

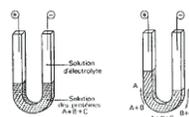


CE-MS :
Electrophorèse Capillaire

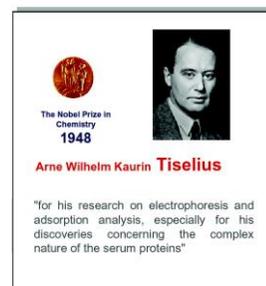
Contact : Yannis FRANCOIS, Lab. de Spectrométrie de Masse des Interactions et des Systèmes,
1 rue Blaise Pascal, 67000 Strasbourg
email: yfrancois@unistra.fr

UN PEU D'HISTOIRE ...

1937



Séparation de protéines dans le sérum humain



d'après J.L. Veuthey, Univ. de Genève

... ET LA SUITE

1939

Séparation de protéines par électrophorèse sur papier

1954



1967

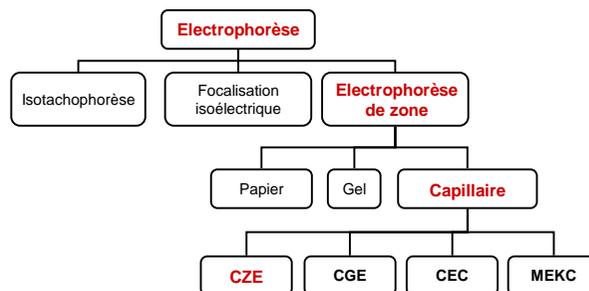
S. Hjerten : capillaires de 300 µm i.d.

1981

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

d'après J.L. Veuthey, Univ. de Genève

Une grande famille



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

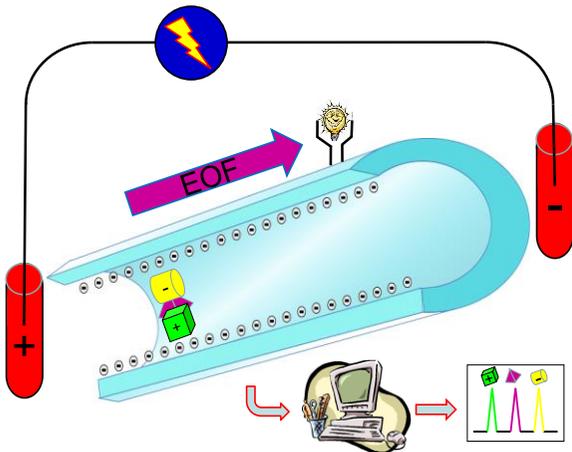
- 5. La Focalisation isoélectrique (CIEF)

Une technique séparative



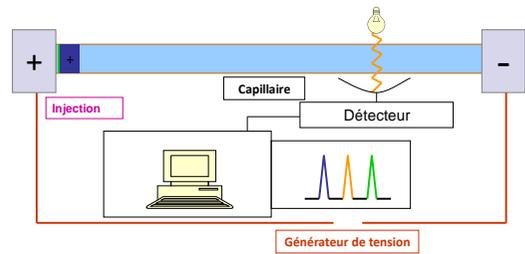
- ⊕ instrumentation : pas de pompe, pas de vanne d'injection
- MINIATURISATION
- faibles volumes d'échantillon, d'électrolyte
- COÛT
- EFFICACITE de séparation élevée

- ⊖ faible SENSIBILITE DE DETECTION

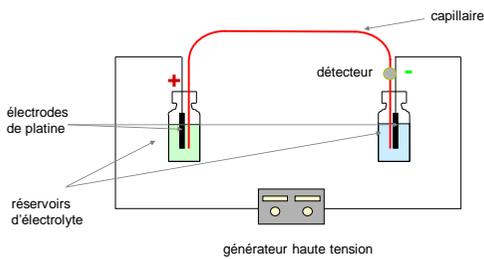


Introduction électrophorèse capillaire

Principe

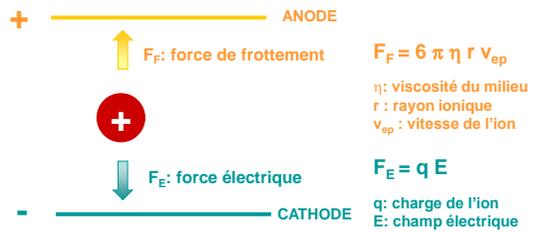


Dispositif expérimental



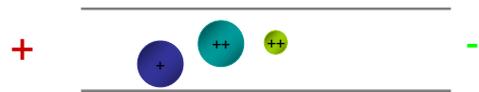
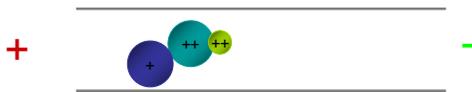
Capillaires conventionnels : silice
 longueur : 20 - 100 cm
 diamètre interne : 20 - 100 µm
 Différences de potentiel : 10 - 40 kV

Electrophorèse



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





L'ELECTROPHORESE peut donc séparer :

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

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

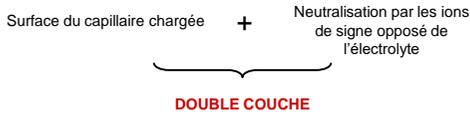
3. L'amélioration de la sélectivité

4. L'analyse quantitative

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

5. La Focalisation isoélectrique (CIEF)

Electroosmose



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 électroosmotique

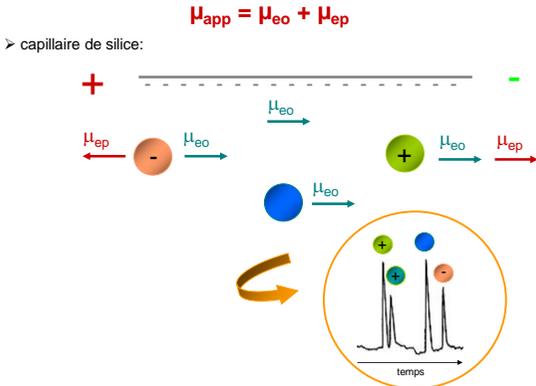
La chute de potentiel dans la double couche détermine la vitesse de déplacement du solvant :

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

ζ : potentiel zéta
 ϵ : constante diélectrique du milieu
 η : viscosité de la solution

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

BILAN



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) :

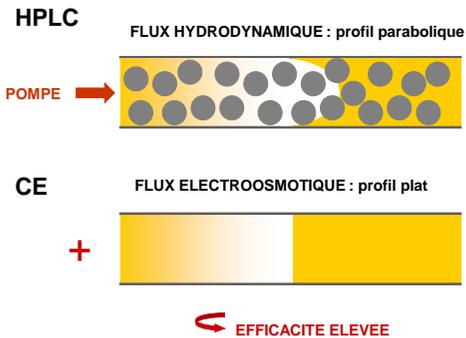
$$H = A + B/u + C \cdot u$$

Chemins préférentiels (A) :

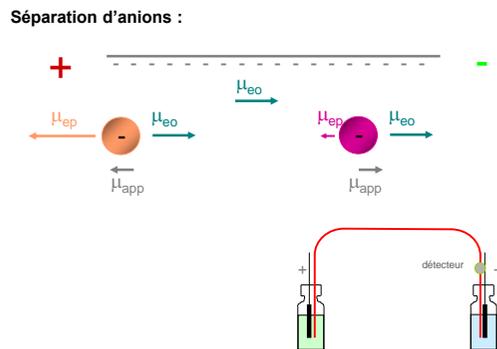
Diffusion moléculaire (B) : fonction à la fois du soluté et de la phase mobile

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

Profils d'écoulement



Modifier la surface, POURQUOI ?



Modifier la surface, COMMENT ?

Greffages « dynamiques » :

▸ Présence d'additifs dans l'électrolyte

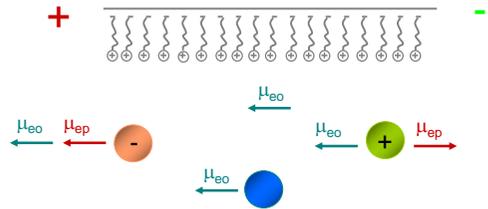
Greffages permanents

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

BILAN

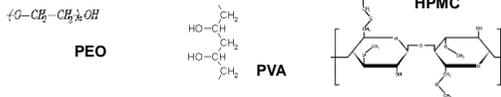
$$\mu_{app} = \mu_{eo} + \mu_{ep}$$

▸ surface chargée positivement



Autres additifs

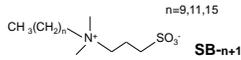
Polymères neutres hydrophiles



Surfactants neutres

- Triton X-100**
- Brij-35**
- Tween 20**

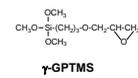
Surfactants zwitterioniques



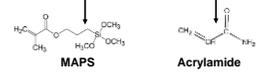
Greffages permanents

- Par liaison covalente

Silylation



Silylation et polymérisation



- Par immobilisation thermique

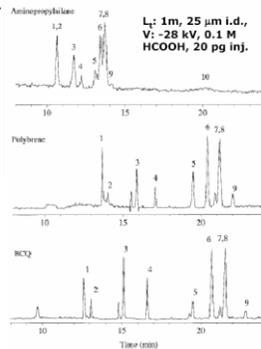
- Alcool polyvinylique (PVA)**
- Hydroxypropylméthylcellulose (HPMC)**

Insolubles dans les solutions aqueuses après chauffage

Modifier la surface, COMMENT ?

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

Peptides	APC	Theoretical plates	BCO
1 Leu-enkephalin	556	62 000	185 000
2 Glu-Fibrinogen	786	38 000	185 000
3 Substance P ₁₋₄	548	76 000	249 000
4 Cholecystokinin ₈₋₁₆	418	49 000	273 000
5 Substance P ₁₋₉	553	29 000	355 000
6 Angiotensin I	453	31 000	220 000
7 Val ¹¹ I ⁷ Angiotensin III	442	26 000	152 000
8 ACTH _{1-18}}	482	60 000	111 000
9 pGlu ₄ MBP _{1-18}}	459	18 000	268 000



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

Influence du voltage

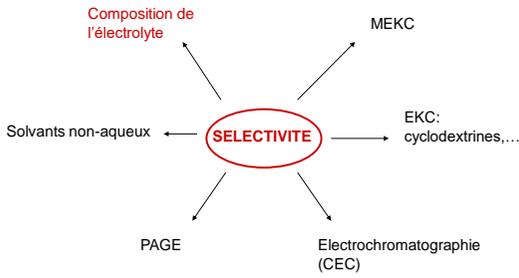
Limitation : Puissance dissipée

$$\frac{P}{L} = \frac{\Delta C r^2 V^2}{L^2}$$

- L : longueur du capillaire
- r : rayon du capillaire
- C : concentration de l'électrolyte
- Δ : conductance molaire de la solution

➔ **capillaires de faibles diamètres**

AMELIORER LA SELECTIVITE



Facteurs affectant la mobilité électroosmotique

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

σ : densité de charge à la surface du capillaire
 η : viscosité de la solution
 δ : épaisseur de la double couche

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

Plan du cours

1. La migration en électrophorèse capillaire

- 1.1 Mobilité électrophorétique
- 1.2 Phénomène d'électrosmose

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

5. La Focalisation isoélectrique (CIEF)

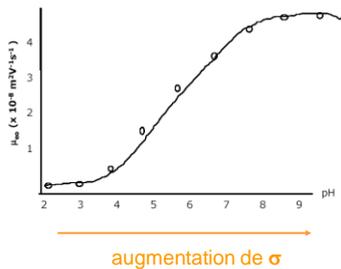
Facteurs affectant la mobilité électrophorétique

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

- ▣ 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}

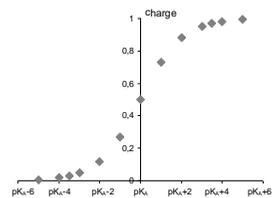
Capillaire de silice



Notions de pK_A



avec $pK_A = pH - \log \frac{[L^-]}{[HL]}$



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
HEPES	7.55
TRIS	8.30

} Conductivité faible

Influence de la force ionique

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

σ : densité de charge à la surface du capillaire
 η : viscosité de la solution
 δ : épaisseur de la double couche

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

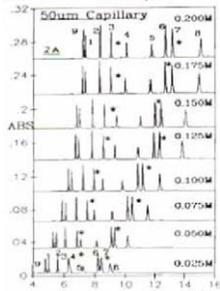
Influence de la force ionique

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

lorsqu'on augmente la concentration de l'électrolyte
 ➤ diminution de δ

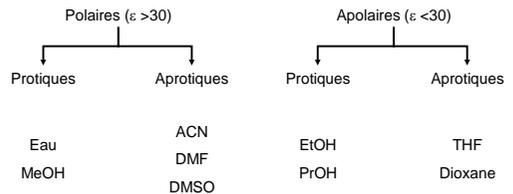
Tampon phosphate (0.025-0.2M, pH 2.4), V: 30 kV, Ld: 0.5 m.

- 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

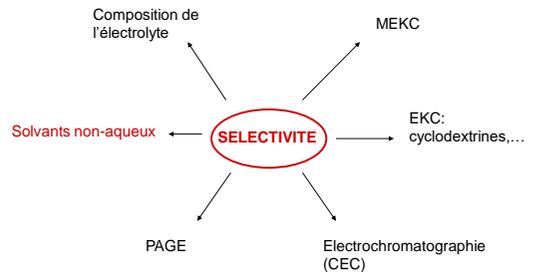
➤ Influence sur le pH

➤ Influence sur la solvation

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

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

AMELIORER LA SELECTIVITE



Intérêt des milieux non-aqueux

✓ faibles courants

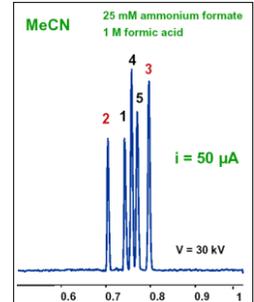
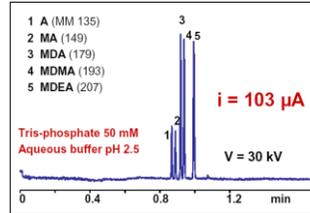
❖ augmentation des diamètres des capillaires
 □ semi-préparative

❖ augmentation de l'efficacité ($N/\ell \propto \epsilon/\eta^2$)

	ϵ/η	ϵ/η^2
eau	88,2	6924
méthanol	22,7	552
NMF	110,3	20075
acétonitrile	110,3	4136

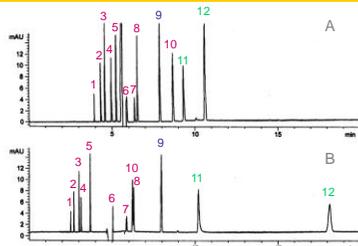
- ✓ modification des sélectivités
- ✓ meilleure compatibilité avec la spectrométrie de masse
- ✓ augmentation des solubilités (ex: cyclodextrines)

NACE



Chromatographia, 2000, 52, 403-407

NACE



Séparation d'un mélange de 12 composés

capillaire de silice 58,5cm x 50µm i.d. - 30kV

électrolyte : (A) éthanol/acétonitrile/acide acétique (50:49:1) dans 20mM CH₃COO⁻, NH₄⁺
 (B) méthanol/acétonitrile/acide acétique (50:49:1) dans 20mM CH₃COO⁻, NH₄⁺

1 amphétamine, 2 éphédrine, 3 levorphanol, 4 dextromoramide, 5 morphine, 6 hydrochlorothiazide, 7 acide benzoïque, 8 acide meso-2,3-diphénylsuccinique, 9 probenecid, 10 chlorothiazide, 11 acide phénylénédiacétique, 12 acide éthacrylique.
 J. Chromatogr. A, 1997, 792, 13-35.

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
5. La Focalisation isoélectrique (CIEF)

DETECTION

LES PLUS COURANTS:

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

