

## Méthodes électrophorétiques – UE : VIII Sciences analytiques

<b>Semaine</b> : n°1 (du 07/09/15 au 11/09/15) <b>Date</b> : 08/09/2015	<b>Heure</b> : de 14h00 à 15h00	<b>Professeur</b> : Pr. VACCHER
<b>Binôme</b> : B10		<b>Correcteur</b> : B12
<b>Remarques du professeur</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Certaines planches ne sont pas dans le poly mais elles ne font pas partie du cours</li> <li>• Il y aura des ED sur ce cours certainement au mois de novembre</li> <li>• Respecter les unités demandées dans les questions pour apprendre à les manipuler et à les maîtriser</li> <li>• Attention à respecter la nomenclature</li> </ul>		

### PLAN DU COURS

#### I) Introduction, généralités

- A) *Analyse immédiate*
- B) *Analyse élémentaire*
- C) *Analyse fonctionnelle*

#### II) Étude théorique du déplacement électrophorétique

##### A) Définition

- 1) *Méthodes électrophorétiques – principe*
- 2) *Électrophorèse*
- 3) *Ionophorèse*
- 4) *Ionisation*

##### B) Origine des charges

##### C) Classification (2e type de classification)

##### D) Phénomène de transport

- 1) *Deux phénomènes de transport*

##### MIGRATION ÉLECTROPHORÉTIQUE

##### PHÉNOMÈNE D'ÉLECTROENDOSMOSE

- 2) *Deux phénomènes parasites = phénomènes secondaires*

##### CONVECTION = EFFET JOULES

##### DIFFUSION MOLÉCULAIRE (LOI DE FICK)

- 3) *Electromigration*

##### EXPÉRIENCE

##### BILAN

##### DEFINITION

##### BILAN

- 4) *Electroendosmose*

##### EXPÉRIENCE

##### MÉCANISME

## I) Introduction, généralités

En ce qui concerne les méthodes analytiques, quand on a un échantillon, il faut adopter une certaine démarche. On travaille en trois étapes.

### A) Analyse immédiate

C'est la première étape. Il s'agit de **séparer** l'ensemble des composés de l'échantillon pour obtenir des corps purs.

L'objectif est de purifier les différents composés du mélange à l'aide de méthodes séparatives.

**Un corps pur** = composé de matière organique et minérale, de formule donnée qui présente des propriétés physiques et chimiques caractéristiques de ce composé.

### B) Analyse élémentaire

C'est la deuxième étape. On **identifie** les corps purs. L'objectif est de déterminer leur **formule brute** c'est à dire de caractériser les différents éléments atomiques qui caractérisent le corps pur.

On obtient alors deux informations :

- l'analyse élémentaire c'est à dire le pourcentage des différents éléments atomiques,
- la masse moléculaire du corps pur.

### C) Analyse fonctionnelle

C'est la troisième étape. Il s'agit de **caractériser** les fonctions physico-chimiques de ce corps pur. On obtient la **formule développée** du corps pur.

Il va y avoir deux grandes stratégies :

- **Les méthodes chimiques = la chimie des solutions** : réactions acide base, réactions de précipitation, réactions de complexation qui sont caractéristiques de ce corps pur et qui, en fonction des fonctions du corps pur, réagissent d'une certaine façon
- **Les méthodes physiques** : en particulier les méthodes optiques spectrales (*polarimétrie pour caractériser les molécules chirales*) et non spectrales (*spectroscopie atomique, spectroscopie moléculaire : UV-visible, infrarouge, spectrofluorescence, RMN*)

On va donc voir trois grands chapitres de méthodes séparatives avec le Pr. Vaccher :

- Extraction :
  - Liquide/liquide quand on a deux solvants non miscibles ou pour un solide  
*par exemple quand on fait de la synthèse organique et qu'on veut purifier un produit de synthèse*
  - Osmose / Dialyse pour un solvant miscible
- Méthodes chromatographiques : méthodes les plus utilisées
- Méthodes électrophorétiques

## II) Étude théorique du déplacement électrophorétique

### A) Définition

#### 1) Méthodes électrophorétiques – Principe

Ce sont des méthodes de séparation qui reposent sur des concepts :

- La **différence de vitesse de migration / de mobilité** (c'est celui qui court le plus vite qui arrive le premier au détecteur, inversement le plus lent arrivera en dernier). L'objectif est de séparer les différents concurrents.  
Au contraire, en chromatographie, toutes les molécules de l'échantillon se déplacent à la **même vitesse**.
- On va séparer des molécules chargées électriquement, c'est à dire des **ions**.  
L'inconvénient est qu'on ne pourra pas séparer les molécules neutres que l'on va détecter avec un seul

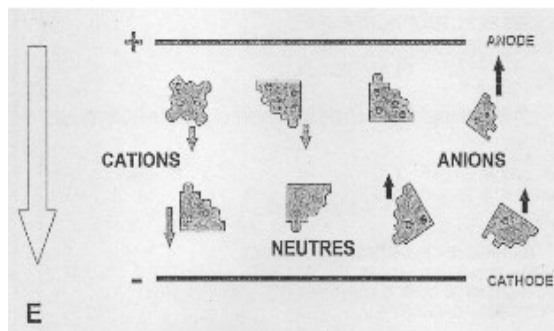
signal. Mais on peut contourner ce problème et séparer des molécules neutres.

Ces particules chargées sont placées dans une solution d'**électrolytes** = milieu liquide, souvent une solution aqueuse, qui est placée sur un support (*une feuille de papier par exemple*) ou dans un support (*dans un tube*).

**Cette solution d'électrolyte aura un certain pH que l'on maîtrise et impose. Le pH peut être constant, ou dans d'autres techniques, il peut être variable.**

- En chromatographie, on pousse les solvants à l'aide d'une pompe. Ici, le moteur est un champ électrique. On applique une **différence de potentiel** aux bornes du support à l'aide d'électrodes.

*Ex : en TP au laboratoire l'appareil fonctionne sous 30 kVolts*



On voit le support sur lequel on applique un champ électrique entre une anode et une cathode. Le champ va de l'anode à la cathode.

Les **anions** se déplacent vers l'**anode** et les **cations** vers la **cathode**. Les molécules neutres restent stables dans le milieu.

On va pouvoir travailler non pas sur des ions monochargés, mais avec des entités qui sont polychargées.

*On a ici un cation avec deux charges positives, un anion avec deux charges négatives.*

On peut aussi avoir des molécules plus complexes, doublement chargées positives mais avec une charge négative. Elle est donc globalement chargée positivement et sera entraînée vers la cathode.

De la même manière, on a une entité avec deux charges positives et deux charges négatives, c'est ce que l'on appelle des zwitterion. Elle n'est globalement pas chargée et ne va pas se déplacer dans le milieu.

On va classer ces méthodes selon des critères. On peut tout d'abord faire un classement en fonction de la nature des particules (1er type de classification) :

## 2) **Electrophorèse**

C'est une méthode utilisée pour les principes actifs, les particules colloïdales, les micelles, les macromolécules...

On obtient ce genre d'électrophérogramme. On sépare environ 20 composés en 20 minutes par électrophorèse capillaire donc ce sont des méthodes importantes.

## 3) **Ionophorèse**

L'ionophorèse s'intéresse aux ions de petites tailles tels que des cations métalliques (*sodium, potassium, calcium...*), ou des anions de petites tailles (*sulfate, halogénures, nitrate...*).

Sur cet électrophérogramme, on cherchait les ions présents dans l'eau minérale.

Par la suite, nous ne ferons plus la distinction entre ces deux techniques et nous parlerons de méthodes électrophorétiques.

#### 4) Ionisation

On peut séparer des **molécules ionisées** qui vont présenter des fonctions ionisées ou ionisables. Cette ionisation dépend de deux choses :

- **Structure du composé / ses fonctionnalités** (*groupement acide, groupement base qui vont pouvoir s'ioniser dans la solution d'électrolytes...*)
- **Milieu environnant :**

Si on a affaire à des acides et des bases fortes dans l'eau, ces composés seront toujours ionisés quelque soit le pH de la solution d'électrolytes.

Inversement si on a des acides et des bases faibles :

*Exemple ici d'un acide faible comme un ibuprofène, cette molécule présente un groupement carboxylique caractérisé par un pKa. En dessous de ce pKa, à un pH acide, la molécule est neutre. Au delà du pKa, en pH alcalin, la molécule va s'ioniser et sera sous la forme COO<sup>-</sup>.*

Pour nos principes actifs, en fonction du pH de l'électrolyte, les entités de l'échantillon seront non chargées ou chargées.

Très important car en fixant le pH, on fixe la nature des molécules et on pourra les séparer ou ne pas les séparer. Cela déterminera la structure de nos composés : chargés ou non chargés.

On va jouer sur la force ionique (paramètre important en électrophorèse capillaire).

Quand on aura un mélange, il y aura une réflexion à faire pour séparer les différents composés.

#### B) Origine des charges

B ORIGINE DES CHARGES	
<b>IONOPHORESE</b> (Masse Moléculaire FAIBLE)	Charge Q IONS COMPOSES IONISABLES
<b>ELECTROPHORESE</b> (Masse Moléculaire ELEVEE)	Point Isoionique Point Isoélectrique Potentiel électrocinétique MACROMOLECULES
<small>-Pour les macromolécules on ne mesure pas la charge mais le potentiel qui apparaît à la surface de cette macromolécule solvatée. C'est cette valeur qui intervient seule dans le mouvement électrophorétique. On le désigne par le potentiel électrocinétique. -Point isoionique: valeur de pH pour lequel le molécule est sous forme de zwitterion -Point isoélectrique: valeur de pH pour lequel il n'y a pas de migration électrophorétique</small>	
Solvant pur	Solution d'électrolyte
zeta $\zeta = \frac{Q}{r \cdot \epsilon}$	zeta' $\zeta' = \frac{\zeta}{1 + A \cdot r \cdot \sqrt{\pi}}$

Information que l'on peut retrouver dans certains ouvrages mais qu'il ne faut pas forcément retenir (pas de questions dessus).

C'est ce qu'on appelle le potentiel électrocinétique soit en ionophorèse soit en électrophorèse.

Ils tiennent compte de la charge, de la taille de la particule, du coefficient epsilon.

La force ionique intervient. En fonction de la force ionique, que l'on peut modifier, on va modifier le potentiel zeta de nos molécules.

Pour les petites molécules qui nous intéressent ce n'est pas très important. Ce sera plus important dans le domaine des macromolécules, protéines etc...

#### C) Classification (2ème type de classification)

On va pouvoir classer les méthodes et leurs nomenclatures en fonction du support :

- Si on a un **support plan** (*couche mince, papier, gel de protéines, gel synthétique...*), on parle d'**électrophorèse de zone** (EZ), de **focalisation isoélectrique** (IEF), d'**isotachophorèse** (ITP).

IEF et ITP font appel à des variations du pH ou de la différence de potentiel.

- Dans un **tube capillaire** (tube de silice).

Ce sont les mêmes tubes que ceux utilisés en chromatographie. Ils ont un diamètre intérieur compris entre

50 et 100 micromètres. Quelques centaines de micromètres de diamètre à l'intérieur. Tube de 50 cm de long.

On parle alors d'**électrophorèse capillaire de zone (EZ)**, d'**électrophorèse capillaire micellaire (MECC)** qui est la solution pour différencier les composés neutres grâce à des micelles, d'**électrophorèse capillaire sur gel (CGE)**.

Cette dernière est une électrophorèse de zone mais on rajoute un gel 3D qui va filtrer les différents constituants en fonction de leur taille. Ce gel a des pores calibrés qui permettent de séparer les différents constituants selon le mécanisme électrophorétique et en fonction de leur taille.

## D) Phénomènes de transport

### 1) *Deux phénomènes de transport*

Ils sont à l'origine de la séparation.

#### MIGRATION ÉLECTROPHORÉTIQUE

C'est un phénomène **sélectif**.

Il permet de **séparer** les composés.

#### PHÉNOMÈNE D'ÉLECTROENDOSMOSE

C'est un phénomène **non sélectif**. Il ne permet pas de séparer les composés.

Mais il va permettre de les **transporter** globalement. Concerne l'ensemble de ce qui est contenu dans/sur le support.

### 2) *Deux phénomènes parasites = phénomènes secondaires*

#### CONVECTION (EFFET JOULE)

On applique une différence de potentiel entre les électrodes.

$$\text{Loi de Joule : } Q = R.I^2.t$$

Si on fait passer un courant (I) dans un électrolyte qui a une certaine résistance (R) pendant un certain temps (t), on va dégager de la chaleur.

On aura alors un phénomène parasite appelé **convection** avec un phénomène de gradient, c'est à dire qu'on va évaporer localement l'électrolyte donc les concentrations vont changer au cours du temps.

#### DIFFUSION MOLÉCULAIRE (LOI DE FICK)

Ce sont les molécules qui doivent se frayer un chemin à travers les molécules d'électrolytes et diffuser dans ce milieu.

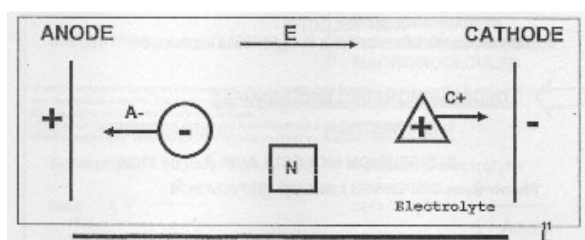
Cela dépend de leur taille.

### 3) *Electromigration*

C'est le premier phénomène de transport.

Elle est caractérisée par la mobilité électrophorétique  $\mu_e$ . Elle concerne toutes les **particules ionisées**. C'est un phénomène dispersif qui est à l'origine de la séparation.

#### EXPÉRIENCE

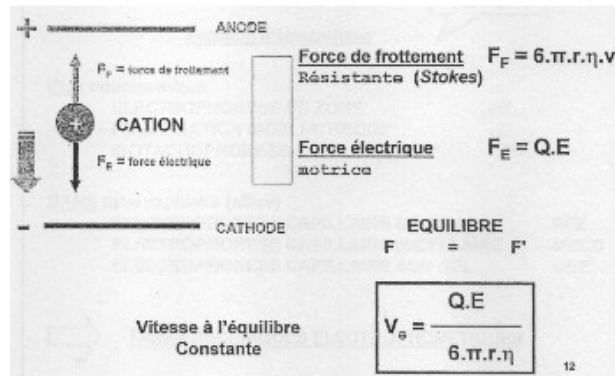


On a une anode, une cathode et le champ électrique qui va **de l'anode à la cathode**.

Il y a une certaine distance entre les électrodes que l'on appelle distance totale **L**.

Sur ou dans ce support, on positionne les électrolytes, la phase aqueuse avec le tampon pour fixer le pH. Les anions vont vers l'anode, les cations vers la cathode et les neutres restent au milieu du support.

**BILAN**



(On peut transposer ce bilan à un anion)

Le cation positif est entraîné vers la cathode sous l'action d'une force électrique motrice qui dépend du champ électrique et de la charge de la particule.

Mais nous sommes dans un milieu dense et aqueux. La particule, lorsqu'elle se déplace, est freinée par les particules environnantes (= **loi de Stokes**). C'est une force répulsive négative.

**Loi de Stokes :  $F_F = 6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta \cdot v_e$**

A un moment, ces deux forces vont s'équilibrer. Il n'y aura plus d'accélération et la particule va atteindre une certaine vitesse, une vitesse constante à l'équilibre. C'est à dire que la **force motrice sera égale à la force de Stokes**, on pourra donc calculer la **vitesse à l'équilibre  $v_e$** , la vitesse électrophorétique qui est égale à la charge multipliée par le champ et divisée par  $6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta$ .

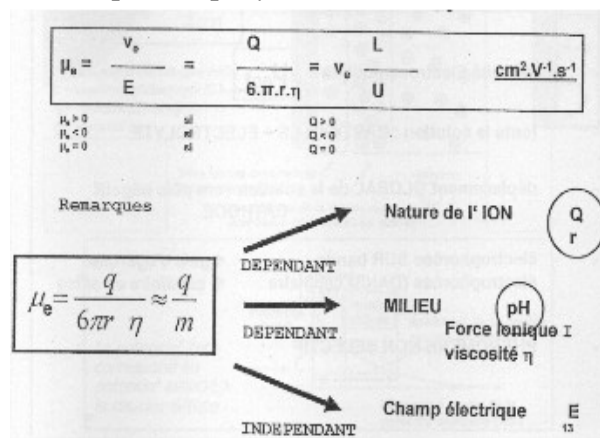
**$V_e = Q \cdot E / 6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta$**

$\eta$  étant la viscosité du milieu. Selon ce que l'on met dans le milieu, la viscosité varie.

→ Au plus la viscosité est grande, au plus la vitesse à l'équilibre diminue.

**DÉFINITION**

On va travailler avec la **mobilité électrophorétique  $\mu_e$** .



On s'en sert pour s'affranchir du champ électrique. Elle sera une caractéristique du composé car on s'affranchit des conditions opératoires. Il restera la charge, la viscosité et la taille de la particule.

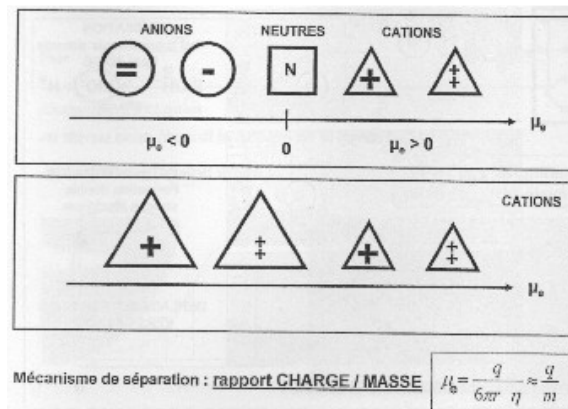
Ce sera en  **$cm^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$**

La mobilité électrophorétique va dépendre de la charge :



- Elle sera positive si la charge est positive.
- Négative si la charge est négative.
- Pour les molécules non chargées, elles auront une mobilité électrophorétique nulle.

## BILAN



La mobilité électrophorétique dépend :

- De la **nature de l'ion** c'est à dire sa **charge** et sa **taille** (son poids moléculaire). On pourra séparer les molécules en fonction de leur taille et de leur charge. Une petite molécule aura une vitesse plus importante qu'une grosse molécule chargée identiquement.
- Du **milieu** : pH, force ionique et viscosité du milieu.

**Elle est indépendante du champ électrique E.**

L'ensemble des particules neutres ne bouge pas.

Les cations auront une mobilité électrophorétique positive. Pour deux cations de même taille, le polychargé aura une vitesse électrophorétique plus grande qu'un monochargé.

→ Idem pour les anions.

Si on s'intéresse uniquement aux cations, on fait jouer le paramètre charge et la paramètre taille. On pourra séparer les molécules en fonction de leur taille et en fonction de leur charge.

### 4) Electroendosmose

On le caractérise par la **mobilité électroosmotique**  $\mu_{eof}$  (ou  $\mu_{eos}$ ).

**On s'intéresse à toute la solution, c'est à dire toutes les particules chargées et non chargées plus toutes les molécules de l'électrolyte.**

C'est un **déplacement global** de l'ensemble de la solution vers la cathode.

Cela intéresse l'électrophorèse sur support (gel d'agarose) mais aussi l'électrophorèse dans capillaire (capillaire de silice).

C'est un phénomène **non sélectif** qui ne permet pas de séparer les constituants mais qui va permettre un transport global vers la cathode.

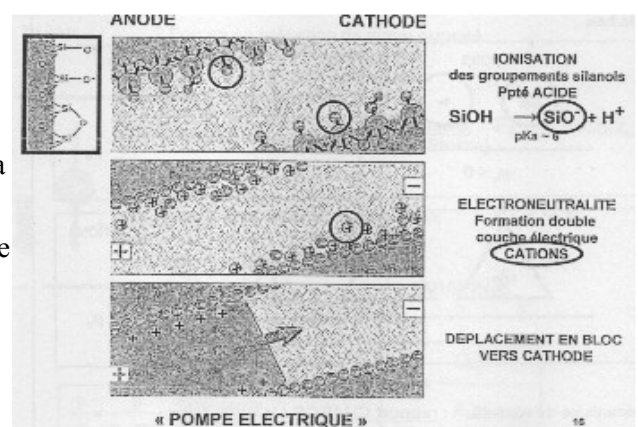
## EXÉPRIENCE

L'électrolyte est dans un tube de silice.

La silice est un groupement SiOH. C'est un acide faible qui aura tendance à s'ioniser sous forme de groupement  $\text{SiO}^- + \text{H}^+$ .

Selon le pH qui sera imposé à l'électrolyte, un certain nombre de groupements vont s'ioniser ou pas.

- Si on est à un pH acide ou très acide, aucun ne va s'ioniser.



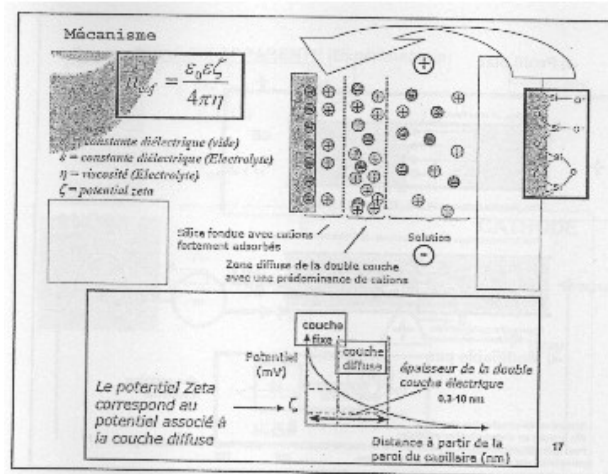
- Si on est à un pH alcalin ou très alcalin (au delà de  $pK_a = 6$ ) tous les silanol seront ionisés sous la forme  $SiO^-$ .

Au contact de ces groupements silanol ionisés vont venir se positionner des cations qui sont présents dans l'électrolyte. Il s'établit sur les parois internes du capillaire une couche électrique de cations (double couche).

Sur la paroi interne du capillaire on a des couches polyanioniques de  $SiO^-$  qui sont fixes mais où vont venir se positionner une couche de cations mobiles.

Il y aura donc un bloc positif qui va se déplacer vers le pôle négatif, vers la cathode. Cela ressemble à un tapis roulant. On appelle ça une pompe électrique. Toutes les molécules seront emportées par le flux et toutes avec la **même vitesse** donc pas de séparation.

## MÉCANISME



On peut calculer le flux, la mobilité électroosmotique en fonction d'un certain nombre de paramètres mais il n'est pas nécessaire de retenir cette formule. Cela dépend de la viscosité, des coefficients epsilon, du potentiel zeta non pas des particules mais de la paroi du capillaire.