

Université de Strasbourg
(U D S)

Formation continu

ELECTROPHORESE CAPILLAIRE

TRAVAUX DIRIGES

I Epreuve de Notion d'échelle dans les méthodes de séparation
Master 2 Sciences Analytiques
(M. François)
(1 heure)

Remarque : Les documents de cours et la calculatrice sont autorisés lors de cette épreuve.

SEPARATION D'ACIDES CARBOXYLIQUES AVEC UN CAPILLAIRE EN SILICE
VIERGE

On propose ici l'étude de la séparation électrocinétique du mélange des 8 composés suivants :

Acides	Pk _a
féruque	4,52
acétylsalicylique	3,48
cinnamique	4,44
phénylacétique	4,40
benzoïque	4,20
salicylique	3,11
méthacrylique	4,48
acrylique	4,28

Tableau 1 : liste des acides carboxyliques

Conditions opératoires générales :

Capillaire en silice vierge, 50 µm d.i. x 35 cm (cellule de détection à 26,5 cm)

Electrolyte support : tampon bicine 50 mM pH 8,35

Température : 20 °C

Tension appliquée : V = + 30 kV

Détection : absorbance UV à 200 nm

Echantillon : mélange des 8 acides carboxyliques chacun à 0,1 mM (en tampon bicine 50 mM).

L'ordre de sortie des composés correspond à celui donné dans le tableau 1

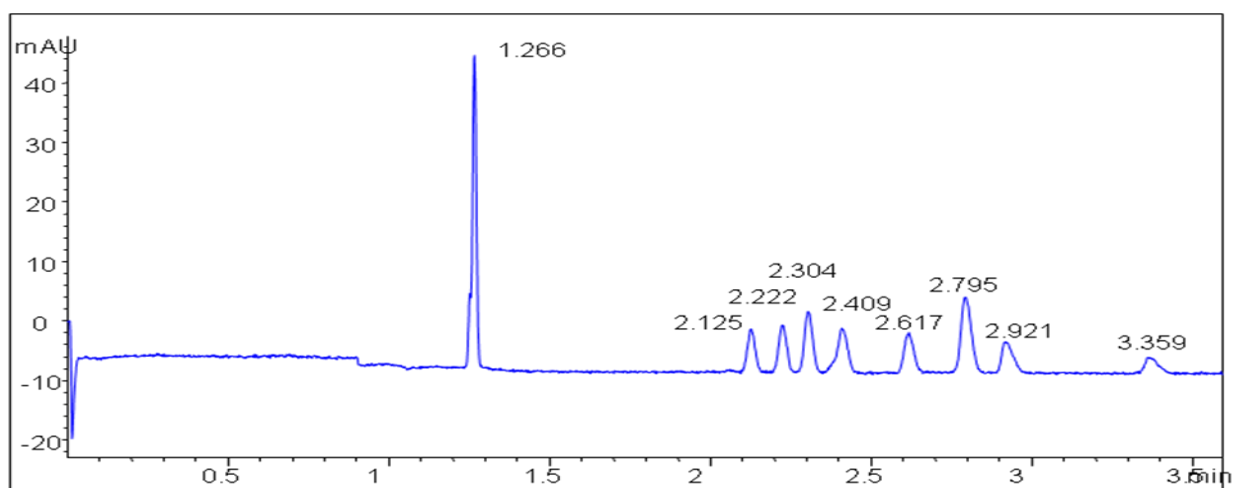


Fig 1 : Conditions générales, injection hydrodynamique 30mbar, 3s

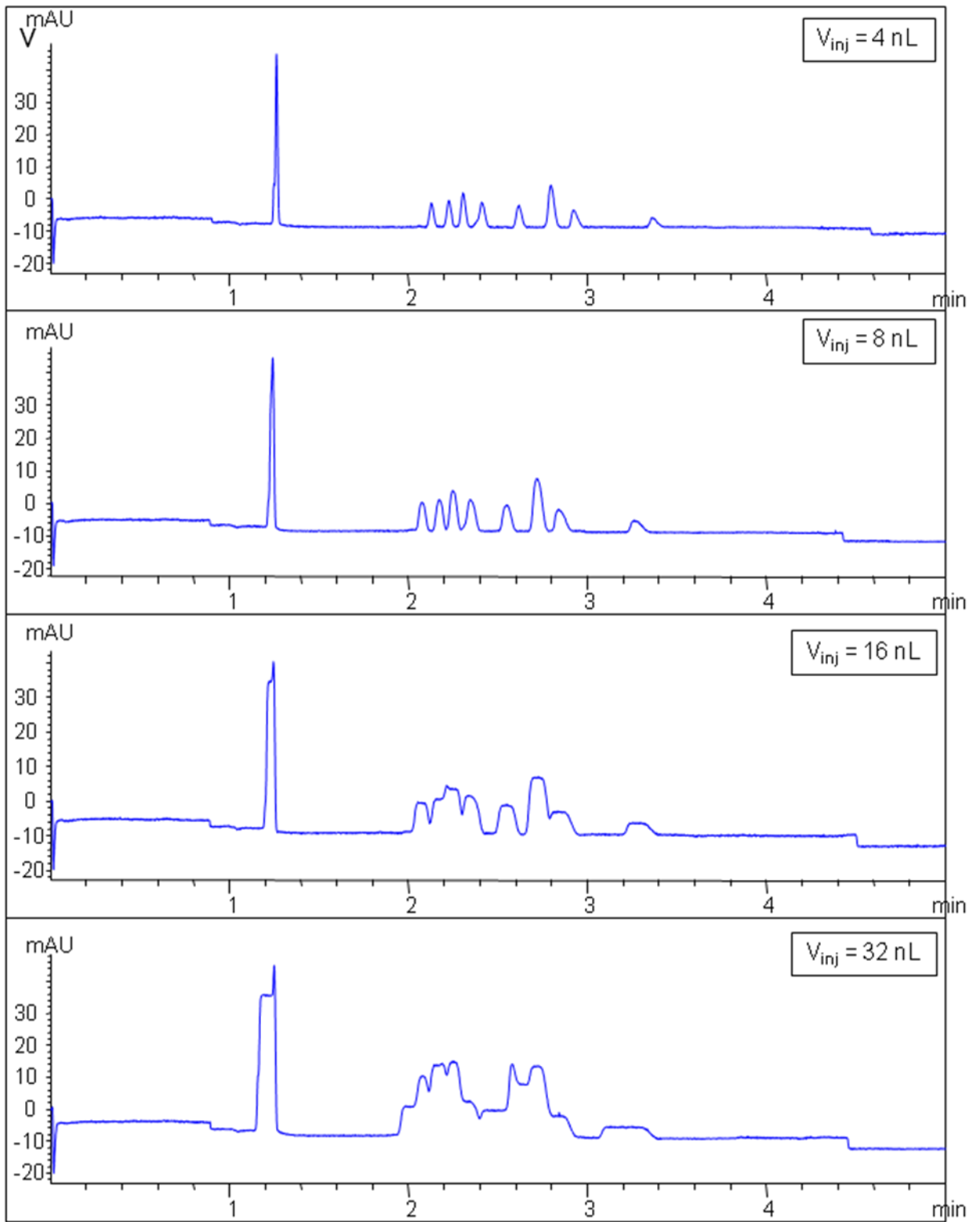


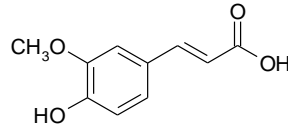
Fig 2 : Influence du volume injecté

1. Quel type de technique électrophorétique est mise en œuvre lors de cette expérience ?
2. Calculer le champ électrique appliqué dans les conditions données (en $V.cm^{-1}$).
3. A quelle famille (cation, neutre ou anion) appartiennent les composés étudiés ? Justifier ?
4. Donner la définition d'une solution tampon ?
5. Calculer la mobilité électroosmotique μ_{eo} et les mobilités électrophorétiques μ_{ep} des différents acides (Figure 1) ?
6. La Figure 2 montre l'influence du volume injecté sur la séparation. Expliquer brièvement la baisse de la résolution.
7. Sur quel paramètre pourrait-on jouer pour éviter cette baisse de résolution ? Expliquer brièvement le phénomène souhaité?

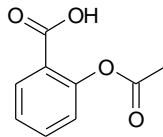
ANNEXE

Formule chimique des composés

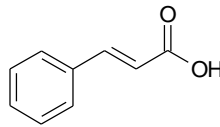
Acide Férulique



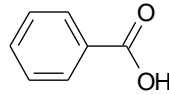
Acide Acétylsalicylique



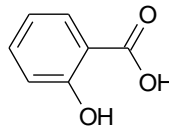
Acide Cinnamique



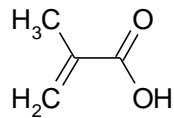
Acide Benzoïque



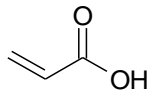
Acide Salicylique



Acide Méthacrylique



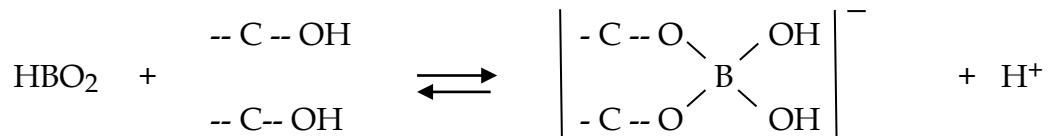
Acide Acrylique



II

SEPARATION DE CATECHOLS ET DE CATECHOLAMINES PAR ELECTROPHORESE ET CHROMATOGRAPHIE ELECTROKINETIQUE MICELLAIRE

La figure 1 montre la séparation électrocinétique capillaire d'un mélange de catéchols et de catécholamines (voir formules en Annexe) en milieu tampon phosphate, à pH 7. Préciser le mécanisme de cette séparation et interpréter l'ordre de migration. La durée de l'analyse peut être très sensiblement diminuée en opérant au même pH, mais en milieu borate (figure 2). L'ordre de migration est alors profondément modifié. Interpréter, sachant que les ions borate donnent, avec les composés α -hydroxylés, des complexes de la forme :



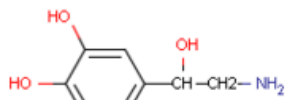
Quelle(s) explication(s) complémentaire(s) fournissent les résultats donnés figure 3 ?

Données :

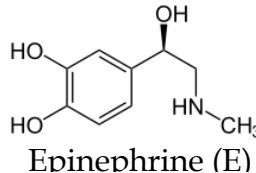
Concentration micellaire critique du SDS : 8 mM

Indices de Rekker :

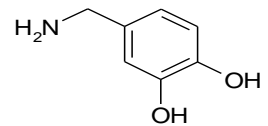
- CH₃ : 0,702 - CH₂ : - 0,530 - CH : 0,235
- (al) - NH₂ : - 1,428 (al) - NH - : - 1,825
- (al) - OH : - 1,491 (al) - CO₂H : - 0,954



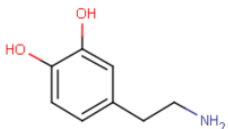
Norepinephrine (NE)



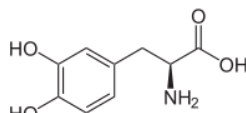
Epinephrine (E)



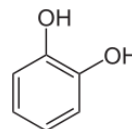
3,4-Dihydroxybenzylamine (DHBA)^o



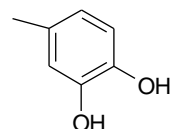
Dopamine (DA)



L-DOPA



Catechol (CAT)



4-Méthylcatechol (4-MC)

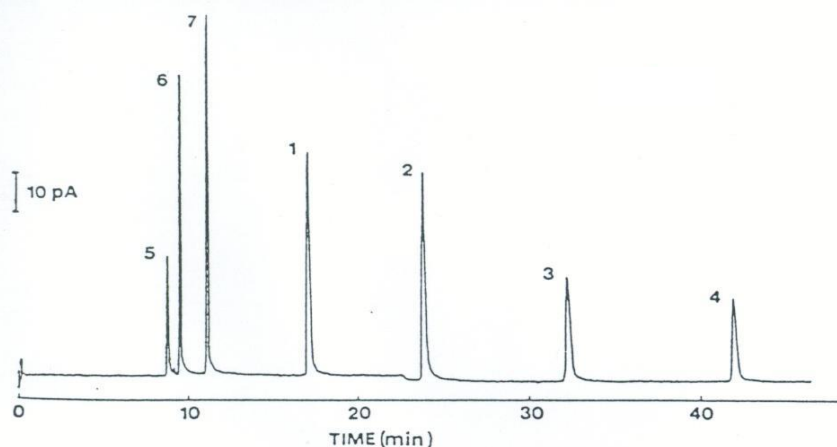
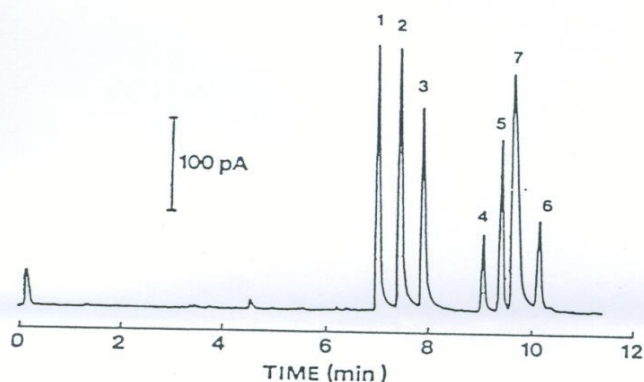


Fig. 1. Elektrokinetik separation of non-ionic and cationic catechols (see Table I for peak identification): 5 mM dibasic sodium phosphate-5 mM monobasic sodium phosphate at pH 7 with 20 mM SDS; separation capillary length, 66.5 cm; detection capillary length, 1.6 cm; separation potential, 20 kV (5 μ A); injection, 2 s at 20 kV.



No.	Compound
1	Norepinephrine (NE)
2	Epinephrine (E)
3	3,4-Dihydroxybenzylamine (DHBA)
4	Dopamine (DA)
5	L-DOPA
6	Catechol (CAT)
7	4-Methylcatechol (4-MC)

Fig. 2. Elektrokinetik separation of catechols as borate complexes: 10 mM dibasic sodium phosphate-6 mM sodium borate at pH 7 with 10 mM SDS; separation capillary, 64.3 cm; detection capillary, 1.7 cm; separation potential, 20 kV (7 μ A); injection, 4 s at 20 kV.

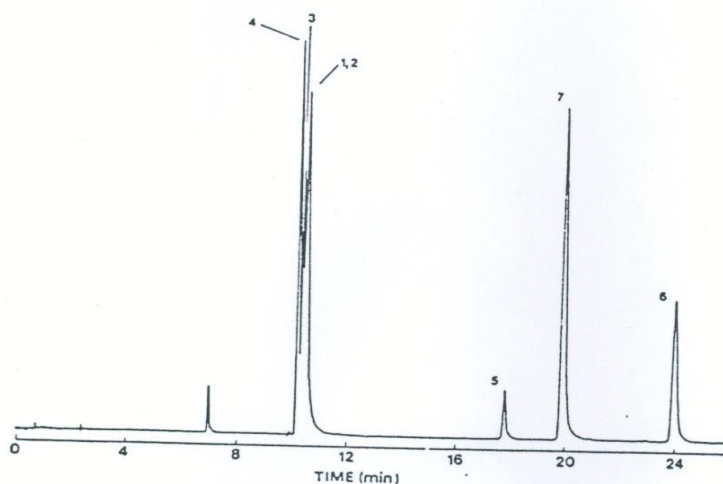


Fig. 3. Electropherogram of catechols in borate buffer: 10 mM dibasic sodium phosphate-25 mM sodium borate at pH 7; separation capillary, 68.1 cm; detection capillary, 1.7 cm; separation potential, 20 kV (12 μ A); injection, 2 s at 20 kV.

II

SEPARATION DE PURINES SUBSTITUEES PAR ELECTROPHORESE ET CHROMATOGRAPHIE ELECTROKINETIQUE MICELLAIRE.

La figure 1 représente une séparation électrocinétique de purines substituées dans un tube capillaire en silice fondue de 1 m de longueur et 75 µm de diamètre intérieur. La tension appliquée est de 17,5 kV. L'électrolyte est constitué de Na_2HPO_4 10 mM, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 6 mM et de SDS 50 mM. L'échantillon est mis en solution dans l'électrolyte et est introduit par électromigration à l'extrémité du capillaire relié au pôle positif. La détection est effectuée par absorptiométrie UV à 280 nm, directement à travers le capillaire, à 90 cm de l'extrémité par laquelle l'échantillon est injecté.

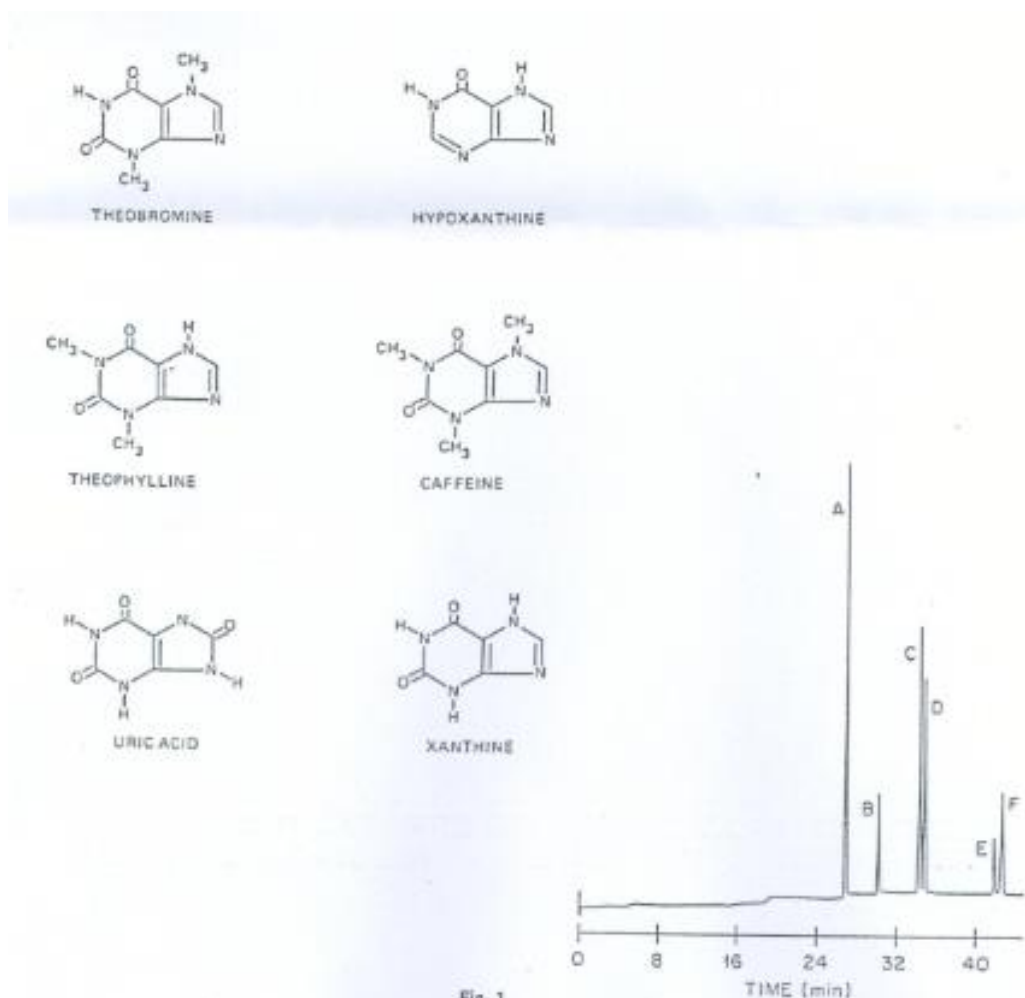
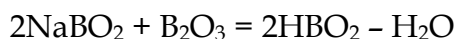


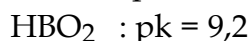
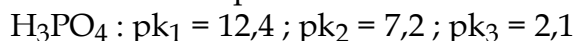
Fig. 1

Separation of substituted purines: (A) theobromine, (B) hypoxanthine, (C) theophylline, (D) caffeine, (E) uric acid, (F) xanthine.

1/. Calculer le pH de l'électrolyte (on remarquera que $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ est un mélange d'acide borique et de borate de sodium)



Constantes acido-basiques :



2/. Dans l'eau, les purines étudiées ont des propriétés basiques extrêmement faibles et ne sont protonables qu'en milieu très acide. A l'exception de la caféine, elles présentent en revanche, suivant les espèces, une ou deux fonctions acides, dont les constantes sont données dans le tableau I.

a/. Etablir, pour un monoacide HA de constante k, puis pour un diacide H_2A de constantes k_1 et k_2 , l'expression de la charge apparente en fonction du pH de l'électrolyte. Déterminer la charge apparente au pH de l'électrolyte pour chaque purine.

b/. Interpréter l'ordre de migration et indiquer le mécanisme de séparation dominant. En quel rang sortirait la caféine en absence de SDS ? Comment peut-on expliquer le comportement du couple acide urique-xanthine ?

Purines	Identification (Figure 1)	pK ₁	pK ₂	Masse Molaire
Théobromine	A	10	-	180
Hypoxanthine	B	12	8,9	136
Théophylline	C	8,6	-	180
Caféine	D	-	-	194
Acide urique	E	10,5	5,5	168
Xanthine	F	11	7,5	152