

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	P _{K_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

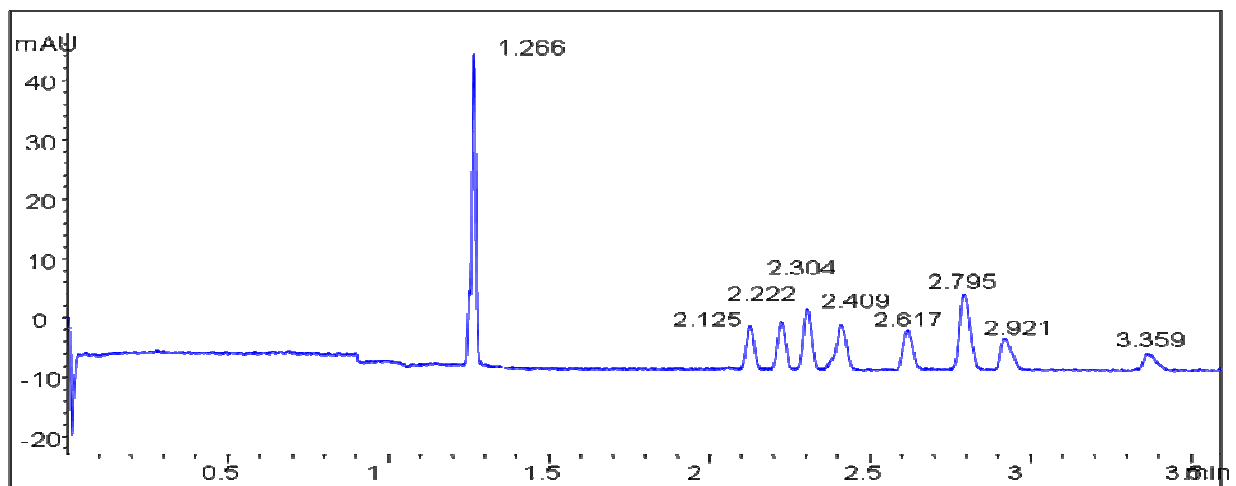


Fig 1 : Conditions générales, injection hydrodynamique 30mbar, 3s

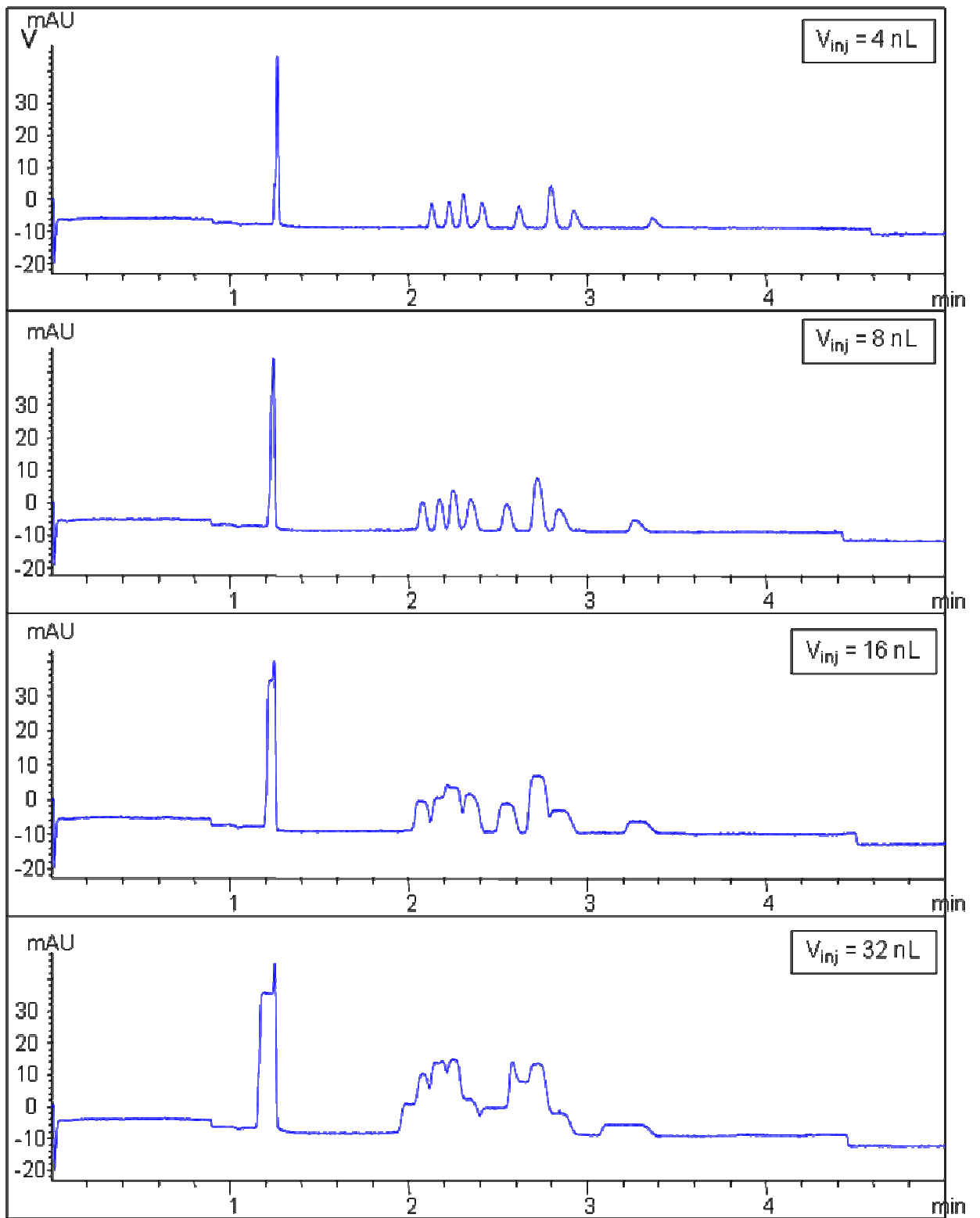


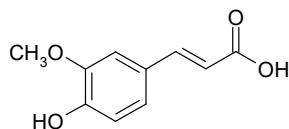
Fig 2 : Influence du volume injecté

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?

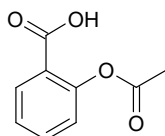
ANNEXE

Formule chimique des composés

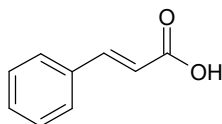
Acide Férulique



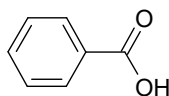
Acide Acétylsalicylique



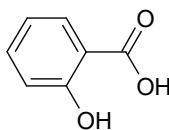
Acide Cinnamique



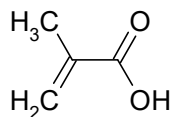
Acide Benzoïque



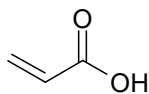
Acide Salicylique



Acide Méthacrylique



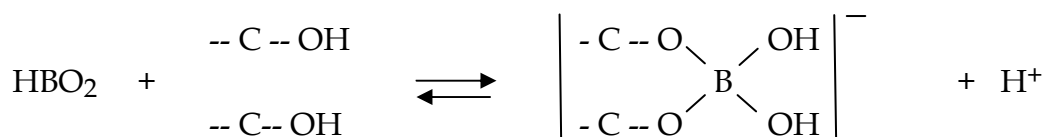
Acide Acrylique



II

SEPARATION DE CATECHOLS ET DE CATECHOLAMINES PAR ELECTROPHORESE ET CHROMATOGRAPHIE ELECTROCINETIQUE 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 :



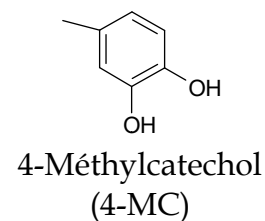
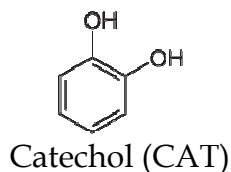
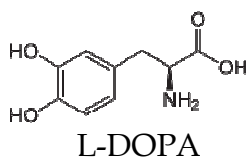
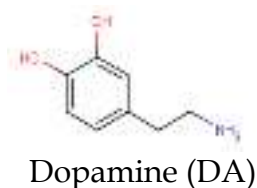
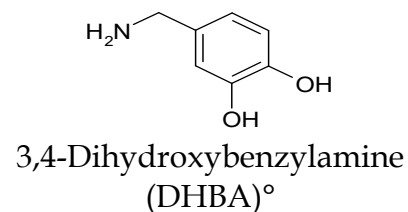
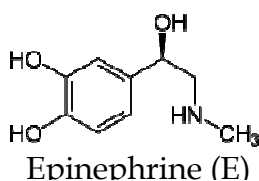
Quelle(s) explication(s) complémentaire(s) fournissent les résultats donnés figure 3 ?

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



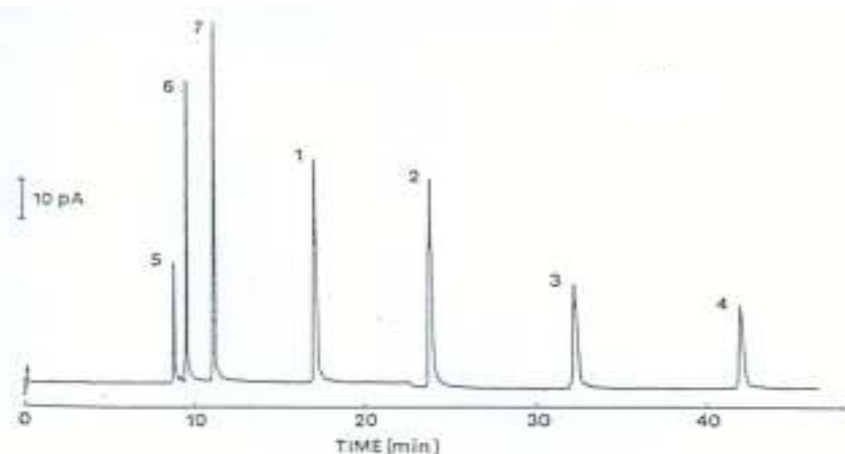
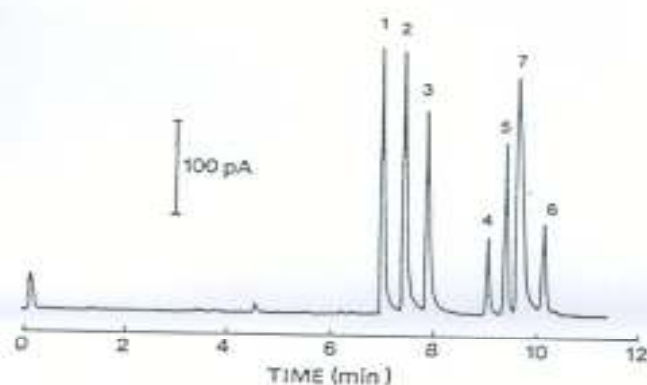


Fig. 1. Elektrokinetic separation of non-ionic and cationic catechols (see Table 1 for peak identification); 5 *mM* dibasic sodium phosphate-5 *mM* monobasic sodium phosphate at pH 7 with 20 *mM* SDS; separation capillary length, 66.5 cm; detection capillary length, 1.6 cm; separation potential, 20 kV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

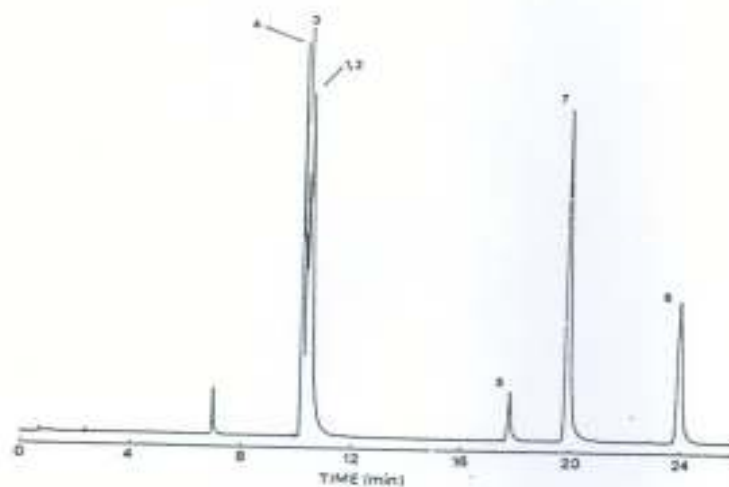


Fig. 3. Electropherogram of catechols in borate buffer: 10 *mM* dibasic sodium phosphate-25 *mM* sodium borate at pH 7; separation capillary, 68.1 cm; detection capillary, 1.7 cm; separation potential, 20 kV (12 μ A); injection, 2 s at 20 kV.

CORRIGE TD I

Tampon Phosphate pH 7 sans SDS :

Etat de charge des composés :

L-DOPA : $-\text{CH}(\text{NH}_3^+)-\text{COO}^-$ donc neutre

CAT et MC neutres

NE, N, DHBA, DA

Noyau comme CAT + chaîne latérale avec amine donc **protonée totalement**

Charge +1

Tampon avec 20 mM SDS >CMC (8 mM) donc **MEKC**

Séparation des neutres entre eux par interaction hydrophobes

Micelle anionique donc séparation des chargés +1 par interaction électrostatique et hydrophobe

Incidence de la charge sur l'ordre de sortie

t_m neutre < t_m chargé +1

Normal car les chargés +1 interagissent avec les micelles anioniques donc plus retenus

Pour les neutres : Interactions hydrophobes

Séparation suivant l'hydrophobie croissante donc **indice de Rekker**

$\log P_{\text{octanol/eau}} = \sum f_i$ donc décomposer la molécule en différent morceaux

Plus le log P augmente, plus la molécule est hydrophobe.

Partie commune du catéchol $\log P_0$

$$\begin{aligned} \text{L-DOPA} : \log P &= \log P_0 + f_{\text{CH}_2} + f_{\text{CH}} + f_{\text{COOH}} + f_{\text{NH}_2} \\ &= \log P_0 + 0,530 + 0,235 - 0,954 - 1,428 \\ &= \log P_0 - 1,62 \end{aligned}$$

$$\text{CAT} : \log P = \log P_0$$

$$\text{MC} : \log P = \log P_0 + 0,702$$

$$\text{NE} : \log P = \log P_0 - 2,15$$

$$\text{E} : \log P = \log P_0 - 1,85$$

$$\text{DHBA} : \log P = \log P_0 - 0,9$$

$$\text{DA} : \log P = \log P_0 - 0,37$$

Ordre attendu

En résumé, priorité à la charge globale et ensuite hydrophobicité.

Tampon phosphate - borate pH 7 avec SDS :

Ordre modifié et tr bien diminuée.

Changement de charge :

Composés 1 - 4 sont devenus neutre et composés 5 - 7 chargé négativement

Inversion des familles.

1 - 4 : Hydrophobie rentre en jeu, plus d'interaction électrostatique.

5 - 7 : Plus d'attraction électrostatique (répulsion avec les micelles donc pas d'inclusion)

1 - 2 - 3 - 4 : ordre d'hydrophobie (Rekker) donc ordre attendu

5 - 7 - 6 : composés chargés, se séparent par différence de mobilité (taille)

Tampon borate pH 7 sans SDS :

On attend :

- Absence de séparation des composés neutres 1 - 4
- Séparation des 3 autres comme précédemment (taille)

Séparation 5 - 7 - 6 :

On a bien $CAT < MC < L-DOPA$ par différence de taille

Rappel : Mode contre-électroosmotique donc les plus mobiles sont détectés en dernier

Séparation 1 - 4 :

Ils sont neutres donc ne doivent pas être séparés mais on les distingue un peu.

Complexation non total dans le borate donc amorce de séparation (4 puis 3 puis 2 puis 1).

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 μ m 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.

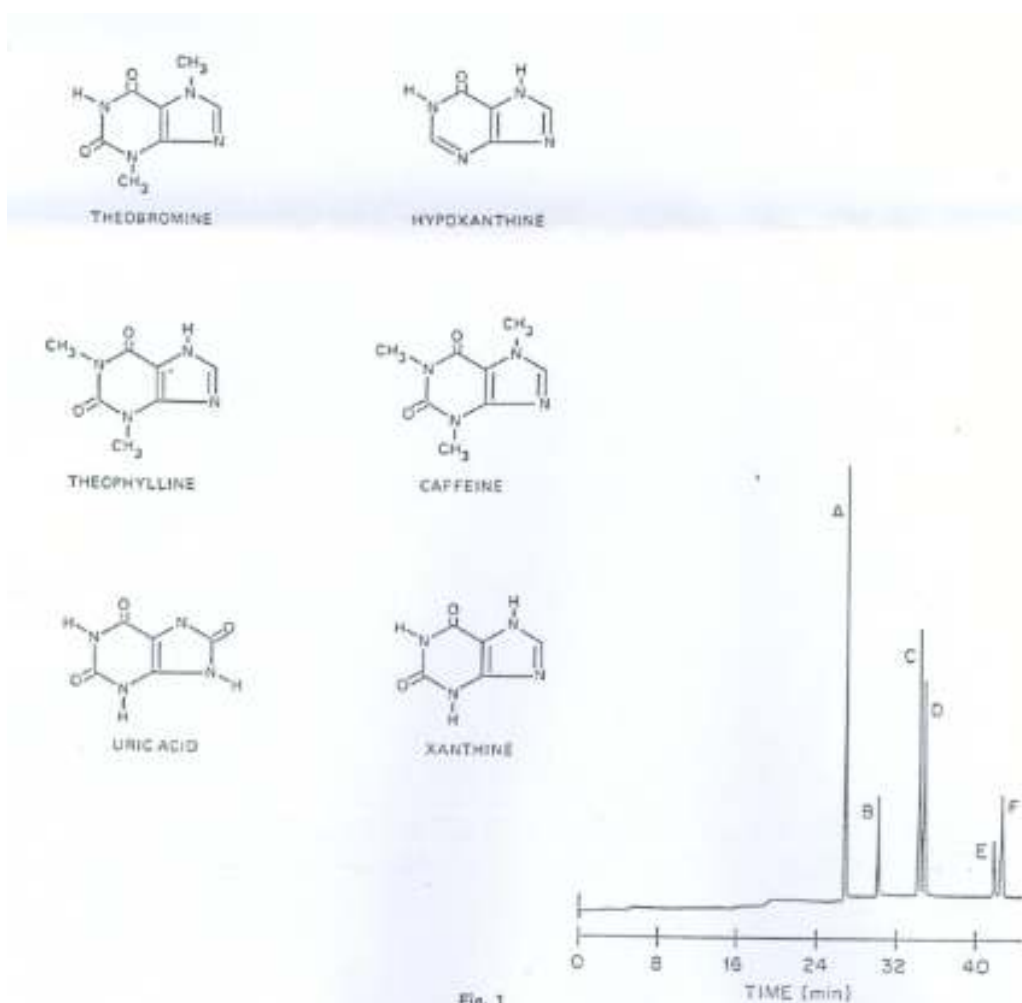
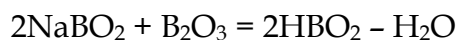


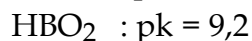
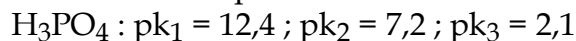
Fig. 1

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

CORRIGE TD II

1.

Calcul du pH de l'électrolyte :

On sait que : $2\text{NaBO}_2 + \text{B}_2\text{O}_3 = 2\text{HBO}_2 - \text{H}_2\text{O}$

Mélange acido-basique donc l'effet tampon vient du $\text{Na}_2\text{H}_2\text{B}_2\text{O}_7$

$$\text{pH} = \text{pKa} = 9,21$$

2.a.

On néglige la protonation des purines dans l'eau.

Donc deux cas, couple HA/A^- , et $\text{H}_2\text{A}/\text{HA}^-/\text{A}^{2-}$, et caféine neutre.

Monoacide :

$$n \text{ (charge apparente)} = \frac{[\text{A}^-]}{([\text{A}^-] + [\text{HA}])} = \frac{1}{(1 + [\text{HA}]/[\text{A}^-])} = \frac{1}{(1 + [\text{H}^+]/k_1)}$$

$$\text{avec } k_1 = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

on peut déterminer $n = f(\text{pH})$

Diacide :

$$n = \frac{[\text{HA}^-] + 2[\text{A}^{2-}]}{([\text{A}^{2-}] + [\text{HA}^-] + [\text{H}_2\text{A}])}$$

comprise entre 0 et 2 car peut être dichargé.

$$\text{avec } k_1 = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^{2-}]}{[\text{HA}^-]}$$

$$\text{avec } k_2 = \frac{[\text{H}^+][\text{AH}^-]}{[\text{H}_2\text{A}]}$$

$$\text{avec } k_1 k_2 = \frac{[\text{H}^+]^2[\text{A}^{2-}]}{[\text{H}_2\text{A}]}$$

Donc en multipliant par le rapport $[\text{H}^+]^2/[\text{H}_2\text{A}]$, on obtient :

$$n = \frac{(k_2[\text{H}^+] + 2k_1 k_2)}{([\text{H}^+]^2 + k_2[\text{H}^+] + k_1 k_2)}$$

$$\text{A : } n = 0,14$$

$$\text{B : } n = 0,67$$

$$\text{C : } n = 0,8$$

$$\text{D : } n = 0$$

$$\text{E : } n = 1,05$$

$$\text{F : } n = 1,00$$

2.b.

Ordre de migration :

Les micelles sont anioniques donc chargées négativement

Les composés sont chargés négativement aussi

Donc les micelles ne peuvent pas apporter grand-chose à la séparation.

Séparation électrophorétique suivant la différence de charge et de taille des molécules.

Les masses sont très proches (136 à 180) donc à priori la charge a plus d'importance que la masse.

Pour les composés A, B et C :

A pH 9,2, le composé C est le plus chargé et le composé A le moins chargé (car $pK = 8,6$)

Donc comme on est en mode contre électroosmotique, les anions sortent du moins mobile au plus mobile

Donc A - B - C

Composé D :

Neutre donc sort normalement en premier avec le flux EOF, mais il peut être solubilisé dans les micelles et donc sortir avec un temps de rétention. Donc en retard.

Sans SDS, le composé D sort avec le flux EOF.

Composé E - F :

Inversion par rapport à la charge apparente (1,05 pour E et 1,00 pour F)

La différence de n est très faible (0,05). Toute approximation a donc une grande importance.

Ceci peut s'expliquer par une approximation sur la valeur des pK .

Du coup, il faut prendre la masse de la molécule en compte.

E + lourd que F

Donc compromis entre les deux et dans ce cas, c'est la masse qui « gagne ».