

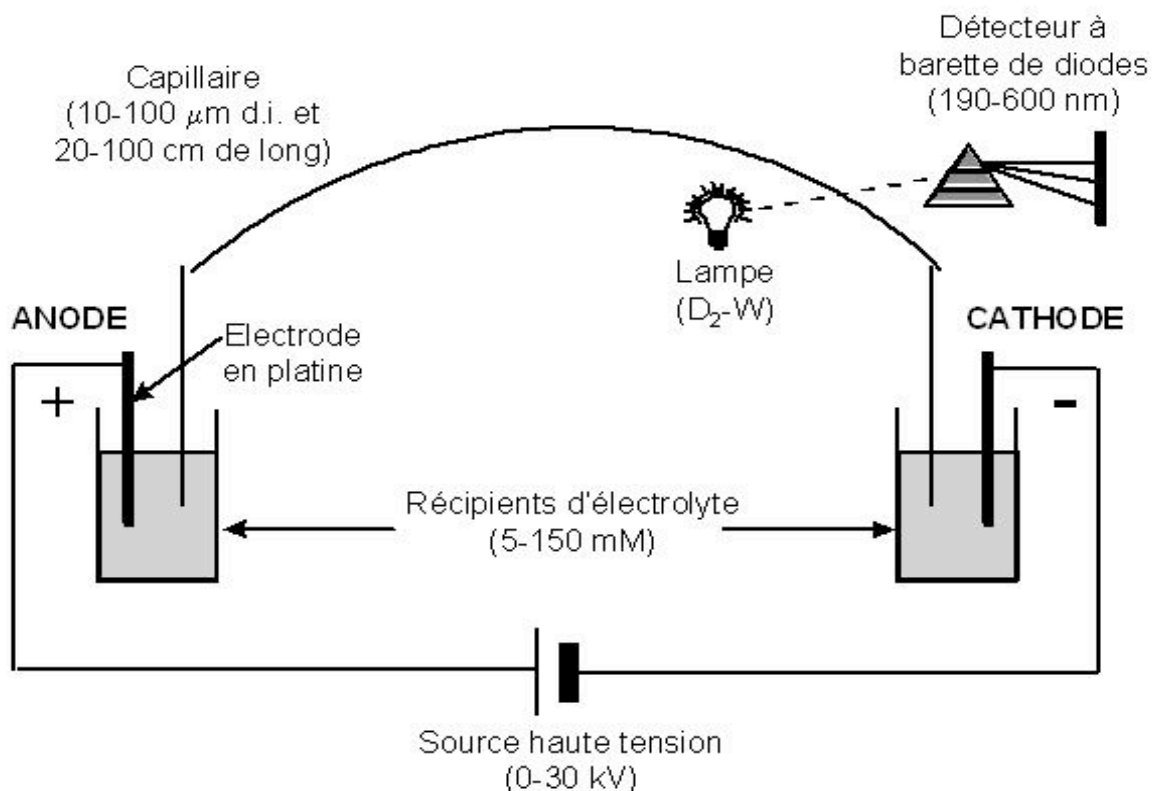
ELECTROPHORESE CAPILLAIRE

- Méthode d'analyse « efficace » basée sur la **séparation des espèces chargées sous l'effet d'un champ électrique** continu dans un tube capillaire de 50 à 100 μm \varnothing rempli d'une solution d'électrolytes.

1 – Appareillage et mode opératoire

1.1 Appareillage

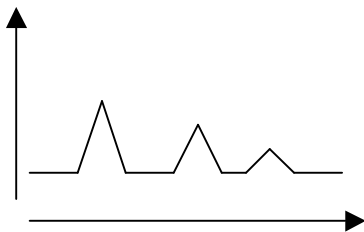
- **Tube capillaire en silice fondue :**
 - 50 à 100 μm de \varnothing interne recouvert de polyimide à l'ext (jaune) \Rightarrow souplesse et rigidité
 - les extrémités du capillaire plongent ds un réservoir de tampon
 - le capillaire se remplit de solution tampon,
- **Détecteur :**
 - Détection **en ligne** \rightarrow fenêtre de détection au niveau d'une portion capillaire dépourvu de polyimide .
 - le + courant = **détecteur UV** (détecteur à filtre ou à **barrette de diode**)
 - ici n'y a **pas de perte de résolution** car détection au milieu du capillaire et non à la sortie
- **Thermostabilisation du capillaire**
 \rightarrow maintient le tps de migration cstant pdt l'analyse
- **Electrodes :**
 - ds flacons \exists 2 électrodes de platine reliées à un générateur de T° (0 à 30 kV)
- **Flacons** (2 à 4 ml vs 500 ml en CLHP) contiennent tampon ou ech
- **\exists syst d'introduction des ech**
en général ,on applique P° sur flacon pour introduire l'ech
- **syst d'enregistrement automatisé**
 \rightarrow coût ~300 -400 000 F



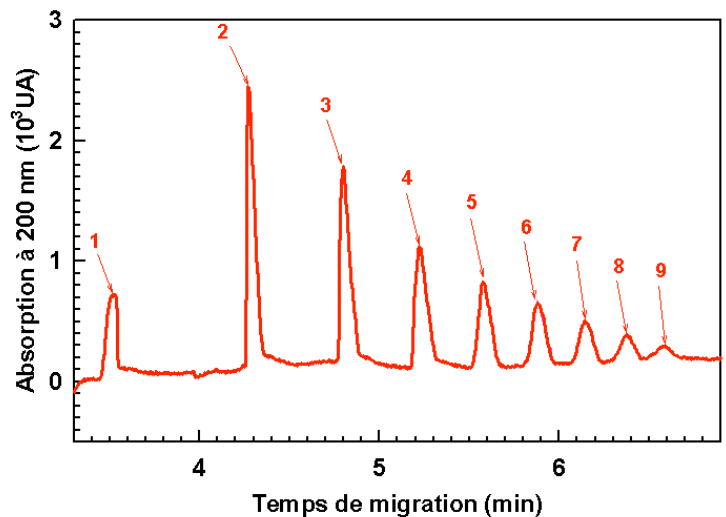
1.2 Mode opératoire

- **1/ remplir le capillaire par solution tampon :**
 - on immerge l'extrémité ds flacon tampon ,
 - on applique une P° sur le flacon tampon → remplissage du capillaire
 - puis rejette ds poubelle
- **2/ Introduction de l'échantillon :**
 - extrémité ds flacon ech , - applic d'une P° sur le flacon échantillon
 - rempli cap d'électrolyte + bouchon d'ech à analyser
 - vol injecter vs **2 et 20 µl**
- 3/ Replacer les 2 extrémités ds flacon tampon puis on **applique tension** aux extrémités
 - →séparation vs 2 flacons de tampon
 - les espèces migrent vers la fenêtre de détection

⇒ **Electrophorégramme :**
signal = f(tps de migration)



- **Analyse qualitative (tm) :**
 - compo ech
 - trace ds spectre
- **Analyse quantitative :**
 - aires
 - nature des pics



tps de migration ≠ tps de rétention (φs)

2 – Principe de base de la migration

2.1 Mouvements électrophorétiques

=migration des ions sous l'influence du **champ électrique** ($E = V/L$) avec V = tension et L = longueur

➤ **La mobilité μ_e dépend de :**

- **La charge de l'ion :**
caractérisé par mobilité +/- μ_e propre à l'ion $\mu_e = q/6\pi\eta r$
 η → viscosité de l'électrolyte
 r → rayon solvaté de l'ion
- **La taille de l'ion :**

à charge égale , ions de petite taille : μ_e + gde → sortent en 1er

à taille égale , ions les + chargés : μ_e + gde

μ_e = caractère de l'espèce ds milieu , indpd de V

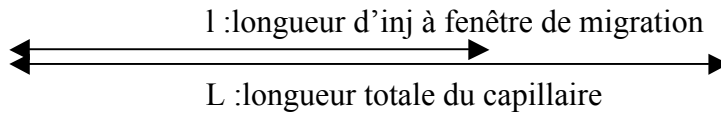
si η change (variation de T°) l'ion va + vite

➤ **Vitesse de migration électrophorétique :**

$$V_e = \mu_e \times E$$

Champ électrique $E = V/L$

Vitesse $V = l/t_m$

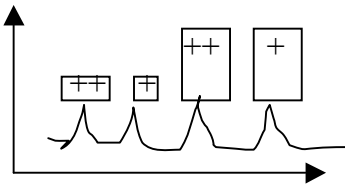


Si change tension, V_e varie

Si on injecte côté anodique, détection des cations seuls

Si il n'y avait que ce mvmt électrophorétique

Sep théorique des cations :



petits cations divalents → gros cations monovalents

La charge Q de la molécule va est fonction du pH isoélectrique de la particule et du pH du solvant, on appel pH isoélectrique d'une particule, le pH pour lequel cette particule ne migre pas dans un champs électrique.

La différence $pH - pHi$ détermine le signe de la charge Q d'une particule :

si $pH > pHi$	charge nette négative (anion)	migration vers l'anode
si $pH < pHi$	charge nette positive (cation)	migration vers la cathode
si $pH = pHi$	charge nette nulle	pas de migration

On note que l'anode est + et la cathode -

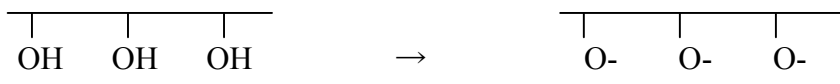
Les anions vont donc vers le + (anode) et les cations vers le - (cathode)

2.2 Mouvements électro-osmotique

➤ Mvmt de la solution d'électrolyte sous l'action du champ électrique appliqué .

➤ Il est due à l'ionisation de la paroi interne du capillaire :

- A partir du pH 2,5, les groupement silanols de la silic du capillaire vont s'ioniser et se charger (-), d'autant plus que le pH sera élevé.
- Pour respecter l'électroneutralité, les cations de l'électrolyte vont s'amasser vers la paroi et les anions seront repoussés.



➤ On va assister à la formation d'une double couche :

- 1 Statique (+) solidement fixée à la paroi : c'est la couche de Stern.
- 1 Diffuse : c'est la couche de Gouy-Chapman

- Entre ces deux couches on a un **potentiel ξ (zêta)** qui caractérise la densité de charge de la surface du capillaire.
- Quand on applique une tension, les **cations de la couche diffuse vont être entraînés** vers la cathode et entrainer avec eux tout l'échantillon. Ce flux de cations s'appelle **le flux électro-osmotique $\mu_{féo}$** . Il est **caractéristique de l'électrolyte** (nature, pH, force ionique) **mais indépendant de la tension appliquée**.
- Plus le pH sera élevé, plus la paroi sera ionisée et plus ξ sera élevé ainsi que la mobilité.
 - A pH alcalin ont aura une mobilité maximum.
 - Au contraire, à un pH de 2,5-3, la mobilité sera faible.

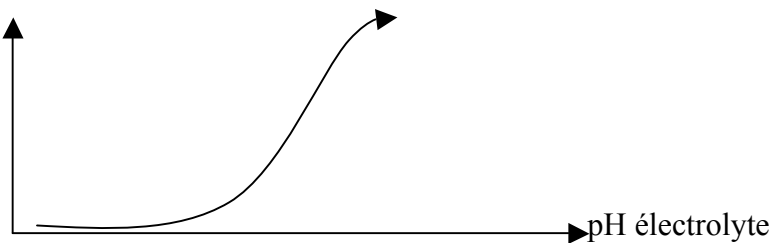
NB : En fait, plus la force ionique est élevée, et plus la couche diffuse a une épaisseur réduite et plus le mouvement sera faible.

♦ **mobilité $\mu_{féo}$**

$\mu_{féo} = \epsilon \zeta / 4\pi\eta$

+ force ionique \uparrow + $\mu_{féo} \downarrow$

$\mu_{féo}$



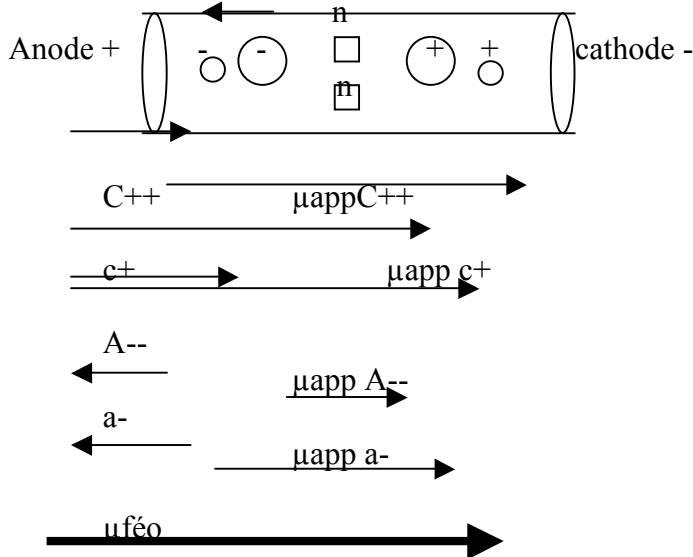
•vitesse de migration électro osmotique

$V_{féo} = \mu_{féo} \times E$ (E=V/L) (v=d/t)

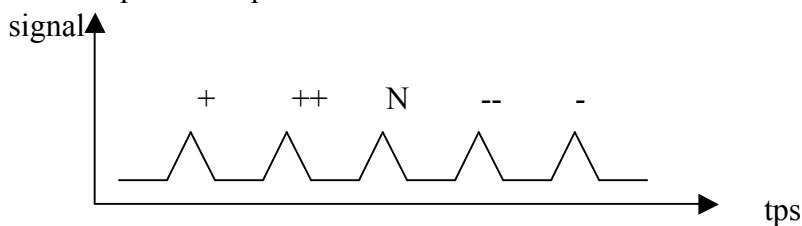
Tte espèce est soumise à μ_e et $\mu_{féo}$, et migre donc avec une **mobilité apparente**

$\rightarrow \mu_a = \mu_{féo} + \mu_e$

d'où $V_{app} = (\mu_{féo} + \mu_e) E$ (vitesse apparente)



si $\mu_{féo}$ important \rightarrow permet visualiser anion et cation



➤ **Ordre de migration :**

- On a d'abord les petites espèces avec une μ_e importante et accélérée par le flux.
- Puis les espèces plus grosses avec une $\mu_e > 0$ mais $<$
- Puis les molécules neutres avec un $\mu_e = 0$ qui migrent à la vitesse du flux.
- Les anions enfin qui seront entraînés vers la cathode par le flux (et donc à contre-sens), les **gros d'abord puis les petits.**

➤ **pH=paramètre opératoire majeur** de séparation qui règle :

- charge des espèces
- niveau du féo

NB : Cette technique s'appelle l'électrophorèse capillaire en solution libre (FSCE) ou électrophorèse capillaire de zone (CZE)

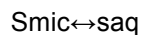
→ Permet la séparation des cation et des anions mais les **molécules neutres sont non séparés !!**

3 – Différents types d'électrophorèse capillaire

3.1 Chromatographie capillaire électrocinétique micellaire (MECK ou MECC)

➤ **Permet de séparer les espèces neutres entre elles.**

Electrolyte + tensio-actif (chargé) (SDS) à conc $>$ cmc



Au dessus de 8 à 9 M → formation d'agrégat ou micelle

Tête polaire tournée vers environnement aqueux

+Cœur lipophile

⇒ micelles chargées comme des anions

les espèces neutres se **partage vs ϕ aq environnante et cœur lipophile de la micelle**

une espèce très lipophile ne pénètre jms ds micelle

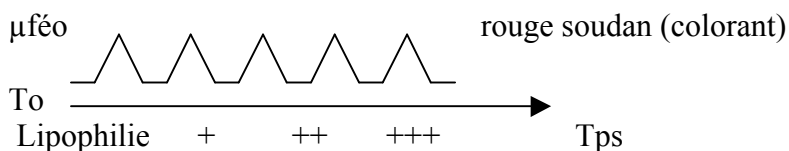
$\mu_{féo}$

c'est le tps de séjour ds micelles qui règle tps de migration des espèces

la migration des espèces neutres est basée sur le **coefficient de partage micelle-jct° d'électrolyte**

:

séparation basée sur la lipophilie



(marqueur féo : composé neutre, marqueur micelle : composé lipophile)

électrocapilarité permet sep cation ,anion esp neutres (/ ajout SDS chargé)

3.2 Electrophorèse capillaire sur gel

3.3 Electrophorèse capillaire à focalisation isoélectrique

4 – Applications

➤ Large domaine d'application :

- Biom* (ADN ,P* ,peptides)
- m* organiques chargées ou neutres ,MM faibles ,
- petits anions minéraux et organiques (Cl , Br ,SO4...)
- Sep espèces + (cations)et – (anions)

➤ Ds l'indus pharm :

- peu ut en contrôle de routine
- srtt ut en recherche

➤ Dosage PA :

- rech impuretés →bonne méthode complémentaire de la CLHP car principes ≠ts
- analyse de petits ions →det steocchio m*α
→verif impuretés minérales
- séparation d'énantiomères : indirecte formation diastéréoisomère

➤ ∃ monographie ds **φcopée Européenne**

➤ Avantages :

- faible conso d'ech ,d'électrolyte
- automatisation
- mise en route rapide (eq rapide du capillaire)
- gamme de pH 1 à 13 (vs 2.5 et 8 en CLHP) (permet ionisation des composés)
- faible coût

➤ Limites :

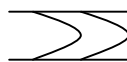
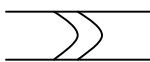
- **faible sensibilité** (en conc)→solution inj assez conc (min :1mg/l) car chemin optique =Ø capillaire (50µ)
- **répétabilité** des α pour analyse quanti <CLHP

◆pourquoi l'EC est-elle une méthode très efficace ?

↔N élevé ,pic étroit

•profil du féo « plat »

car généré par dble couche



profil du flux



EC

CLHP

Pics étroits car **Ø interne du capillaire faible**

→la chaleur

∃pas chaleur qui élargirait pic/effet joule

•**détection réalisée sur capillaire**

pas d'élargissement des pics

⇒la principale source qui explique la dispersion c'est la diffusion m*α des espèces liées à la taille des m*

théorie de diffusion :

$$N = (\mu_e + \mu_{\text{éto}}) V / 2D_m$$

D_m = coefft de diffusion

Cpq pour P^* très grosse D faible $\rightarrow N$ allant jusqu'à pls milliers