

TD N°5 : Electrophorèse Capillaire

Exercice 1 :

1-Le flux électrophorétique au quelle est soumise une molécule chargée, est caractérisé par la mobilité électrophorétique μ_e . Rappeler l'expression de μ_e en fonction de la vitesse v et de la valeur du champ électrique E :

2-Rappeler les principaux facteurs influençant la mobilité électrophorétique.

3- Le flux électro-osmotique est une particularité de l'électrophorèse capillaire. En quoi consiste-t-il ? Rappeler l'équilibre chimique qui a lieu entre les groupements silanol portés par les parois internes du capillaire et l'eau du tampon.

4- Comment varie l'intensité du flux électro-osmotique, donc la mobilité électro-osmotique μ_{eo} en fonction du pH ?

5- Lors d'une électrophorèse capillaire, la molécule chargée est donc soumise aux deux flux cités précédemment. Donner la relation entre la mobilité apparente μ_{app} , et les mobilité électro-osmotique μ_{eo} et électrophorétique μ_e :

Exercice 2 :

On considère une installation d'électrophorèse capillaire comportant un capillaire de verre de silice non-traitée, à « paroi négative », de $L_t = 1$ m de longueur totale et de $L_d = 90$ cm de longueur utile (jusqu'au détecteur). La différence de potentiel appliquée aux bornes du capillaire est de 20 kV. Le détecteur est situé vers l'extrémité cathodique du capillaire.

L'électrolyte est un milieu tampon de pH 5. Un composé présent dans l'échantillon a un temps de migration $t_M = 10$ min.

1- Calculer la mobilité électrophorétique apparente μ_{app} de ce composé.

2- Sachant qu'un marqueur neutre a un temps de migration de 5 min, en déduire la valeur du flux électro-osmotique μ_{EO} .

3- Calculer la mobilité électrophorétique μ_{EP} du composé. En déduire le signe de sa charge nette.

4- Que se passerait-il si on utilisait un capillaire à paroi traitée pour la rendre neutre ?

5- En supposant que le pI du composé soit de 4, quel sera le signe de sa charge nette si on abaisse le pH de l'électrolyte à 3 ?

6- Calculer N pour le composé étudié sachant que $D_m = 2 \times 10^{-5}$ cm²/s.

7- Connaissant la relation entre l'efficacité N et la diffusion D_m , expliquer pourquoi les petites molécules conduisent en électrophorèse capillaire à des séparations généralement moins bonnes que les grosses molécules, et pourquoi les séparations sont d'autant meilleures que le diamètre du capillaire est plus étroit.

Exercice 3 :

On utilise un tampon acide borique/borate de sodium (pH = 8,5) et on mesure le temps de migration de l'acide p-hydroxy benzoïque (pHB), de l'acide acétique phydroxyphenyl (pHP) et de l'oxyde de mésityl.

L'ordre de sortie des produits est le suivant : 1- oxyde de mésityl (espèce neutre) 2- Acide pHP (anion) 3- Acide pHB (anion) Avec une tension $U = 20000 \text{ V}$, une longueur de capillaire $L = 60 \text{ cm}$, et une longueur utile $l_u = 50 \text{ cm}$, on obtient les résultats suivants :

Espèces	Oxyde de mésityl	Acide pHP	Acide pHB
tm (min)	3,79	5,91	6,23

1- L'oxyde de mésityl permet de déterminer la valeur de la vitesse du flux électroosmotique était v_{eo} . Expliquer pourquoi et calculer sa valeur en $\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$.

2- En déduire la valeur de la mobilité électro-osmotique.

Vous donnerez le résultat en $\text{m}^2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$.

3- Déterminer les mobilités électrophorétiques de l'acide pHP et de l'acide pHB. Vous donnerez les résultats en $\text{m}^2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$.

4- On cherche à voir l'influence du pH du tampon, pour cela, on effectue ici les mêmes mesures qu'auparavant mais avec un tampon à $\text{pH} = 6$, et on obtient les résultats suivants :

Espèces	Oxyde de mésityl	Acide pHP	Acide pHB
tm (min) à $\text{pH} = 8.5$	3,79	5,91	6,23
tm (min) à $\text{pH} = 6$	4.37	13.77	15.20

Analyser le tableau en expliquant les différences observées. D'autre part, le pic de l'acide pHB est dédoublé, fournir une explication.

5- On cherche à voir l'influence de la concentration en électrolyte utilisé (on utilise ici de l'acétate de sodium), pour cela, on effectue ici les mesures à $\text{pH} = 8,5$ mais avec différentes concentrations, et on obtient les résultats suivants :

Espèces	Oxyde de mésityl	Acide pHP	Acide pHB
tm (min) à 5 mmol/l	3,17	4.68	4.90
tm (min) à 20 mmol/l	3.90	8.70	10.60
tm (min) à 60 mmol/l	4.30	12.20	16.40

Analyser le tableau en précisant quelle est la situation la plus idéale et pourquoi. Que peut-il se passer si on diminue encore la concentration de l'électrolyte ?

On cherche à voir l'influence de tension appliquée aux bornes du capillaire, pour cela, on effectue ici les mesures à $\text{pH} = 8,5$ mais avec différentes tensions, et on obtient les résultats suivants :

Espèces	Oxyde de mésityl	Acide pHP	Acide pHB
tm (min) à 20 KV	3,79	5.91	6.23
tm (min) à 25 KV	2.95	4.55	4.80
tm (min) à 30 KV	2.42	3.75	3.95