

Méthodes de séparation analytiques

Electrophorèse capillaire

Introduction

- ⇒ L'électrophorèse se différencie de la chromatographie notablement par le mode de migration des espèces à séparer. La migration s'effectue par application d'une différence de potentiel entre deux électrodes situées de part et d'autre de l'unité de séparation.
- ⇒ L'électrophorèse concerne la séparation d'espèces ioniques ou ionisables. Des espèces neutres peuvent aussi être séparées, il faut les incorporer à des micelles dont la surface en contact avec la solution est anionique ou cationique.
- ⇒ De récents développements proposent l'utilisation de capillaires de silice garnis de particules de phases stationnaires propres à l'HPLC dans des appareils d'électrophorèse.
- ⇒ La migration de l'éluant à travers cette micro-colonne s'effectue grâce à la différence de potentiel appliquée entre deux électrodes situées de part et d'autre de l'unité de séparation. Cette technique hybride entre chromatographie et électrophorèse s'appelle l'électrochromatographie.
- ⇒ L'électrophorèse réalisée en capillaire de silice (électrophorèse capillaire) peut être aussi mise en œuvre sur support de papier (électrophorèse sur papier) ou sur gel (électrophorèse sur gel). Pour les différents types d'électrophorèse, l'éluant est une solution tampon (phase aqueuse).

Electrophorèse capillaire

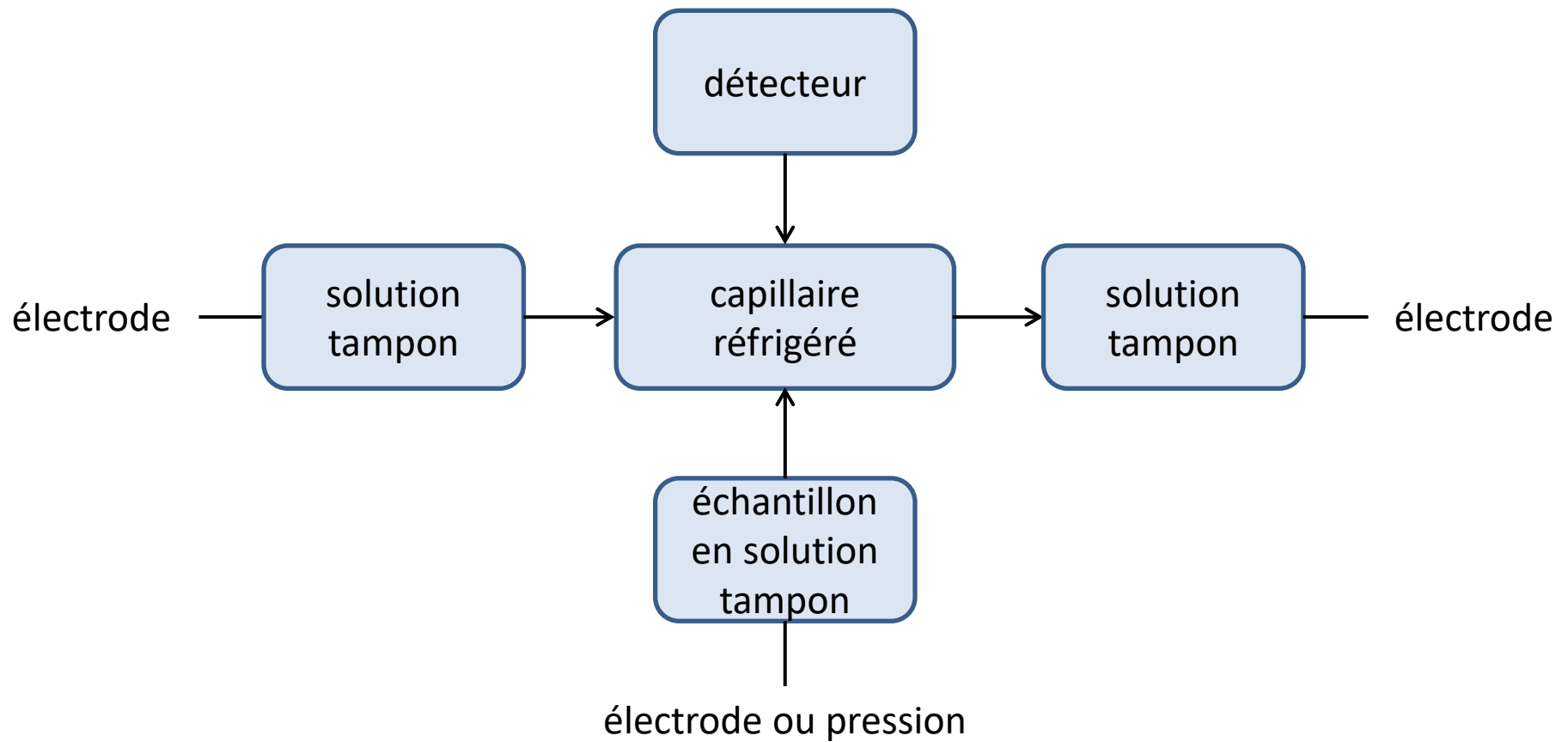


Electrophorèse capillaire Beckman Coulter

Electrophorèse capillaire

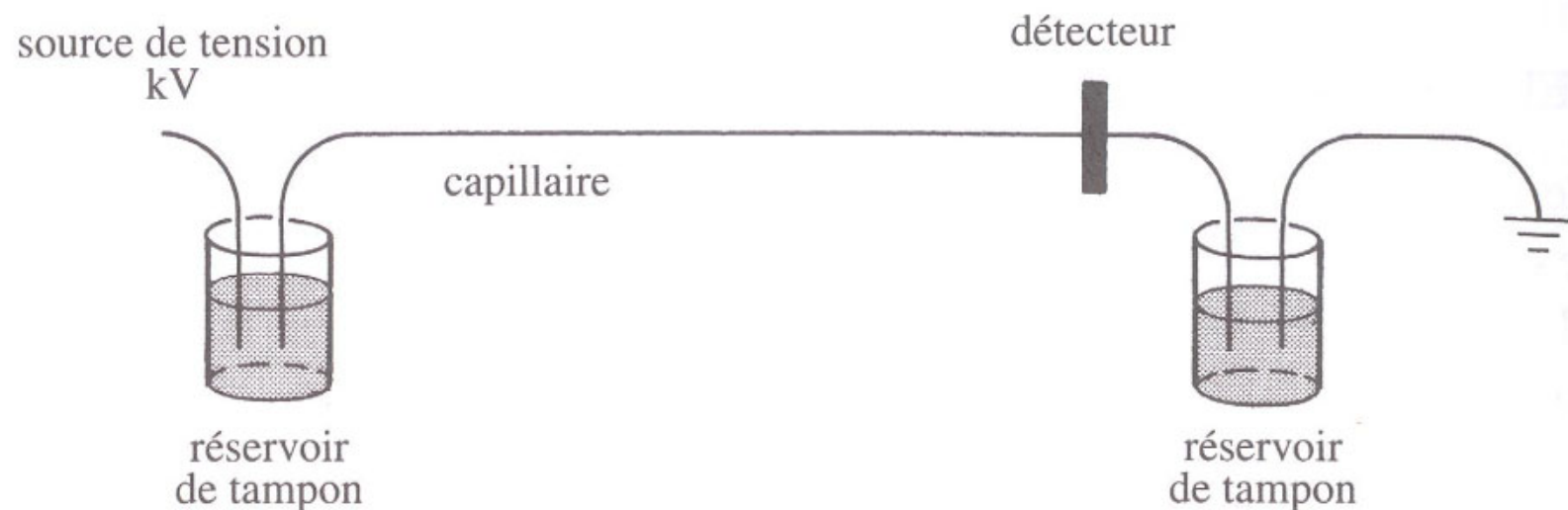


Principe de l'électrophorèse capillaire

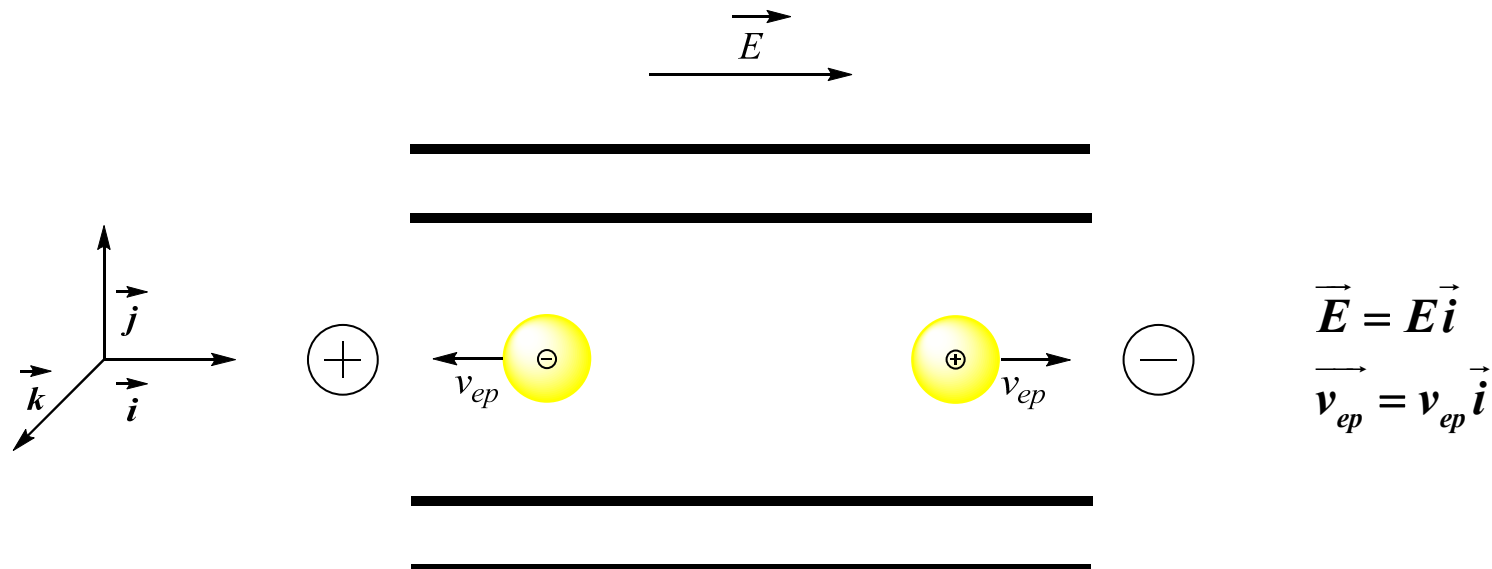


Théorie de la migration

- ⇒ Que se soit sous forme naturelle ou sous forme de micelles, l'électrophorèse concerne la migration de solutés chargés, anions ou cations. Les espèces neutres, ne migrent que grâce au flux électroosmotique (voir ci-après).
- ⇒ La migration se caractérise par la mobilité des solutés dans le champ électrique défini par la différence de potentiel appliquée entre les deux électrodes situées aux deux extrémités de l'unité de séparation (capillaire, papier ou gel).



- ⇒ En électrophorèse capillaire, le capillaire possède une surface chargée, naturelle ou induite chimiquement (voir ci-après).
- ⇒ Dès lors, on doit considérer la vitesse de migration électrophorétique et le flux électro-osmotique pour déterminer la vitesse de migration apparente d'un soluté analysé.
- ⇒ La vitesse de migration électrophorétique \vec{v}_{ep} concerne la vitesse de migration du soluté en mouvement dans le capillaire lorsqu'il est soumis à un champ électrique \vec{E} . En négligeant dans un premier temps la charge de surface du capillaire, le phénomène peut être décrit comme suit:



⇒ La vitesse de migration électrophorétique \vec{v}_{ep} est reliée à la mobilité électrophorétique μ_{ep} et au champ électrique \vec{E} :

$$\vec{v}_{ep} = \mu_{ep} \vec{E}$$

⇒ En exprimant la vitesse de migration électrophorétique \vec{v}_{ep} en fonction des vecteurs de base \vec{i} , \vec{j} , et \vec{k} , on obtient:

$$\vec{v}_{ep} = v_{ep} \vec{i} = \mu_{ep} E \vec{i}$$

$$v_{ep} = \mu_{ep} E = \frac{q\Delta V}{6\pi\eta rL}$$

v_{ep} : vitesse de migration électrophorétique ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)

μ_{ep} : mobilité électrophorétique ($\text{m}^2\cdot\text{v}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)

E : champ électrique ($\text{V}\cdot\text{m}^{-1}$)

q : charge de la particule ($\text{C} = \text{kg}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-2}$)

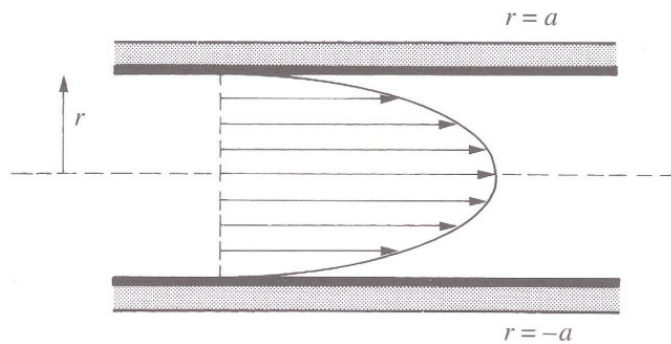
ΔV : différence de potentiel appliquée (V)

η : viscosité cinématique ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)

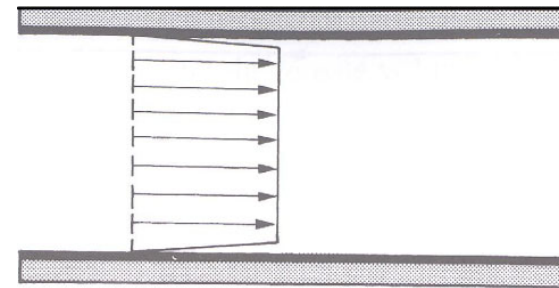
r : rayon du soluté (m)

L : longueur du capillaire (m)

- ⇒ Le phénomène de migration de la solution tampon à travers le capillaire est appelé l'électroosmose.
- ⇒ Le phénomène d'électroosmose est dû à la présence d'une charge à la surface du capillaire.
- ⇒ Le profil d'écoulement dans un capillaire d'électrophorèse est très différent de celui observé dans un tube chromatographique:



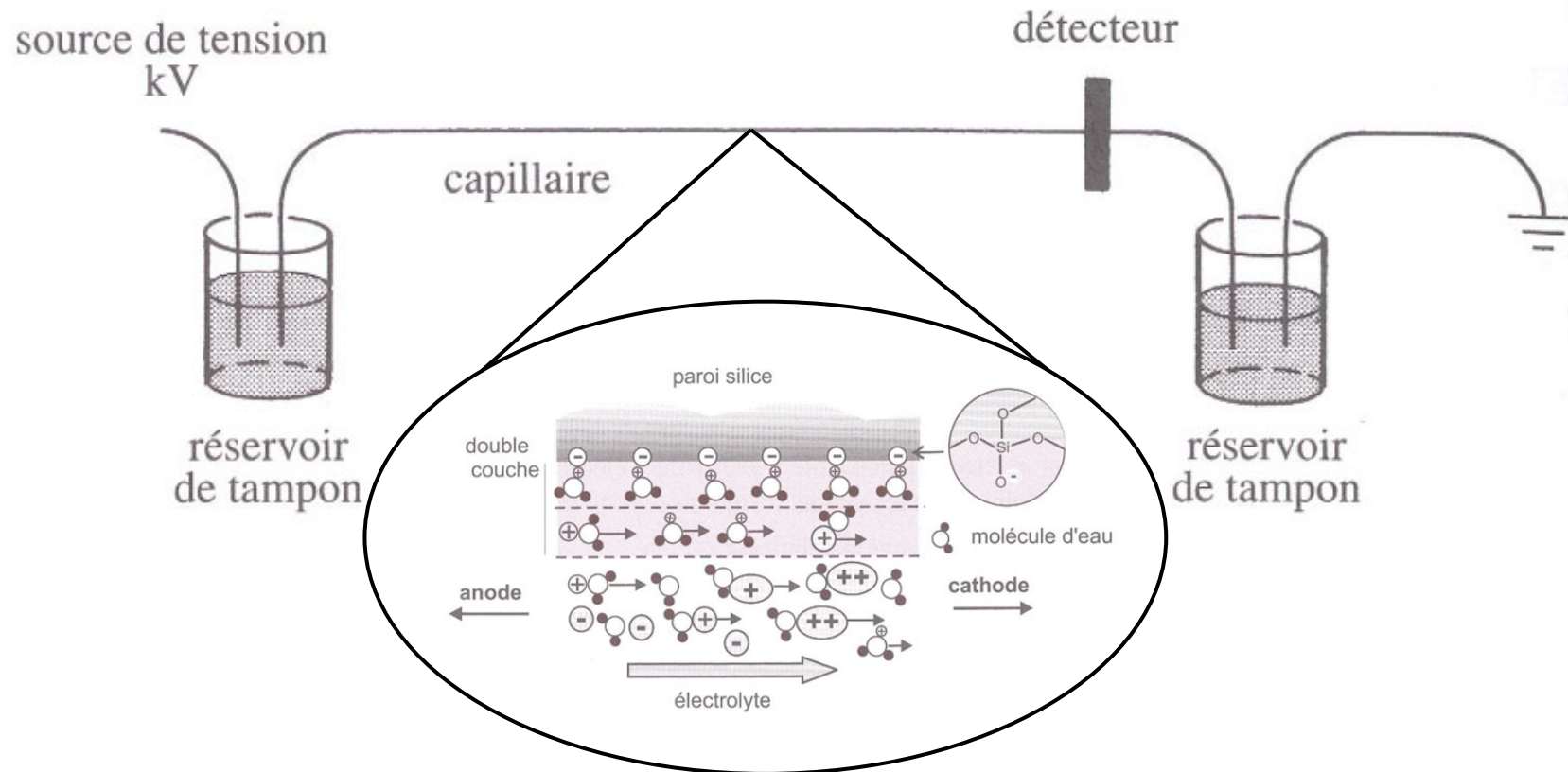
écoulement sous pression



écoulement sous champs électrique

- ⇒ Lorsque l'éluant est mû à l'aide d'un champ électrique, on observe une meilleure homogénéité de distribution de la vitesse du fluide par rapport à un écoulement induit par une pression.

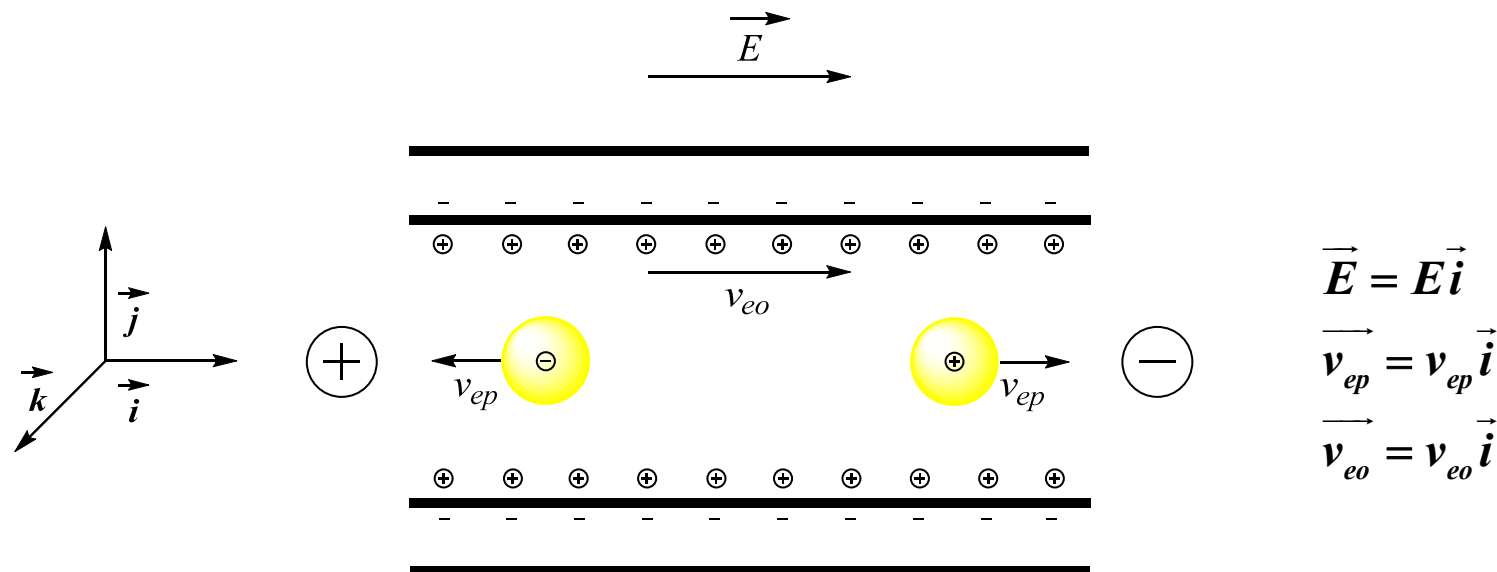
⇒ Prenons par exemple un capillaire de silice non modifié:



⇒ La paroi chargée du capillaire génère le phénomène d'électroosmose. Si le pH du tampon est supérieur à 2, alors le capillaire de silice présente des groupes SiOH et SiO^- .

↪ Les groupes SiO^- attirent les cations du tampon qui génèrent une charge positive à la surface du capillaire de silice, il y a apparition d'une mobilité électroosmotique: μ_{eo} .

⇒ La mobilité électroosmotique engendre une vitesse de migration électroosmotique \vec{v}_{eo} à la surface des parois qui produit le déplacement du tampon du réservoir anodique vers le réservoir cathodique:



↪ La migration des solutés anioniques ou cationiques (jaune sur le schéma) résulte de la combinaison des vitesses électrophorétique et électroosmotique.

⇒ La vitesse de migration électroosmotique \vec{v}_{eo} est reliée à la mobilité électroosmotique μ_{eo} et au champ électrique \vec{E} :

$$\vec{v}_{eo} = \mu_{eo} \vec{E}$$

⇒ En exprimant la vitesse de migration électroosmotique \vec{v}_{eo} en fonction des vecteurs de base \vec{i} , \vec{j} , et \vec{k} , on obtient:

$$\vec{v}_{eo} = v_{eo} \vec{i} = \mu_{eo} E \vec{i}$$

$$v_{eo} = \mu_{eo} E = \frac{\varepsilon \zeta \Delta V}{4\pi \eta L}$$

v_{eo} : vitesse de migration électroosmotique ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)

μ_{eo} : mobilité électroosmotique ($\text{m}^2\cdot\text{v}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)

E : Champ électrique ($\text{V}\cdot\text{m}^{-1}$)

ε : permittivité du solvant ($\text{F}\cdot\text{m}^{-1} = \text{kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{v}^{-1}\cdot\text{s}^{-2}$)

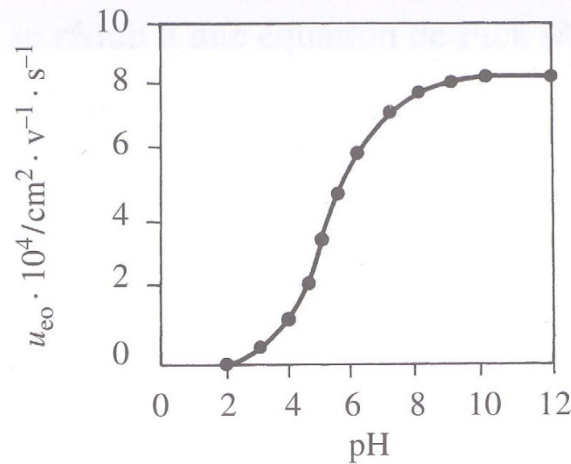
ζ : potentiel zéta (V)

ΔV : différence de potentiel appliquée (V)

η : viscosité dynamique ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)

L : longueur du capillaire (m)

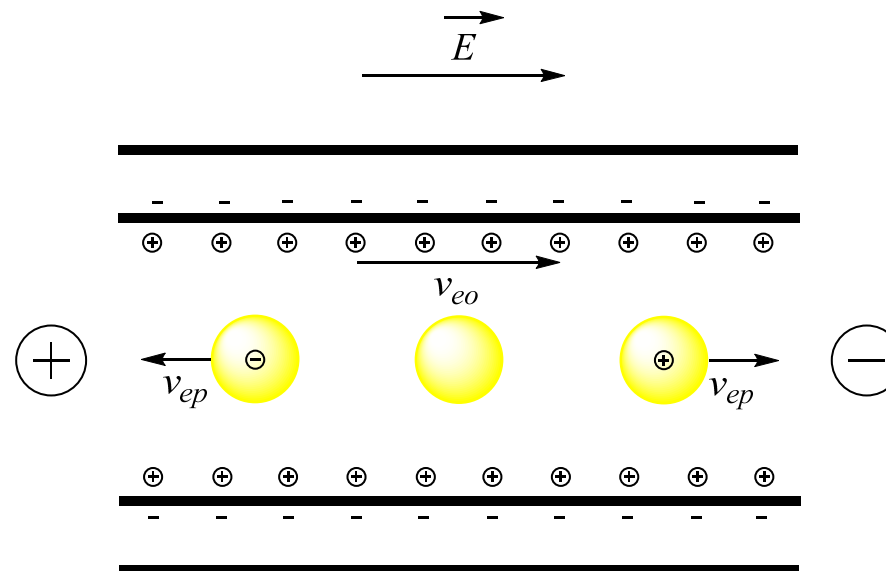
⇒ La mobilité électroosmotique dépend du pH du tampon qui influence la charge de surface du capillaire de silice.



⇒ La vitesse de migration d'un soluté correspond à la somme vectorielle des vitesses des migrations électrophorétiques et électroosmotiques:

$$\vec{v}_m = \vec{v}_{ep} + \vec{v}_{eo}$$

⇒ En reprenant le cas d'un capillaire de silice non modifié, on aura alors:



$$v_{m(+)} = v_{eo} + v_{ep} \Rightarrow v_{m(+)} > v_{eo}$$

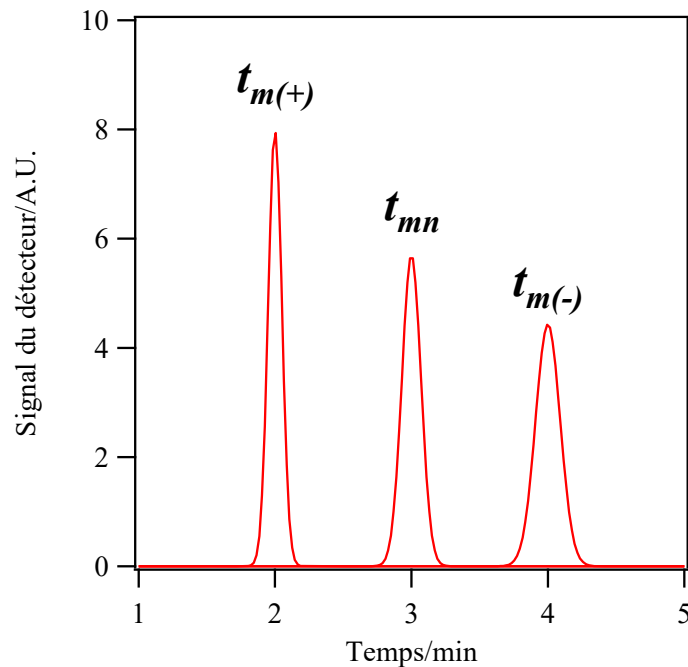
$$v_{m(0)} = v_{eo}$$

$$v_{m(-)} = v_{eo} + v_{ep} \Rightarrow v_{m(-)} < v_{eo}$$

⇒ Comme la valeur de la vitesse de migration électroosmotique est très souvent supérieure à la vitesse de migration électrophorétique, on observe une vitesse de migration faible pour les anions, une vitesse de migration élevée pour les cations et une vitesse de migration médiane pour les espèces neutres.

⇒ Dans tous les cas de figures, les anions migrent quand même vers la cathode mais avec une vitesse plus faible que le flux électroosmotique.

⇒ Un appareil d'électrophorèse capillaire donne un électrophérogramme en temps où les temps de rétentions chromatographiques sont remplacés par des temps de migration:



⇒ t_{mn} , $t_{m(-)}$ et $t_{m(+)}$ représentent: le temps de migration d'une espèce neutre, le temps de migration brut d'un anion et le temps de migration brut d'un cation respectivement.

⇒ Comme le temps de migration brut peut être plus petit que le temps de migration neutre, on ne peut définir ni de temps de migration net, ni de facteur de sélectivité k' car ces deux grandeurs pourraient être négatives.

Grandeurs électrophorétiques

⇒ *Mobilité électroosmotique*

↪ On peut expérimentalement accéder au temps de migration d'une espèce neutre en utilisant une espèce chimique neutre détectable par le détecteur employé. Dans le cas d'un détecteur UV-Vis, on utilise une molécule organique polaire qui ne s'ionise pas au pH du tampon utilisé: acétone, oxyde de mésityle ou alcool benzylique.

↪ Le marqueur neutre permet de déterminer la mobilité électroosmotique à partir de t_{mn} et de la longueur effective du capillaire l :

$$v_{eo} = \frac{l}{t_{mn}}$$

↪ La longueur effective du capillaire l représente la distance qui sépare le détecteur de l'extrémité du capillaire où l'échantillon est injecté. On pourra alors exprimer la norme de la vitesse électroosmotique comme:

$$v_{eo} = \frac{l}{t_{mn}} = \mu_{eo} \frac{\Delta V}{L} \quad \text{avec} \quad E = \Delta V / L$$

⇒ On peut finalement accéder à la valeur de la mobilité électroosmotique à partir des paramètres connus:

$$\mu_{eo} = v_{eo} \frac{L}{\Delta V} = \frac{lL}{t_{mn} \Delta V}$$

⇒ *Mobilité électrophorétique et temps de migration*

⇒ On peut exprimer la vitesse de migration d'un soluté J en fonction des paramètres connus:

$$v_{m(J)} = v_{eo} + v_{ep(J)} = \left(\mu_{eo} + \mu_{ep(J)} \right) \frac{\Delta V}{L}$$

⇒ La vitesse de migration d'un soluté J peut être déterminée à l'aide du temps de migration de ce dernier:

$$v_{m(J)} = \frac{l}{t_{m(J)}} = \left(\mu_{eo} + \mu_{ep(J)} \right) \frac{\Delta V}{L}$$

↪ On peut finalement exprimer le temps de migration du soluté J à partir des paramètres connus:

$$t_{m(J)} = \frac{lL}{\left(\mu_{eo} + \mu_{ep(J)}\right)\Delta V}$$

↪ Basé sur cette dernière équation, pour diminuer le temps d'analyse, c'est-à-dire diminuer les temps de migration des soluté à séparer on peut diminuer la longueur du capillaire, augmenter la tension d'électrophorèse ou augmenter le flux électroosmotique.

↪ En définissant la mobilité apparente comme:

$$\mu_{ap(J)} = \mu_{eo} + \mu_{ep(J)}$$

↪ On obtient finalement:

$$t_{m(J)} = \frac{lL}{\mu_{ap(J)}\Delta V}$$

⇒ *Nombre de plateaux théoriques et HEPT*

⇒ Comme pour la chromatographie, à mesure qu'un soluté J migre dans le capillaire, il occupe une zone qui s'élargit. Cette dispersion linéaire est repérée par la variance. La variance est reliée à la HEPT $H_{(J)}$ et à la distance effective du capillaire l , tel que:

$$\sigma_{(J)}^2(l) = H_{(J)}l = 2D_{(J)}t_{m(J)}$$

⇒ Dans cette équation $D_{(J)}$ correspond au coefficient de diffusion du soluté J dans le tampon. La HEPT $H_{(J)}$ est alors:

$$H_{(J)} = \frac{2D_{(J)}t_{m(J)}}{l}$$

⇒ Le nombre de plateaux théoriques $N_{(J)}$ est exprimé comme suit:

$$H_{(J)} = \frac{l}{N_{(J)}} \Rightarrow N_{(J)} = \frac{l}{H_{(J)}} = \frac{l^2}{2D_{(J)}t_{m(J)}}$$

↪ En exprimant cette équation en fonction des paramètres physiques, on aura:

$$N_{(J)} = \frac{l^2}{2D_{(J)}t_{m(J)}} = \frac{l^2}{2D_{(J)}\left(\frac{lL}{\mu_{ap(J)}\Delta V}\right)} = \frac{\mu_{ap(J)}l\Delta V}{2D_{(J)}L}$$

⇒ *Facteur de sélectivité α*

↪ Le facteur de sélectivité $\alpha_{(1,2)}$, avec $t_{m(2)} > t_{m(1)}$ est défini comme:

$$\alpha_{(1,2)} = \frac{t_{m(2)}}{t_{m(1)}} = \frac{lL/\mu_{ap(2)}\Delta V}{lL/\mu_{ap(1)}\Delta V} = \frac{\mu_{ap(1)}}{\mu_{ap(2)}}$$

⇒ **Résolution R_s**

↪ La résolution $R_{s(1,2)}$ entre deux pics consécutifs est donnée par:

$$R_{s(1,2)} = \frac{2(t_{m(2)} - t_{m(1)})}{w_{(1)} + w_{(2)}}$$

$$t_{m(2)} - t_{m(1)} = \frac{lL}{\Delta V} \left(\frac{\mu_{ap(1)} - \mu_{ap(2)}}{\mu_{ap(1)}\mu_{ap(2)}} \right)$$

$$w_{(1)} = 4\sigma_{(1)} = 4\sqrt{2D_{(1)}t_{m(1)}} = 4\sqrt{\frac{2D_{(1)}lL}{\mu_{ap(1)}\Delta V}} \quad \text{et} \quad w_{(2)} = 4\sqrt{\frac{2D_{(2)}lL}{\mu_{ap(2)}\Delta V}}$$

$$R_{s(1,2)} = \frac{\mu_{ap(1)} - \mu_{ap(2)}}{\mu_{ap(2)}\sqrt{\mu_{ap(1)}} + \mu_{ap(1)}\sqrt{\mu_{ap(2)}}} \sqrt{\frac{lL}{8\bar{D}\Delta V}}$$

Éluant

⇒ Les éluants sont des tampons obtenus à partir de couples acide-base organiques ou inorganiques. Il n'est pas nécessaire de les dégazer comme pour la chromatographie en phase liquide car le mouvement de l'éluant dans le capillaire ne résulte pas d'une compression.

Tension

⇒ Les tensions appliquées sont de l'ordre de 20 à 40 kV, en général 30 kV. On peut atteindre des champs électriques de l'ordre de $600 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$ mais l'intensité ne doit pas dépasser une centaine de microampères afin que la puissance ne dépasse pas 3 W.

↪ Une puissance appliquée trop grande engendrera un effet joule non négligeable qui échauffera le tampon et générera une convection thermique qui diminuera l'efficacité de la séparation à travers l'augmentation du coefficient de diffusion des solutés séparés.

Modes d'injection

⇒ plusieurs modes d'injection sont disponibles sur les appareils commerciaux.

⇒ L'injection sous pression consiste à placer l'échantillon dans un réservoir sous pression. Le capillaire pénètre dans le réservoir et l'échantillon est injecté par différence de pression entre le réservoir et le capillaire. La quantité injectée peut être estimée par le flux volumique entrant dans le capillaire:

$$F_V = \frac{\Delta P \pi r^4}{8 \eta L} \quad \text{et} \quad V_{inj} = F_V t_{inj}$$

⇒ Le volume injecté V_{inj} dépend du flux volumique F_V et du temps d'injection t_{inj} . Le flux volumique dépend de la viscosité du tampon, de la différence de pression appliquée ainsi que du rayon et de la longueur du capillaire.

⇒ L'injection électrocinétique consiste à plonger le capillaire dans le réservoir où se trouve l'échantillon et à appliquer une tension aux bornes du capillaire pour que l'échantillon pénètre dans ce dernier par électroosmose.

⇒ Ce mode d'injection a tendance à injecter une quantité plus importante de cations que d'espèces neutres ou que d'anions, en lien directe avec les signes des mobilités électrophorétiques des solutés et de la mobilité électroosmotique. Dès lors, l'échantillon analysé n'est peut être pas totalement représentatif de celui d'origine, ce qui nécessite une attention particulière.

Le capillaire: caractéristiques physiques

⇒ Les capillaires sont en silice fondue ultra pure, recouvert de polyimide. Les capillaires font entre 30 à 100 cm de long et possèdent un diamètre interne de 50 à 100 μm et un diamètre externe de 200 à 400 μm .

Le capillaire: l'éluant

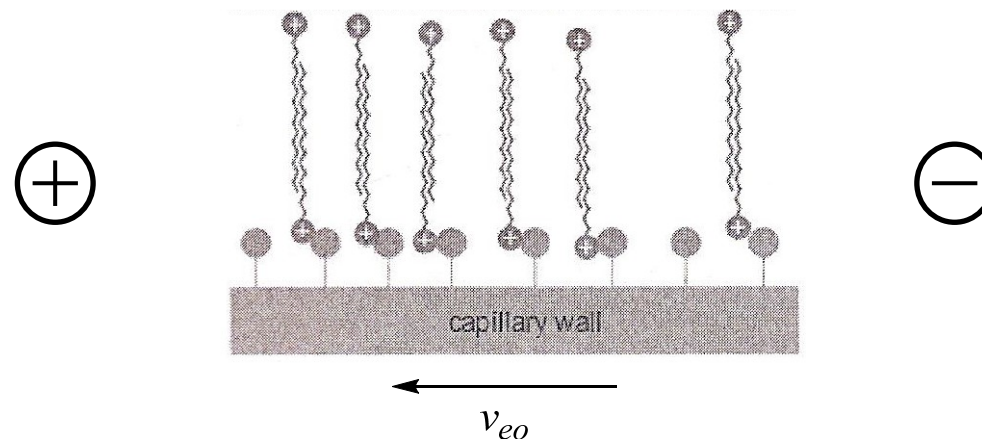
⇒ L'éluant est un tampon issu d'un couple acide-base conjugué organique (imidazole, MES, HEPES...) ou inorganique (borax, phosphate...). On peut parfois utiliser aussi des solutions d'acides forts ou de bases fortes diluées (HCl, NaOH...). La nature du tampon doit être choisie en fonction de la nature des solutés à séparer et en fonction du détecteur à disposition.

⇒ En ce qui concerne la nature des solutés à séparer, il s'agit principalement d'imposer un pH où les solutés sont chargés. On peut aussi choisir aussi un tampon permettant de favoriser des interactions soluté-tampon spécifiques permettant une meilleure séparation.

⇒ En ce qui concerne la nature du détecteur utilisé, si l'on travaille avec un détecteur UV-Vis, on peut par exemple, dans le cas où l'on sépare des ions alcalins ou alcalino-terreux avoir recours à un tampon qui absorbe fortement dans l'UV-Vis (imidazole...). Le signal des ions sera négatif.

Le capillaire: modifications chimiques

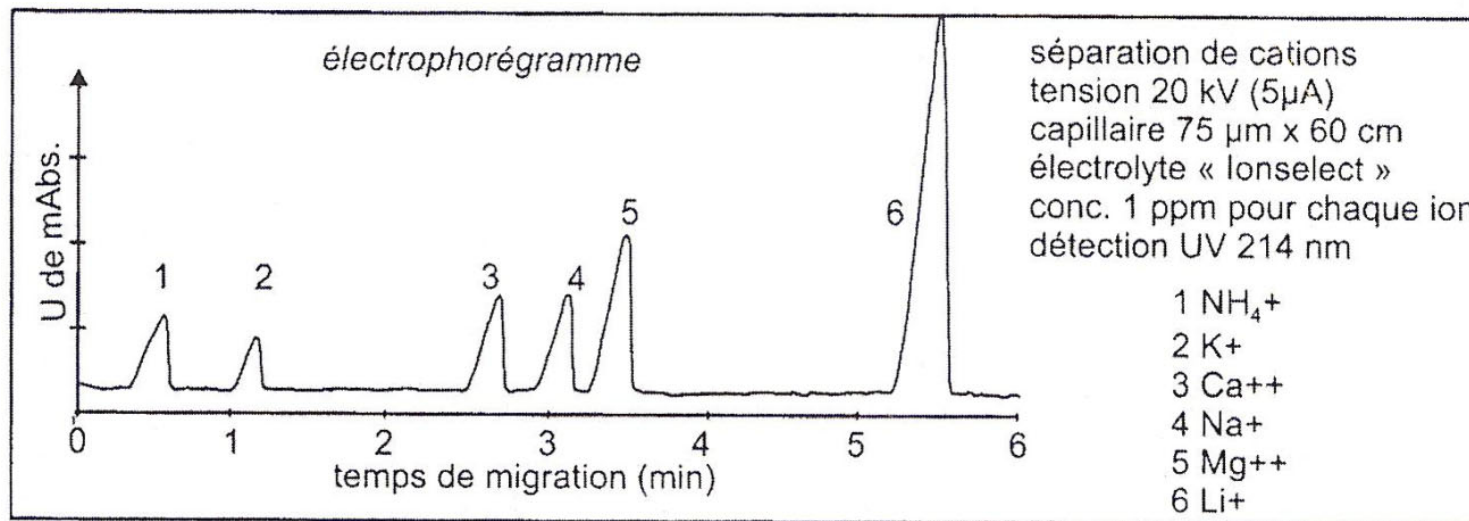
- ⇒ Le capillaire est en général utilisé sans modification chimique, il est négativement chargé pour une gamme de pH allant de 4 à 9. Au-delà de pH 9, la silice se solubiliserait fortement.
- ⇒ Pour diminuer ou modifier le flux électroosmotique, des polymères anioniques, cationiques ou neutres peuvent être utilisés comme agents de modification de surface du capillaire de silice.
- ⇒ On peut citer comme agents de modification: le polyéthylène glycole, le polyacrylamide, le polysiloxane sulfonique, le polysiloxane ammonium...



La nature des solutés

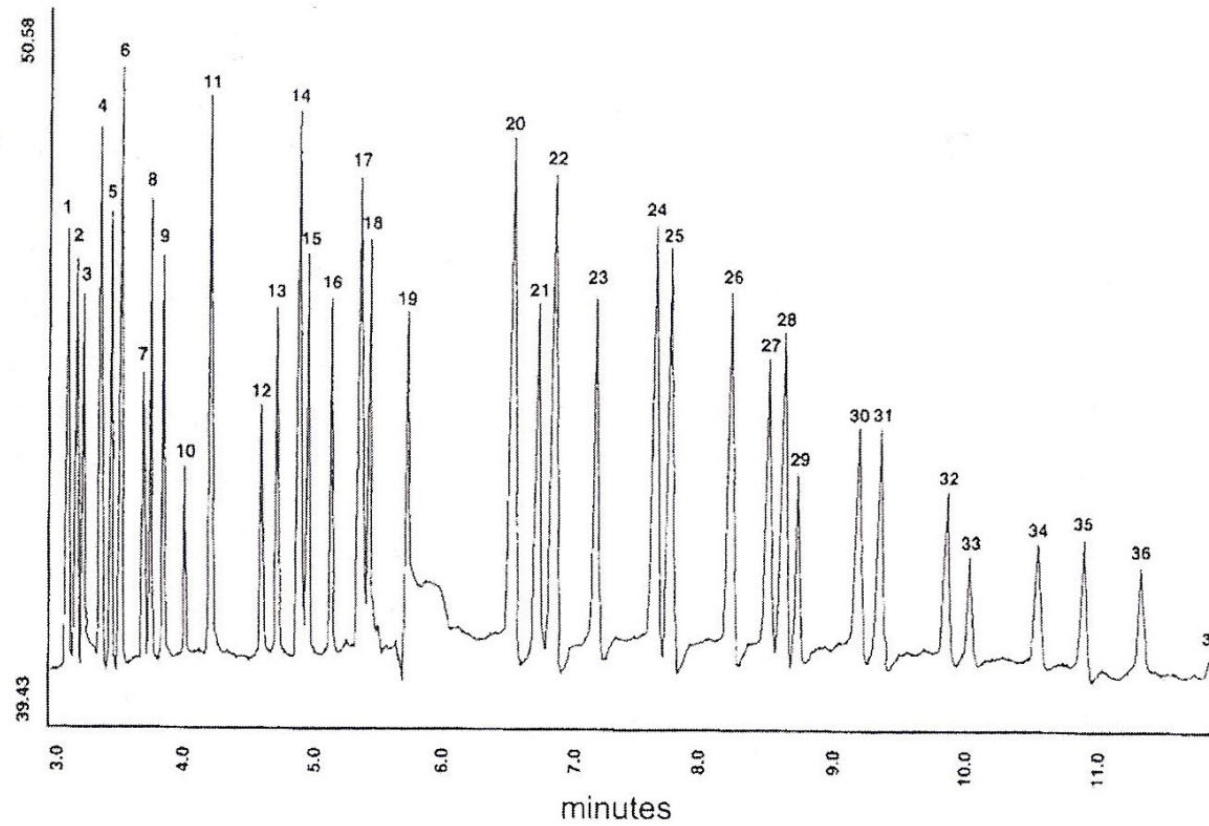
⇒ Les solutés séparables sont naturellement chargés dans la solution tampon utilisée. On choisit alors la solution tampon en fonction de son pouvoir solvant vis-à-vis des solutés à séparer et du pH à atteindre pour assurer que les solutés soient totalement ioniques.

⇒ On peut ainsi séparer des ions minéraux et organiques.

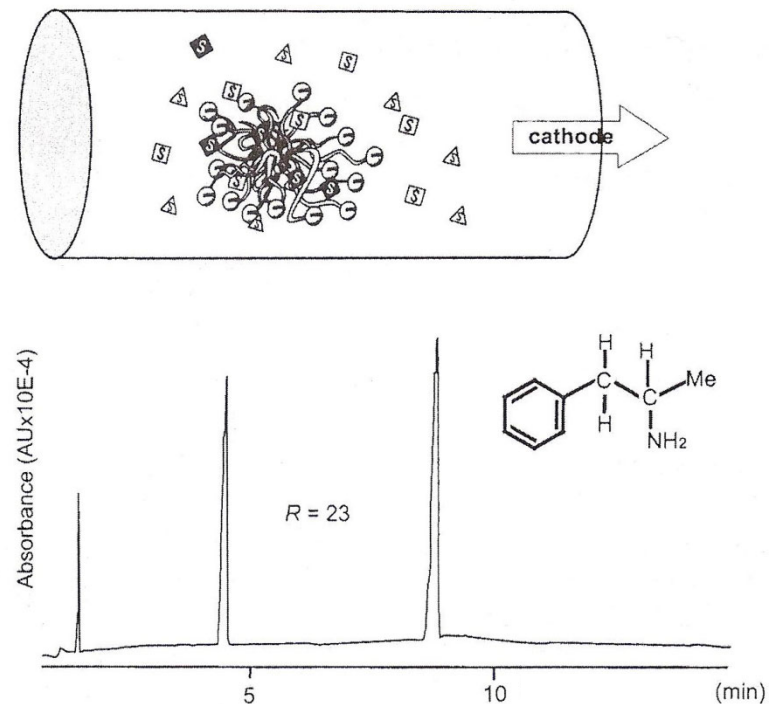


anions :

- 1 bromure
- 2 chlorure
- 3 ferrocyanure
- 4 nitrite
- 5 nitrate
- 6 sulfate
- 7 azoture
- 8 oxalate
- 9 molybdate
- 10 tungstate
- 12 fluorure
- 13 tartrate
- 16 phosphate
- 17 citraconate
- 19 carbonate
- 20 acetate
- 24 propionate
- 26 crotonate
- 28 butyrate
- 31 valérate
- 33 caproate
- 37 gluconate



- ⇒ On peut aussi séparer des solutés neutres en les encapsulant dans des micelles.
- ⇒ On parle alors de d'électrophorèse capillaire électrocinétique micellaire (MEKC).



- ⇒ La MEKC est une alternative intéressante pour l'analyse des constituants des sodas car ce mode de séparation est peu sensible aux sucres contenus dans ces boissons, ce qui n'est pas le cas des méthodes chromatographiques.

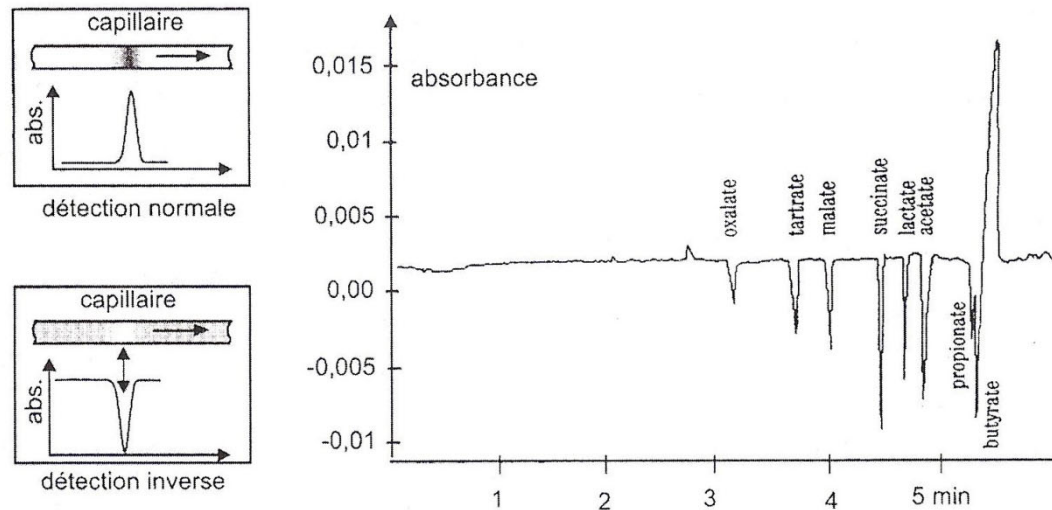
Détecteurs

⇒ Les principaux détecteurs sont les suivants:

| Type | Response | Noise level | C_N $g\ cm^{-3}$ | Linear range | Flow cell volume, μl |
|-----------------------|------------|----------------------------|-----------------------|-----------------|---------------------------|
| Uv-visible absorption | selective | 10^{-4} au | 10^{-8} | 10^4 - 10^5 | 1-8 |
| Fluorescence | selective | 10^{-7} au | 10^{-12} | 10^3 - 10^4 | 8-25 |
| Conductivity | selective | 10^{-2} $\mu S\ cm^{-1}$ | 10^{-7} | 10^3 - 10^4 | 1-5 |
| Amperometric | selective | 0.1 nA | 10^{-10} | 10^4 - 10^5 | 0.5-5 |
| Refractive index | universal* | 10^{-7} riu | 10^{-6} | 10^3 - 10^4 | 5-15 |

⇒ Les détecteurs UV-Vis et par fluorescence sont des détecteurs pour lesquels la cellule de détection est le capillaire lui-même. On enlève une partie de la gaine en polyimide qui entoure le capillaire à l'endroit où l'on veut faire la détection. le faisceau lumineux passe à travers le capillaire, la détection se fait à une distance inférieure (l) à la longueur du capillaire (L). Il n'y a pas, pour ces modes de détection, de perte de résolution due au volume de cellule de détection car il ne s'agit pas d'une détection post-séparation. On appellera cette technique "on-capillary detection".

- ⇒ Les autres détecteurs fonctionnent comme des détecteurs post-séparation comme c'est le cas pour les séparations chromatographiques.
- ⇒ D'autres détections post-séparation comme des couplages avec un spectromètre de masse (CE/MS), un spectrophotomètre infrarouge (CE/FTIR), un spectromètre RMN (CE/RMN), un analyseur minéral (ICP-MS, ICP-OES, FAAS...), un polarimètre sont envisageables.
- ⇒ On procède rarement à la dérivatisation chimique des solutés pour les rendre détectables. Par exemple, avec un détecteur UV-Vis, si les solutés ne sont pas UV-Vis actifs, on utilise un tampon qui absorbe dans l'UV-Vis et la détection est une détection négative:



Evolution de l'électrophorèse capillaire

⇒ *Electrochromatographie*

⇒ En associant l'électromigration des ions et les phénomènes de partage liés à la chromatographie, l'électrochromatographie a été développée.

⇒ Le capillaire est garni de particules de phase stationnaire HPLC dont le diamètre varie de 1 à 3 μm . Il s'agit de phases stationnaires à base de silice ou de PS-DVB. Les phases stationnaires peuvent être normales ou inverses.

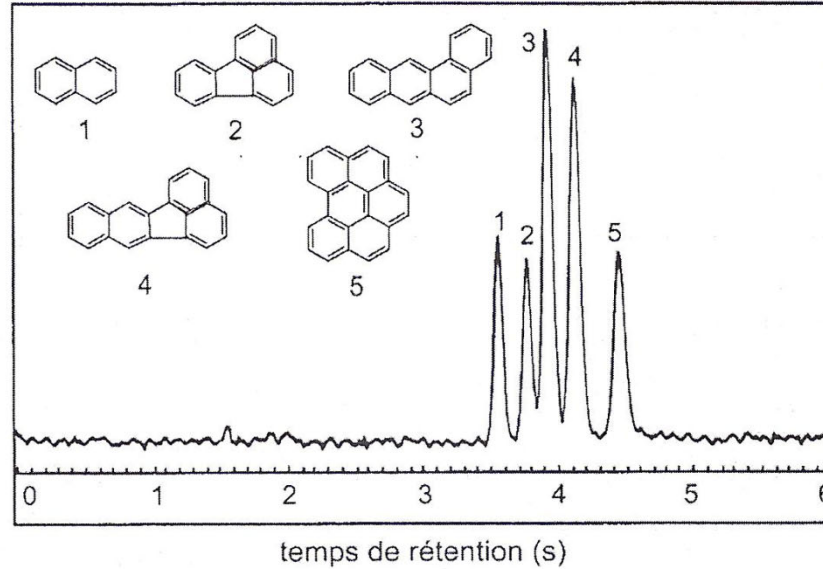
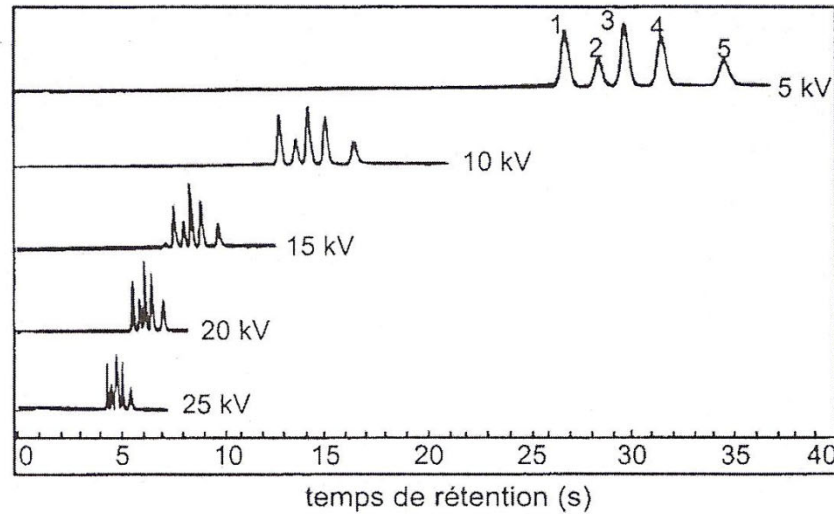
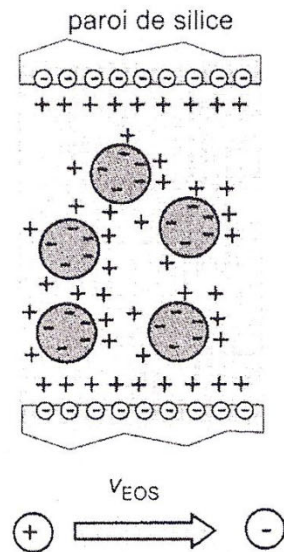
⇒ La phase stationnaire ne doit pas écranter totalement la surface du capillaire de silice pour maintenir le flux électroosmotique responsable de l'avancement de l'éluant dans le capillaire soumis à un champs électrique.

⇒ En électrochromatographie, il n'y a pas de perte de charge (loi de Darcy) comme c'est le cas en chromatographie classique. Le profil d'écoulement dans le capillaire réduit fortement l'hétérogénéité de flux au sein de l'unité de séparation.

⇒ Un changement de composition de l'éluant intervient à la fois sur le flux électroosmotique et sur la sélectivité qui reste très élevée par rapport à la chromatographie classique.

Electrophorèse capillaire

colonne L = 10 cm
l = 6,5 cm ; diam. 100 μm
silice 1,5 μm ODS
ddp : voir figure
mélange :
1 - naphthalène
2 - fluoranthène
3 - benz[a]anthracène
4 - benzo[k]fluoranthène
5 - benzo[ghi]perylène
détecteur fluorimétrique



⇒ *Electrophorèse sur microchips*

↪ L'électrophorèse est réalisée dans un micro-canal gravé dans du verre ou dans une matrice polymère.

↪ Il s'agit d'une séparation qui s'effectue sur quelques centimètres seulement. L'analyse est rapide et ne nécessite qu'un très faible volume de tampon.

↪ Un exemple de séparation de Li^+ , Na^+ et K^+ sur microchip en PET avec une détection conductimétrique:

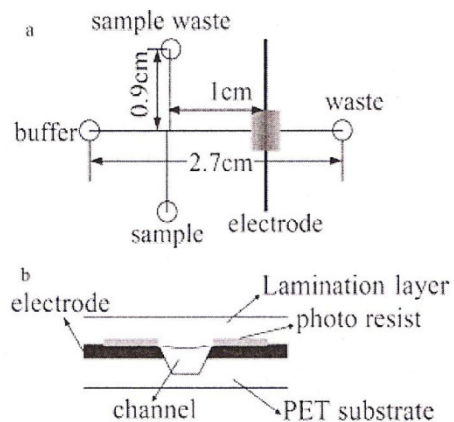


Figure 1. Scheme (a) of the top view of microchip and (b) the cross-section at the detector position. Two 0.9 cm long side channels (vertical) feature a double-T for injection purpose, two face-to-face microelectrodes are perpendicularly located at the end of the main separation channel.

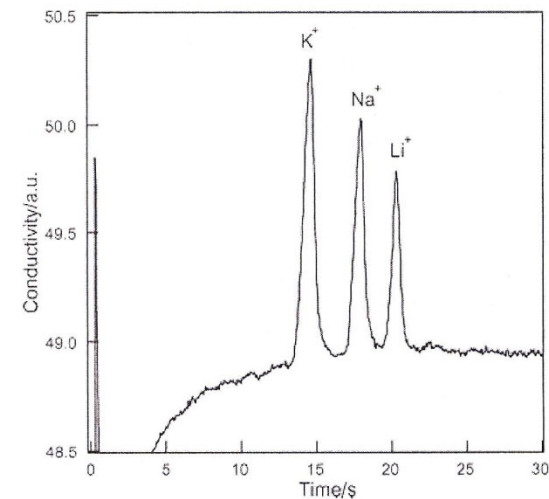


Figure 2. Electropherogram of ions. Channel dimension, 50 μm wide, 40 μm deep, and with 4.5 cm effective separation length; sample, 1 mM K^+ , Li^+ , and Na^+ , injected at 500 V for 25 s and separated at an electrical field of 308 V/cm; BGE, 20 mM MES/His, pH at 6.