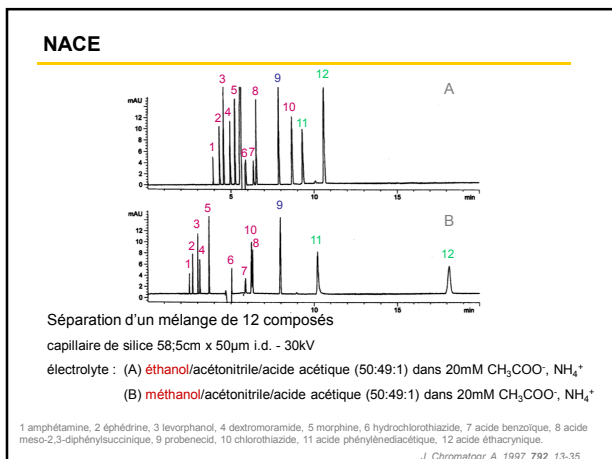
1 A (MM 135)  
 2 MA (149)  
 3 MDA (179)  
 4 MDMA (193)  
 5 MDEA (207)

Tris-phosphate 50 mM  
 Aqueous buffer pH 2.5  
 V = 30 kV  
 i = 103 μA

MeCN  
 25 mM ammonium formate  
 1 M formic acid  
 V = 30 kV  
 i = 50 μA

*Chromatographia, 2000, 52, 403-407*





### Chromatographie électrocinétique

= technique séparative qui allie des phénomènes de type :

- > électrosmose
- > 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 électrosmotique

Stratégies :

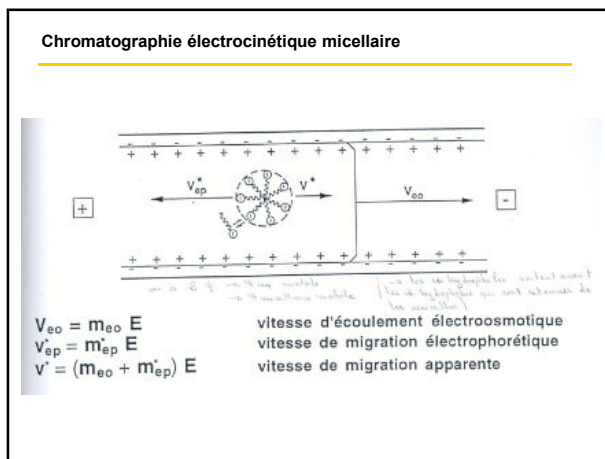
1. Formation de complexes chargés  
ex : composés faiblement hydrophiles en présence de tetrahexylammonium (THA<sup>+</sup>)  
 $S + THA^+ \rightleftharpoons S(THA)^+$   
 $S(THA)^+ + THA^+ \rightleftharpoons S(THA)_2^{2+}$   
ex : catéchols en présence d'acide borique

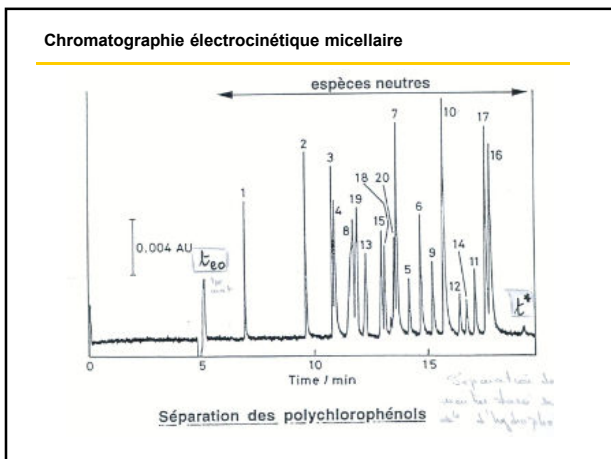
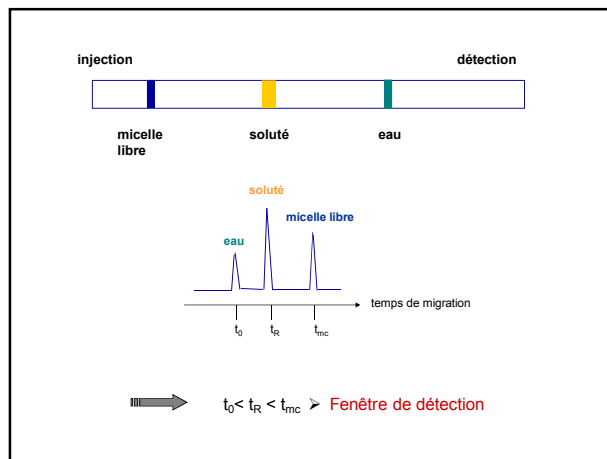
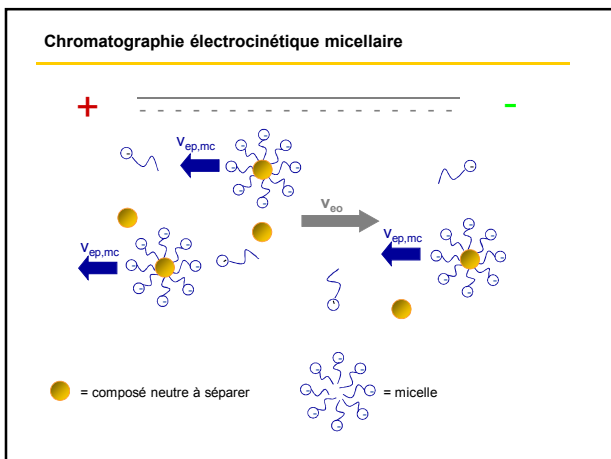
2. **Micelles ioniques**  
> le plus couramment utilisé

### Chromatographie électrocinétique micellaire

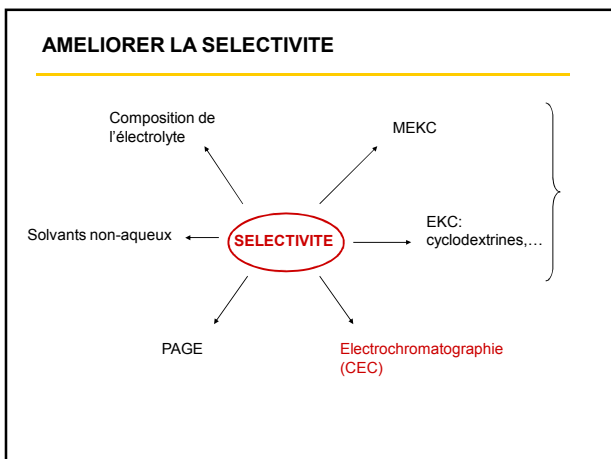
- > assez solubles dans l'électrolyte pour former des micelles
- > transparents à l'UV
- > micelles homogènes
- > micelles de faible viscosité

Surfactant	CMC(10 <sup>-3</sup> M) à 25°C dans l'eau
Sodium dodecylsulfate (SDS)	8.1
Sodium tetradecylsulfate (STS)	2.1 (50°C)
Sodium N-lauroyl-N-méthyltaurate (LMT)	8.7
Sodium cholate	13-15
Cetyltriméthylammonium bromide (CTAB)	0.92





- ### Pseudo-phases utilisées en MEKC
- |  |  |
|--|--|
| <p><b>Micelles anioniques</b><br/>alkylsulfates, alkylsulfonates (C<sub>10</sub>-C<sub>16</sub>)<br/>sels biliaires (cholate, taurocholate)<br/>N-dodecanoyl-acide aminé</p> | <p><b>Polymères ioniques</b><br/>copolymères butylacrylate-butylméthacrylate-acide méthacrylique<br/>copolymère butylméthacrylate-méthacryloyloxyéthyl-triméthylammonium</p> |
| <p><b>Micelles cationiques</b><br/>alkyltriméthylammonium (C<sub>10</sub>-C<sub>16</sub>)</p>  | <p><b>Microémulsions</b><br/>tampon aqueux (86,6-91,1%)-SDS (6-1,5 %)-1-butanol (6,6 %) heptane, hexane, cyclohexane ou diéthyler (0,8 %) (p/p)</p>                          |
| <p><b>Micelles mixtes</b><br/>octylglucoside - borate<br/>SDS - N-dodecanoyl-acide aminé<br/>SDS-Brij 35<br/>octyltriméthylammonium-dodécyltriméthylammonium</p>             | <p><b>Cyclodextrines ionisées</b></p>  |
| <p><b>Micelles polymérisées</b><br/>poly(N-undécylényl-L-valinate)</p>   | <p><b>Dendrimères</b><br/>polyamidoamines</p>  |



- ### L'électrochromatographie
- = technique séparative qui allie des phénomènes de type :
    - > électroosmose
    - > électrophorèse
    - > chromatographie
  - ☞ Partage phase mobile/ phase stationnaire du soluté
  - ☞ Mécanismes engendrés par la présence d'une phase stationnaire dans le capillaire
  - ➔ Pas de développement instrumental différent, mais modification du capillaire
  - ➔ **Séparation des molécules neutres**

**L'électrochromatographie**

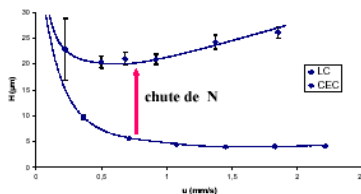
**INTERET**

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

**INCONVENIENTS**

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

**Comparaison LC/CEC**



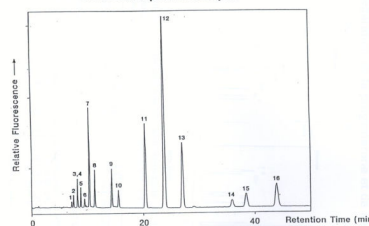
Monolite butyl. Phase mobile, tampon phosphate 5 mM pH 6,8 - acétonitrile (2/8). Composés, naphthalène.

**Comparaison HPLC/ CE :**

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

**L'électrochromatographie**

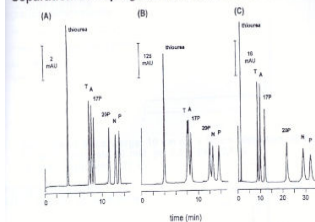
**ELECTROCHROMATOGRAPHIE**  
colonne capillaire remplie



Colonne : silice vierge, 75  $\mu m$  d.i. x 33 cm (partie remplie)  
Phase stationnaire : silice C18, 3  $\mu m$ . Phase mobile : ACN / NaBO<sub>2</sub> 4 mM (80 : 20) (vv)  
Tension appliquée : 15 kV. Détection : fluorescence laser, 257 / 400 nm. Injection électrocinétique : 5 kV, 5 s. Identification : 1 : naphthalène ; 2 : acénaphthylène ; 3 : acénaphthène ; 4 : fluorène ; 5 : phénanthrène ; 6 : anthracène ; 7 : fluoranthène ; 8 : pyrène ; 9 : benz[*a*]anthracène ; 10 : chrysène ; 11 : benzo[*b*]fluoranthène ; 12 : benzo[*k*]fluoranthène ; 13 : benzo[*a*]pyrène ; 14 : dibenz[*a,h*]anthracène ; 15 : benzo[*ghi*]péryène ; 16 : indéno[1,2,3-*cd*]pyrène  
C. Yan et al., 1995

**Comparaison HPLC et CEC**

**Séparation de la progestérone et de ses métabolites**

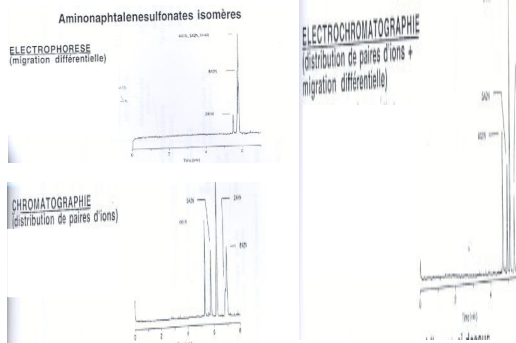


Identification : testostérone (T), androstenedione (A), 17 $\alpha$ -hydroxy-progesterone (17P), 20 $\alpha$ -hydroxyprogesterone (20P), noréthindrone (N), progestérone (P)

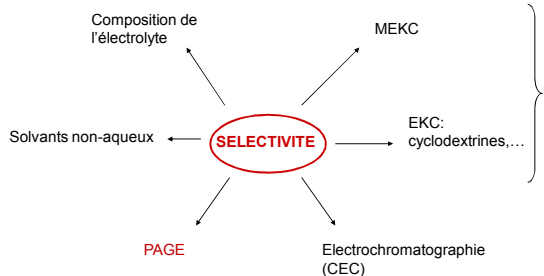
	CEC (A)	LC (B)	LC (C)
Colonne	6,1 mm d.i. x 20 cm (total, 35 cm)	4,6 mm d.i. x 20 cm	
Phase stationnaire	Hypersil ODS 3 $\mu m$	Hypersil ODS 3 $\mu m$	
Phase mobile	ACN/MeOH/Trie-HCl 20 mM, pH 8 (37,5:37,5:25)	ACN/MeOH/Trie-HCl 20 mM, pH 8 (33,3:33,3:33,3)	ACN/MeOH/Trie-HCl 20 mM, pH 8 (30:30:30)
Vitesse linéaire	0,83 mm.s <sup>-1</sup>	0,83 mm.s <sup>-1</sup>	2,9 mm.s <sup>-1</sup>
Débit	0,6 mL.min <sup>-1</sup>	0,6 mL.min <sup>-1</sup>	2,1 mL.min <sup>-1</sup>
Volume injecté	25 $\mu$ L (5 s sous 15 kV)	20 $\mu$ L	20 $\mu$ L
Echantillon	20 $\mu$ g.mL <sup>-1</sup> dans la phase mobile		
Détecteur	240 nm, 0,02 UA	240 nm, 1,28 UA	240 nm, 0,16 UA

D. A. Shead et coll., 1998.

**Séparation en CEC de composés anioniques de mobilités voisines**



**AMELIORER LA SELECTIVITE**



**Electrophorèse en gel de polyacrylamide**

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

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

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

Pas de développement instrumental différent

➔ Séparation par exclusion stérique

**Electrophorèse en gel de polyacrylamide**



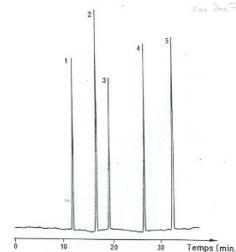
Ajout d'un polymère dans l'électrolyte pour créer un tamis dont on peut contrôler les mailles

Séparation des composés qui ont une répartition uniforme de la charge

Séparation suivant la masse ➔ gain en sélectivité

**Electrophorèse en gel de polyacrylamide**

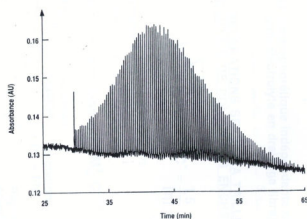
SEPARATION DE LA MYOGLOBINE ET DE SES FRAGMENTS



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

**Electrophorèse en gel de polyacrylamide**

SEPARATION DE POLYNUCLEOTIDES.



Capillaire : µPAGE-S, 75 µm d.l. x 75 cm (détection, 50 cm), rempli de gel de polyacrylamide, 5% T, 5% C  
 Electrolyte : tampon Tris-borate 100 mM, pH 8,3 + urée 7 M.  
 Tension appliquée : 18 kV. Détection UV 260 nm  
 Echantillon : acide polydésoxyribrique pd(A), 20-150 bases.

(K. A. Turner, 1991)

**Caractéristique des gels permanents et non permanents**

CAPILLAIRES REMPLIS DE GELS PERMANENTS DE POLYACRYLAMIDES RETICULES

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

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

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

## Plan du cours

1. La migration en électrophorèse capillaire
  - 1.1 Mobilité électrophorétique
  - 1.2 Phénomène d'électroosmose
2. La séparation en électrophorèse capillaire
  - 2.1 Efficacité
  - 2.2 Résolution
3. L'amélioration de la sélectivité
4. L'analyse quantitative
  - 4.1 Injection
  - 4.2 Détection
  - 4.3 Mesure des surfaces de pics

## INJECTION

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

- > injection hydrodynamique
- > injection électrocinétique

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

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

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

## Injection hydrodynamique

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

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

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

## Injection électrocinétique

ou injection par électromigration

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

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

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

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

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

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

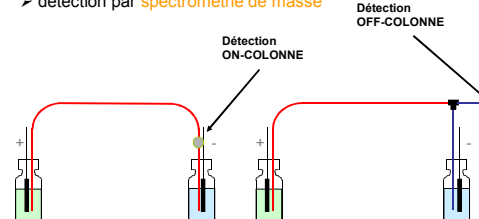
## Plan du cours

1. La migration en électrophorèse capillaire
  - 1.1 Mobilité électrophorétique
  - 1.2 Phénomène d'électroosmose
2. La séparation en électrophorèse capillaire
  - 2.1 Efficacité
  - 2.2 Résolution
3. L'amélioration de la sélectivité
4. L'analyse quantitative
  - 4.1 Injection
  - 4.2 Détection
  - 4.3 Mesure des surfaces de pics

## 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 : ~ 10<sup>-6</sup> mol.L<sup>-1</sup>

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 dérivation 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<sup>-3</sup> - 10<sup>-7</sup> M

CE-LIF commercialisée avec un laser argon à 488nm

### OFF-COLONNE

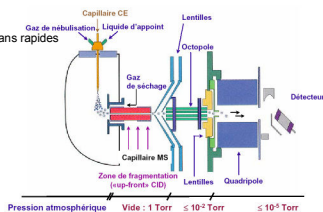
#### > Détection par spectrométrie de masse

nécessite de concevoir une interface adaptée

assurer le maintien du champ électrique

diminuer les effets d'aspiration

utiliser des analyseurs permettant des scans rapides



Interface basée sur le mode ESI/MS

appliquée aux sels d'ammonium, amines, dipeptides

ex : pour les ions simples, LOD = 10 amol

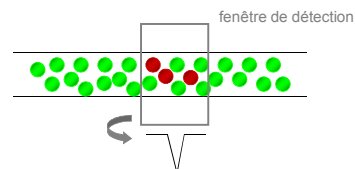
Méthode	LDD (mol)	LDD (M)	Avantages/ inconvénients
UV-Vis	10 <sup>-13</sup> - 10 <sup>-16</sup>	10 <sup>-5</sup> - 10 <sup>-8</sup>	Universel Possibilité d'information spectrale
Fluorescence	10 <sup>-15</sup> - 10 <sup>-17</sup>	10 <sup>-7</sup> - 10 <sup>-9</sup>	Sensible Requiert souvent une dérivation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

### Optimisation de la sensibilité

- Détection par absorbance indirecte
- Préconcentration en ligne avant séparation
- Isotachophorèse (ITP)

### ON-COLONNE : MODE INDIRECT

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



Co-ion :

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

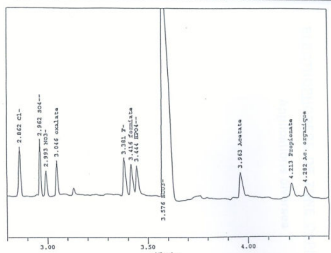
**Mobilité:** voisine de celle des analytes

**Absorbance:** forte

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

**ON-COLONNE : MODE INDIRECT**

**ANALYSE DE 14 ACES D'ANIONS ORGANIQUES ET INORGANIQUES**



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

Capillaire en silice vierge, 75 µm x 60 cm (détection, 52 cm)  
 Electrolyte: chromate de sodium 10 mM, modificateur de flux, pH 8  
 Tension appliquée: - 20 kV. Détection UV indirecte, 254 nm  
 Injection électrocinétique (5 kV, 48 s)  
 Echantillon additionné d'octanesulfonate 75 µM

G. Bondoux, 1995.

**Préconcentration en ligne avant séparation électrocinétique**

**ESPECES NEUTRES HYDROPHOBES**

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

**Préconcentration en ligne avant séparation électrocinétique**

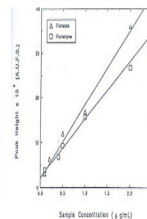
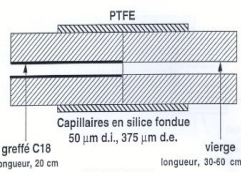
**ESPECES IONIQUES**

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

**Préconcentration en ligne : extraction phase solide**

**PAROI INTERACTIVE HYDROPHOBE**

Application aux herbicides



→ facteur de préconcentration : 15-35

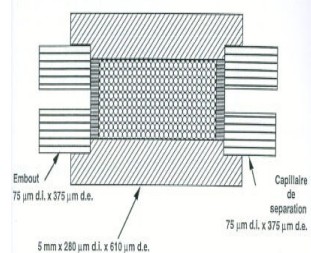
Z. El Rassi et coll., 1992.

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

**Préconcentration en ligne : extraction phase solide**

**EXTRACTION EN PHASE SOLIDE APOLAIRE**

Application aux protéines



**PROTOCOLE**

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

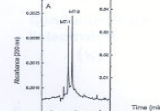
**Préconcentration en ligne : extraction phase solide, application**

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

Extraction en phase solide apolaire en ligne

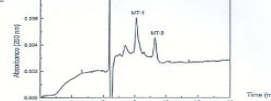
**En absence de prétraitement**

Capillaire de séparation, 75 µm d.l. x 57 cm (détection, 50 cm)  
 Electrolyte : tampon borate 100 mM, pH 9,4  
 V = 30 kV. Détection UV, 200 nm  
 Injection hydrodynamique  
 Echantillon 100 µg / mL



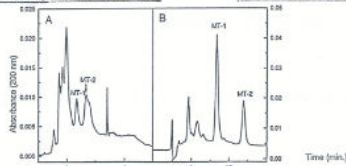
**Avec prétraitement**

Echantillon 1 µg / mL  
 Injection hydrodynamique, 27 µL  
 Elution : hydrodynamique, 33 % acétonitrile dans tampon phosphate 15 mM, pH 2,5.  
 Séparation : tampon phosphate 30 mM, pH 7



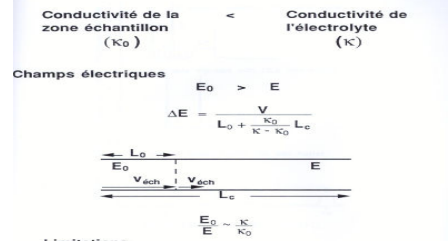
Préconcentration en ligne : extraction phase solide, application

Extrait de foie de mouton  
en absence de prétraitement avec prétraitement



Injection hydrodynamique, 5,4 µL ; élution et séparation : comme ci-dessus  
J. H. Beattie, 1995.

Préconcentration en ligne : amplification du champ électrique



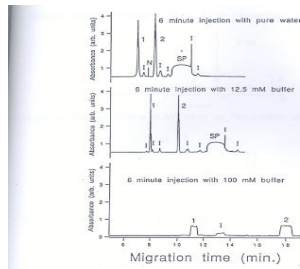
Limitations

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

Conditions optimales (injection hydrodynamique)

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

Préconcentration en ligne : amplification du champ électrique



Capillaire : 75 µm d.i. x 100 cm (détection, 85 cm)  
Électrolyte : tampon MES-His 100 mM, pH 6,1  
 $V_0 = 30$  kV, Détection UV, 285 nm  
Injection hydrodynamique par gravité ( $\Delta h = 15$  cm), volume = 100 nL  
Échantillon : 1 : PTH-Arg  $3,6 \cdot 10^{-5}$  M ; 2 : PTH-His  $3,6 \cdot 10^{-5}$  M ;  
1 : impuretés ; SP : solvant échantillon

R.-L. Chien et coll., 1991

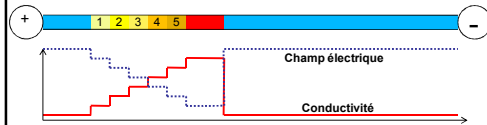
L'Isotachophorèse (ITP)

■ Intégration d'une phase transitoire d'isotachophorèse (tITP)

➤ Préconcentration des analytes dans un gradient de conductivité



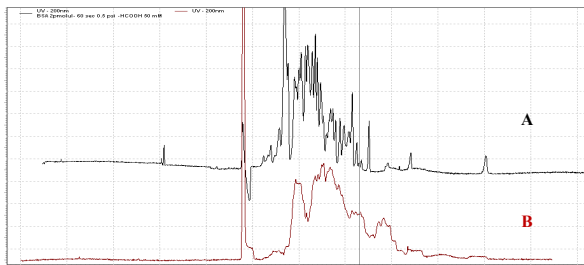
- ✓ L'électrolyte support est un électrolyte terminal (HCOOH)
- ✓ L'échantillon contient un ion meneur ( $\text{NH}_4^+$ )



✓ Formation transitoire d'un gradient de conductivité

- ↳ Stabiliser les zones d'analytes
- ↳ Injection de larges zones d'échantillons

L'Isotachophorèse (ITP)

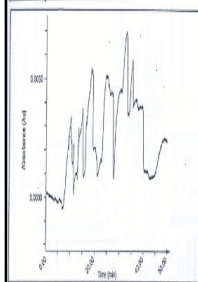


Capillaire silice fondue 60 cm x 75 µm d.i. (10 cm au détecteur) avec greffage dynamique HPC; Voltage : -25 kV ;  
Température : 25°C ; Détection UV à 200 nm ; Electrolyte : acide formique 50 mM, pH 2,7 ; Échantillon : digeste de BSA 20 pmol/µL

- A** : Échantillon avec plug de meneur, Volume d'injection 10% du capillaire
- B** : Échantillon sans plug de meneur, Volume d'injection 10% du capillaire

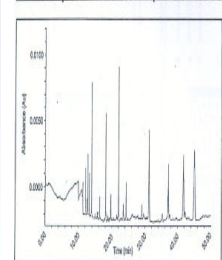
L'Isotachophorèse (ITP)

Electrophorèse de zone



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

Isotachophorèse - électrophorèse de zone



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

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

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

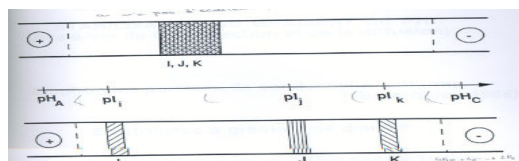
C. Schwer, 1993.



## Plan du cours

1. La migration en électrophorèse capillaire
  - 1.1 Mobilité électrophorétique
  - 1.2 Phénomène d'électroosmose
2. La séparation en électrophorèse capillaire
  - 2.1 Efficacité
  - 2.2 Résolution
3. L'amélioration de la sélectivité
4. L'analyse quantitative
  - 4.1 Injection
  - 4.2 Détection
  - 4.3 Mesure des surfaces de pics
4. La Focalisation isoélectrique (CIEF)

## CIEF



### CARACTÉRISTIQUES

#### Séparations d'ampholytes

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

Trois électrolytes différents

Vitesses de migration décroissantes

Existence d'un état stationnaire

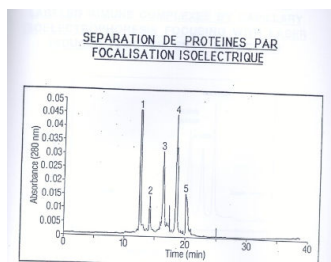
Effet de concentration, fronts de séparation étroits

Limitations : instabilité du gradient de pH

convection

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

## CIEF



Capillaire greffé polyacrylamide, 75  $\mu\text{m}$  d.i. x 57 cm (détection, 50 cm).  
 Injection du mélange dans une solution d'ampholyte LKB, pH 3,5 - 10, 3 à 4 %.  
 Focalisation: V = 25 kV / 20 min  
 anolyte:  $\text{H}_3\text{PO}_4$  150 mM; catholyte: NaOH 50 mM.  
 Mobilisation: anolyte identique; catholyte: NaCl 30 mM, NaOH 20 mM.  
 Identification: (1) myoglobine (coeur de cheval),  $pI = 7,2$   
 (2) myoglobine (coeur de cheval), forme désamidée,  $pI = 6,8$   
 (3) anhydrase carbonique B, érythrocyte humaine,  $pI = 6,6$   
 (4) anhydrase carbonique B, érythrocyte bovine,  $pI = 5,9$   
 (5)  $\beta$ -lactoglobuline A,  $pI = 5,1$