

# Électrophorèse capillaire

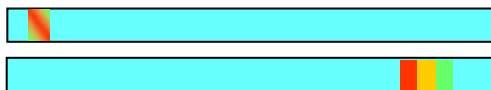
## □ Mode de séparation – vue d'ensemble

*En solution libre (CZE)*



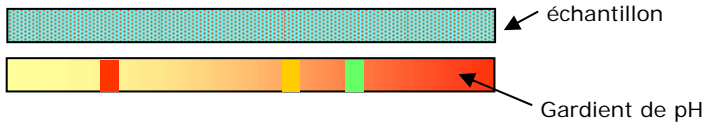
- Mobilité libre dans une solution électrolyte
- Rapport charge/masse

*Isotachophorèse (CITP)*



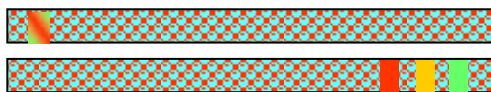
- Différence de conductivité
- Bandes adjacentes de même vitesse

*Séparation par pI (CIEF)*



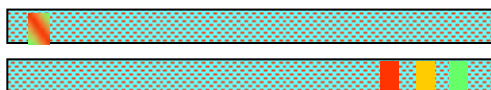
- Différence de pI
- Bandes focalisées à leur pI nécessite mobilisation.

*EC avec gel (CGE)*



- Différence de  $M_r$ , tamisage moléculaire
- Dénaturation des protéines

*EC en milieu micellaire (MEKC)*



- Interaction avec micelle ou additifs en solution
- Séparation basée sur différences de partage

# Électrophorèse capillaire

---

- En solution libre – sélectivité et utilisation d'additifs

*Choix du tampon doit considérer:*

- Bonne capacité de tampon pour le pH d'intérêt
- Faible absorbance à la longueur d'onde utilisée
- Faible mobilité (minimiser haut courant)
- pH
- Agent chiral
- Solvant organique
- Modification de la paroi du capillaire

# Électrophorèse capillaire

- En solution libre – tampons utilisés

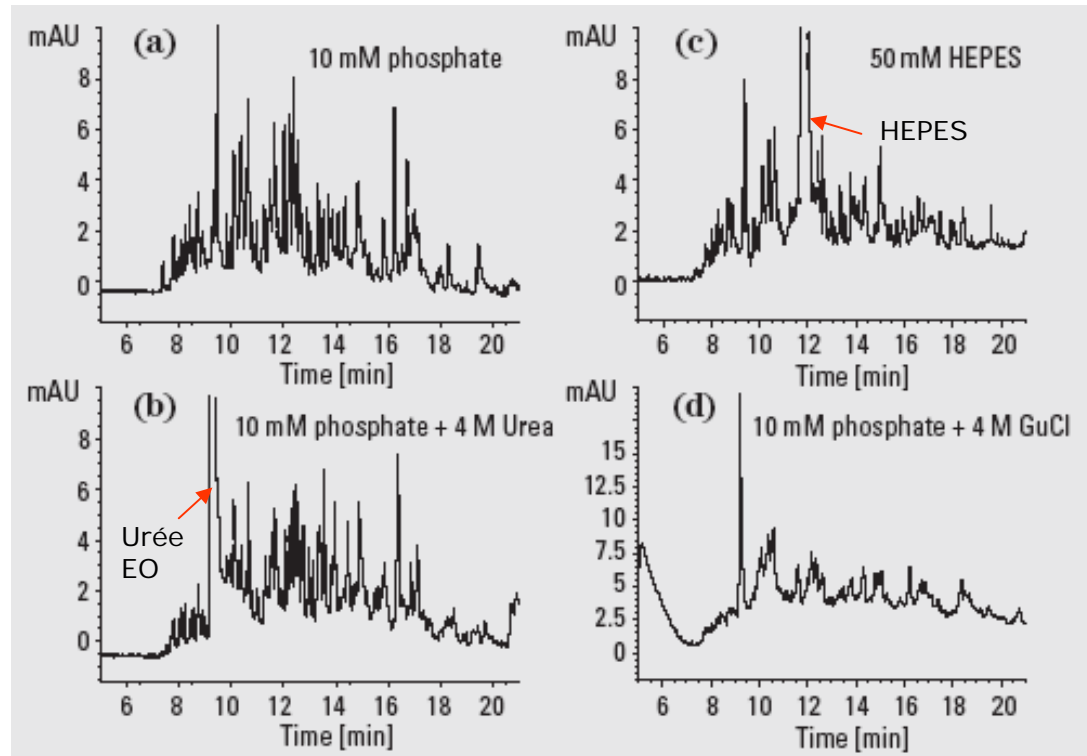
	$pK_a$		$pK_a$
Phosphate	2.12 ( $pK_{a_1}$ )	Phosphate	7.21 ( $pK_{a_2}$ )
Citrate	3.06 ( $pK_{a_1}$ )	TES	7.50
Formate	3.75	HEPES	7.55
Succinate	4.19 ( $pK_{a_1}$ )	HEPPS	8.00
Citrate	4.74 ( $pK_{a_2}$ )	TRICINE	8.15
Acetate	4.75	Glycine amide, hydrochloride	8.20
Citrate	5.40 ( $pK_{a_3}$ )	Glycylglycine	8.25
Succinate	5.57 ( $pK_{a_2}$ )	TRIS	8.30
MES	6.15	BICINE	8.35
ADA	6.60	Morpholine	8.49
BIS-TRIS propane	6.80	Borate	9.24
PIPES	6.80	CHES	9.50
ACES	6.90	CHAPSO	9.60
MOPSO	6.90	CAPS	10.40
Imidazole	7.00	Phosphate	12.32 ( $pK_{a_3}$ )
MOPS	7.20		

# Électrophorèse capillaire

- En solution libre – tampon de l'échantillon

*Echantillons digérés en présence de différents dénaturants*

Running buffer	30 mM phosphate, pH 7
Effective capillary length	70 cm
Internal diameter	50 $\mu\text{m}$
Electric field	314 V/cm
Current	19 $\mu\text{A}$
Temperature	25 $^{\circ}\text{C}$
Injection	200 mbar x s
Detection	200 nm/16 nm bandwidth



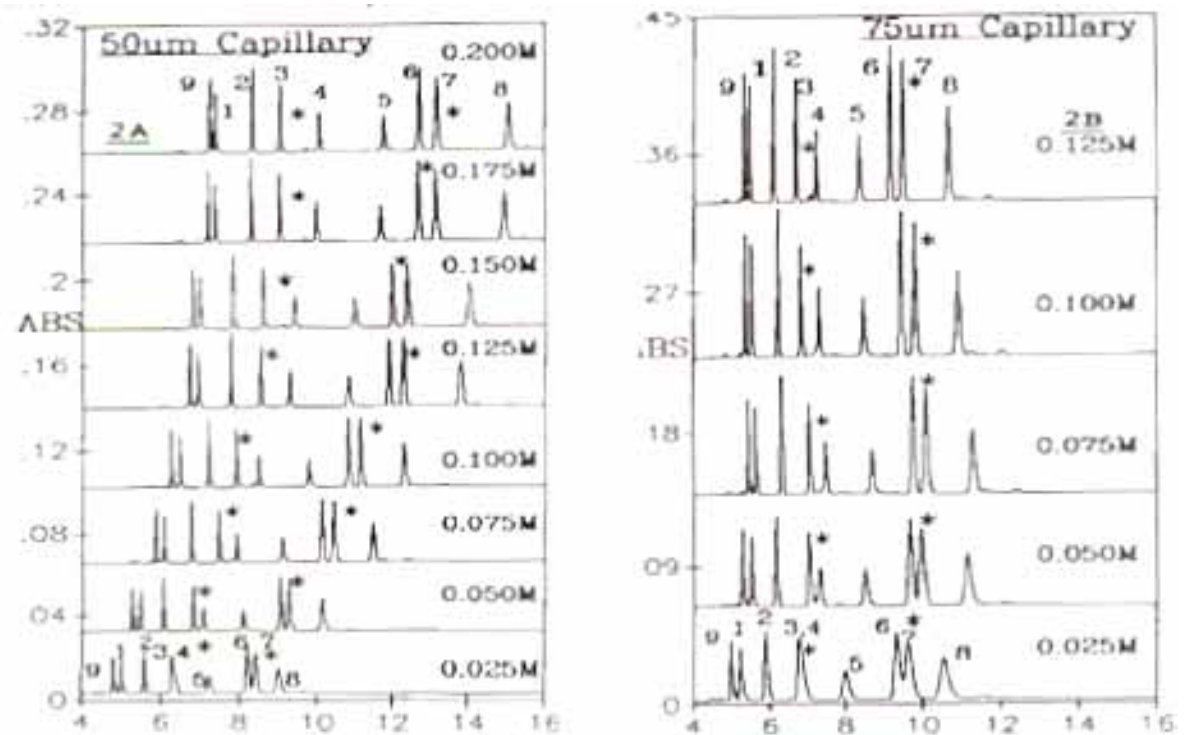
*Heiger, Grimm, Herold – Application note Peptide mapping using CE*

# Électrophorèse capillaire

## □ En solution libre – force ionique

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), Academic Press*

# Électrophorèse capillaire

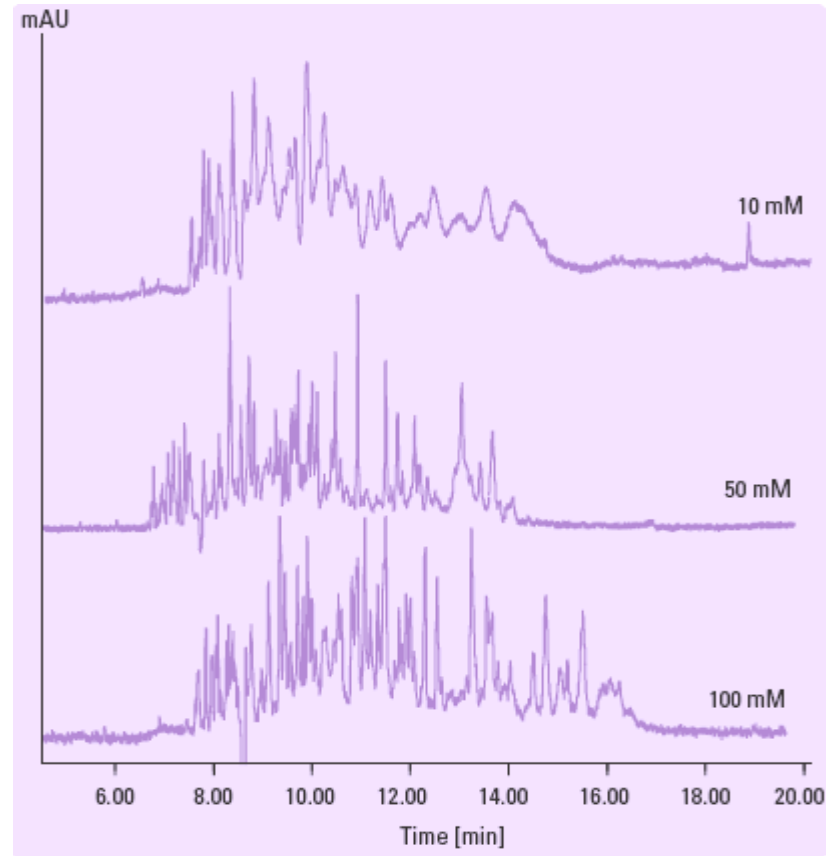
- En solution libre – force ionique

## *Séparation d'un digest trypsique de BSA en tampon phosphate*

Conditions: Phosphate buffer pH 7,  $V = 25\text{kV}$ ,  
 $i = 9, 36, \text{ and } 71\ \mu\text{A}$ , respectively,  
 $l = 50\ \text{cm}$ ,  $L = 58.5\ \text{cm}$ ,  $i_d = 50\ \mu\text{m}$ ,  
 $o_d = 375\ \mu\text{m}$ , BSA concentration  
 $= 2\ \text{mg/ml}$ , injection  $= 100\ \text{mbar s}$

- Aug. de N et R avec la force ionique
- Aug. courant (9 a 71 mA de 10 a 100 mM) et dissipation de Joule
- Nécessité d'un compartiment à °T contrôlée

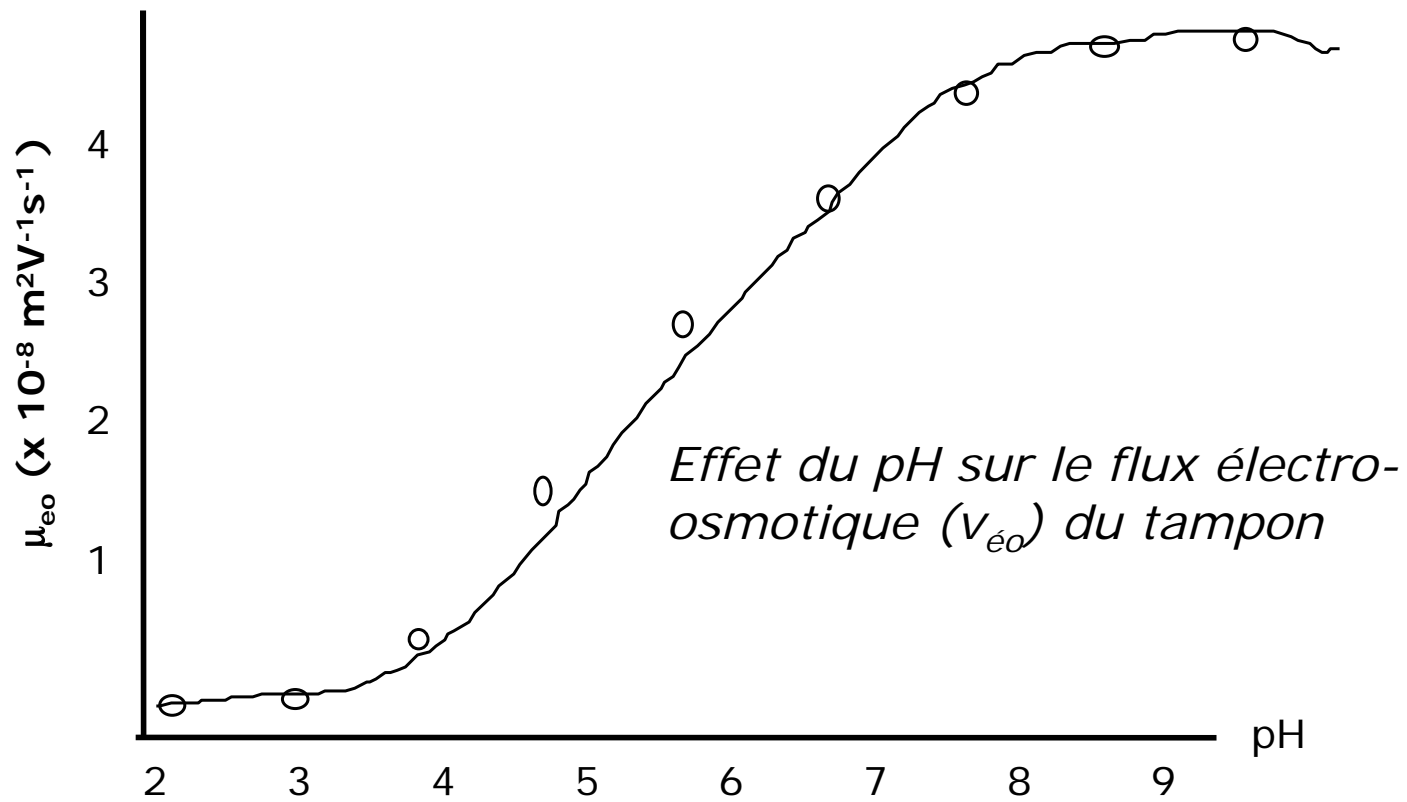
*HPCE – An introduction*  
**D. Heiger**



# Électrophorèse capillaire

---

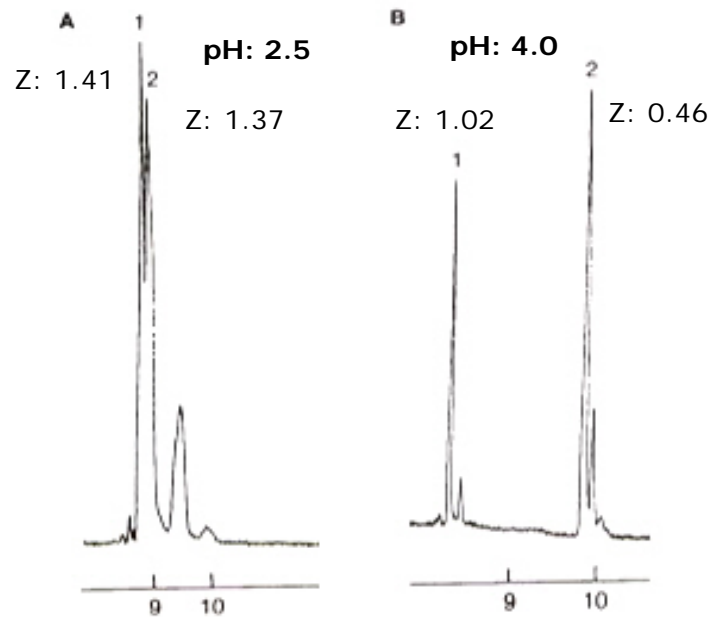
- En solution libre – pH



# Électrophorèse capillaire

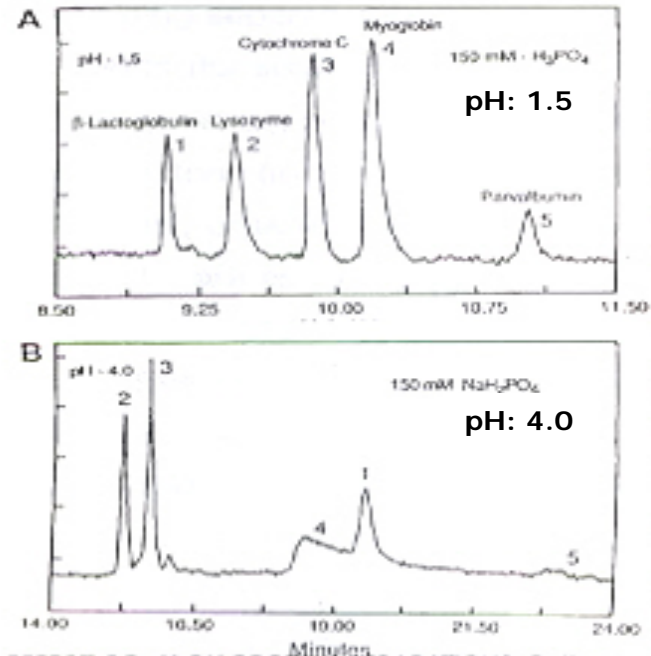
## □ En solution libre – pH

### Séparation de peptides



EFFECT OF BUFFER pH ON THE FSCE SEPARATION OF PEPTIDES. Buffer: 20 mM Citrate; A) pH 2.5; B) pH 4.0. *Anal. Chem.*, 61 (1989) 1186.

### Séparation de protéines



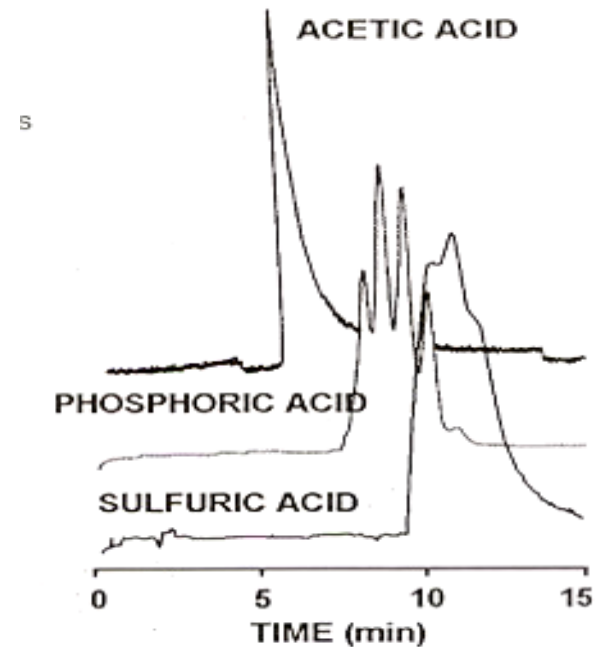
EFFECT OF pH ON PROTEIN SEPARATIONS. Buffers, 150 mM Phosphate A), pH 1.5; B) pH 4; *Chromatographia* 24 (1987) 58

# Électrophorèse capillaire

- En solution libre – pH et complexation

## *Résolution de glycoformes de l'érythropoïétin*

La mobilité électrophorétique, l'ordre de migration et la résolution peuvent être affectés par l'emploi d'agent complexant comme le phosphate ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) permettant un changement conformationnel de la protéine ou de son environnement ionique



*Impact of acid neutralizer on resolution of erythropoietin glycoforms in 100 mM acetate, pH 4; 10 kV; 10, 120, 200  $\mu\text{A}$ ; capillary: 20 cm x 75  $\mu\text{m}$ . J. Chromatogr.,*

*J. Chromatogr. A, 542, 459 (1991)*

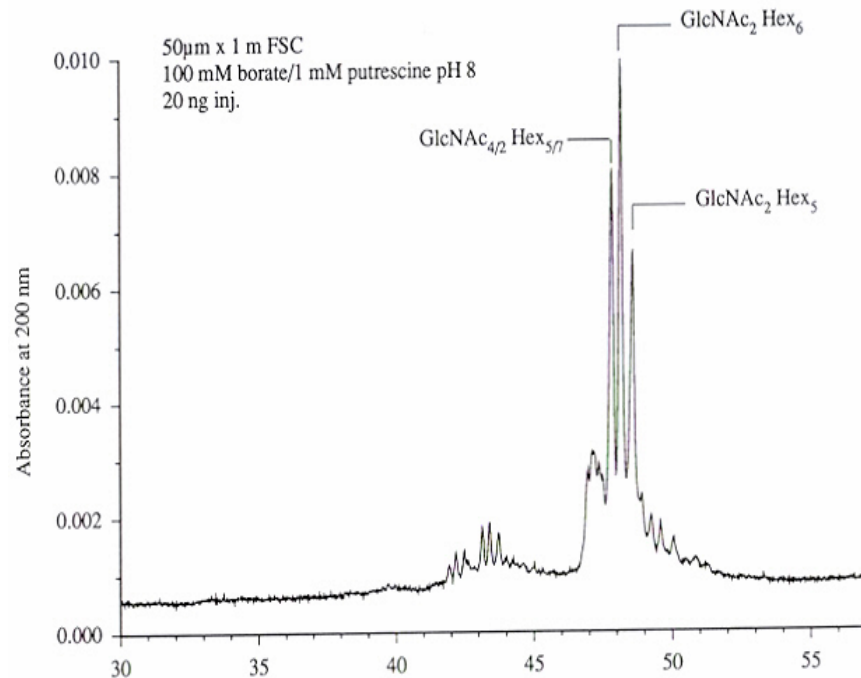
# Électrophorèse capillaire

- En solution libre – pH et complexation

## *Résolution de glycoformes de l'ovalbumine*

La mobilité électrophorétique, et la résolution peuvent être affectés par l'emploi d'agent complexant comme le borate permettant une interaction avec les oligosaccharides et l'ajout d'une charge – supplémentaire au complexe. Celui-ci permet également de séparer certain sucre isomérique (Glc, Gal, Man)

*Anal. Biochem, 205,115 (1992)*



# Électrophorèse capillaire

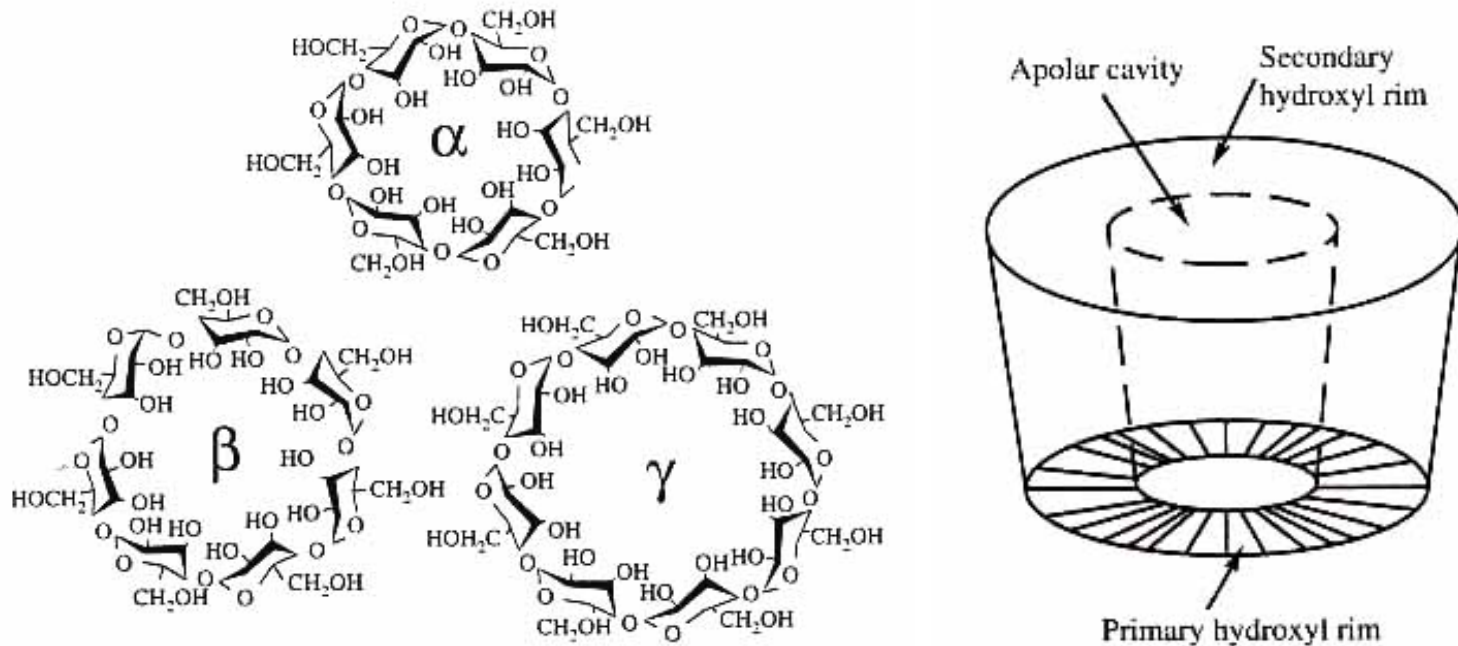
## □ En solution libre – additifs

Additif	Exemple	Utilisation
Zwitterion	MES, Tris, CHAPS, CHAPSO	<ul style="list-style-type: none"><li>□ Aug. force ionique sans aug. conductivité</li><li>□ Selectivité des protéines</li></ul>
Polymère hydrophilique lineaire	Methyl cellulose, polyacrylamide, PEG, PVA	<ul style="list-style-type: none"><li>□ Réduit <math>v_{eo}</math></li><li>□ Réduit adsorption</li><li>□ CGE au haute concentration</li></ul>
Solvant organique	Methanol, acetonitrile	<ul style="list-style-type: none"><li>□ Réduit generalement le <math>v_{eo}</math></li><li>□ Change la selectivite en MEKC et analyse chirale</li></ul>
Agent chiral	Cyclodextrines, sels biliaires	<ul style="list-style-type: none"><li>□ Separation d'énantiomeres</li><li>□ Solubilisation de composés hydrophobes</li></ul>
Agent complexant	Borate	<ul style="list-style-type: none"><li>□ Séparation d'oligosaccharides et catéchols</li></ul>
Amine quaternaire	Diamino propane, polybrene	<ul style="list-style-type: none"><li>□ Paire d'ions</li><li>□ Changement de direction de <math>v_{eo}</math></li></ul>

*Adapte d'apres D. Heiger – HPCE, An introduction*

# Électrophorèse capillaire

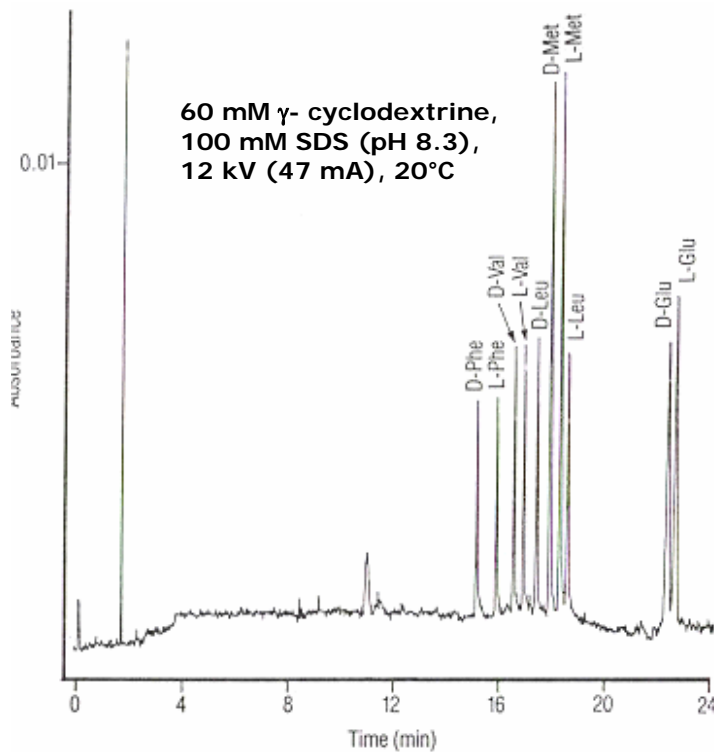
- En solution libre – cyclodextrine



# Électrophorèse capillaire

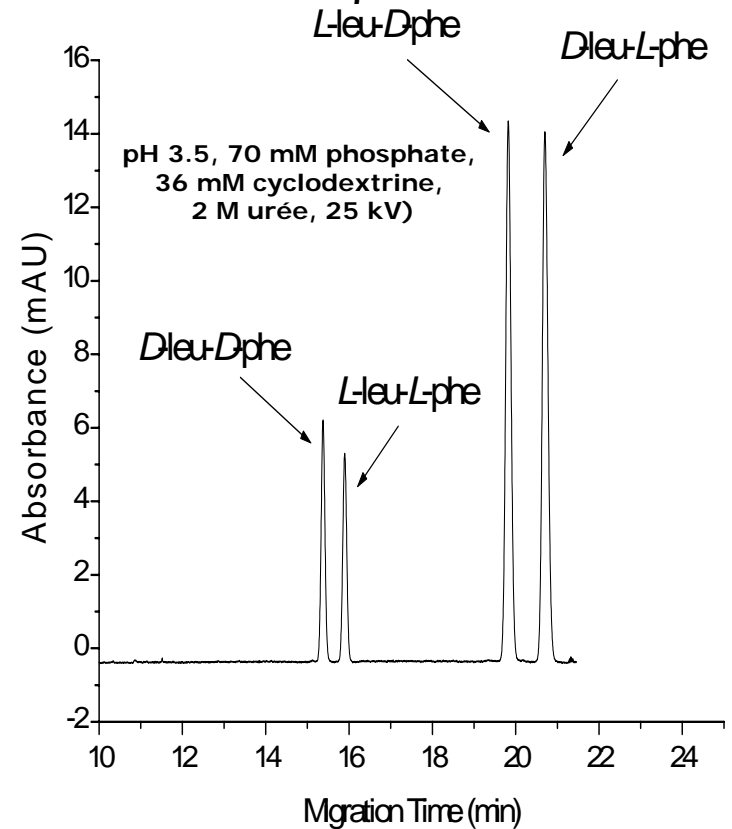
## □ En solution libre – cyclodextrine

Séparation d'isomères D et L  
d'acides aminés avec  $\gamma$ -CD



*Y. Miyashita, S. Terabe (1990)*

Séparation d'isomères du peptide  
Leu-Phe avec  $\beta$ -CD



# Électrophorèse capillaire

## □ En solution libre – modification de la paroi

Table 2.1 Surface Modifications for Capillary Zone Electrophoresis Applications

Surface modification	Surface characteristics	Plates/m	pH range	Ref.
<b>Coatings</b>				
Polyethylene glycol	Weakly hydrophobic, reduced EOF	700–800 k	3–8	47
Polyethylene-propylene glycol	Weakly hydrophilic, reduced EOF	800–1000 k	3–7	48
Polycrylamide	Hydrophilic, reduced EOF	200–300 k	2–10	48, 49
Polyvinylmethylsiloxanediol	Hydrophobic, reduced EOF	500–700 k	4–9	50
Polysiloxane (sulfonic acid)	Cathodal and constant EOF	≈200 k	3–9	51
Polysiloxane (quaternary amine)	Anodal EOF decreasing with pH	200–400 k	3–9	51
Aminopropyltrimethoxy silane	Anodal EOF decreasing with pH	200–400 k	<4	52
<b>Buffer additives</b>				
Non-ionic surfactants	Hydrophilic, reduced EOF	150–250 k	4–11	53
Cationic polymers	Anodal EOF decreasing with pH	200–500 k	<7	44, 54
Diaminoalkanes	Reduced EOF	≈300 k	6–8	55
Polyvinylalcohol	Reduced EOF	800–1000 k	3–10	56
Praestol (cationic polymer)	Anodal EOF decreasing with pH	≈200–300 k	3–10	50

47. Zhao, Z., Malik, A., and Lee, M.L., Separation of proteins and proteolytic digests of proteins by capillary electrophoresis on superox-coated open tubular columns, *J. Microcol. Sep.*, 4, 411, 1992.
48. Zhao, Z., Malik, A., and Lee, M.L., Solute adsorption on polymer-coated fused silica capillary electrophoresis columns using selected protein and peptide standards, *Anal. Chem.*, 65, 2747, 1993.
49. Cobb, K.A., Dolnik, V., and Novotny, M., Electrophoretic separations of proteins in capillaries with hydrolytically stable surface structures, *Anal. Chem.*, 62, 2478, 1990.
50. Schmalzing, D., Piggee, C.A., Foret, F., Carrilho, E., and Karger, B.L., Characterization and performance of a neutral hydrophilic coating for the capillary electrophoretic separation of biopolymers, *J. Chromatogr.*, 652, 149, 1993.
51. Huang, M., Yi, G., Bradshaw, J.S., and Lee, M.L., Charged surface coatings for capillary electrophoresis, *J. Microcol. Sep.*, 5, 199, 1993.
52. Moseley, M.A., Deterding, L.J., Tomer, K.B., and Jorgenson, J.W., Determination of bioactive peptides using capillary zone electrophoresis/mass spectrometry, *Anal. Chem.*, 63, 109, 1991.
53. Tows, J.K. and Regnier, F.E., Capillary electrophoretic separations of proteins using nonionic surfactant coatings, *Anal. Chem.*, 63, 1126, 1991.
54. Kelly, J.F., Locke, S.J., Ramaley, L., and Thibault, P., Development of electrophoretic conditions for the characterization of protein glycoforms by capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry, *J. Chromatogr.*, 720, 409, 1996.
55. Landers, J.P., Oda, R.P., Madden, B.J., and Spelsberg, T.C., High performance capillary electrophoresis of glycoproteins: the use of modifiers of electroosmotic flow for the analysis of microheterogeneity, *Anal. Biochem.*, 205, 115, 1992.
56. Schomburg, G., Belder, D., Gilges, M., and Motsch, S., Ionic and nonionic polymers as wall modifiers in capillary electrophoresis, *J. Cap. Elect.*, 3, 219, 1994.

*Capillary Electrophoresis: Theory and practice, 2<sup>nd</sup> Ed., Academic Press, p. 34*

# Électrophorèse capillaire

## □ En solution libre – Electro-osmose anodique

### *Modification de la surface pour la rendre positivement chargée*

Que se passe-t'il lors de l'application du voltage ?

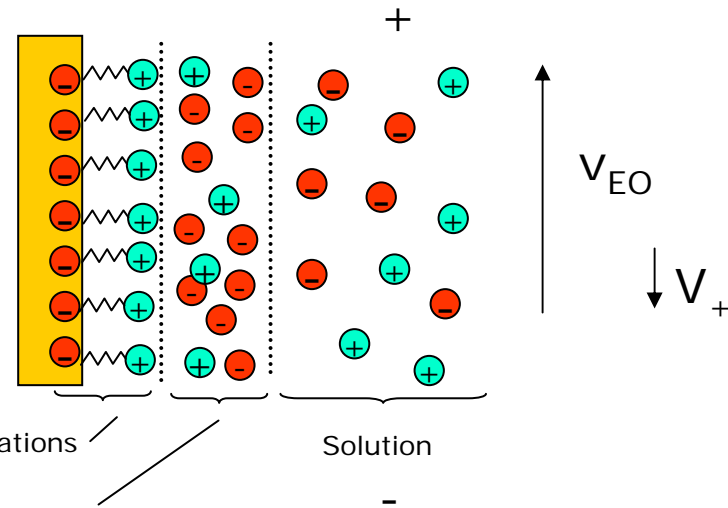
*La migration des anions solvatés de la couche diffuse occasionne un déplacement vers l'anode, lequel est appelé électro-osmose anodique*

### **Avantages:**

- Utilisation de pH acide ~ 2
- Séparation des cations
- Applicable pour la séparation de protéines
- Compatible avec CE-MS
- Augmentation de la résolution

Silice fondue avec cations fortement adsorbés

Zone diffuse de la double couche avec une prédominance d'anions



$$R = \frac{\sqrt{N}}{4} \left( \frac{\Delta\mu_{ep}}{\bar{\mu}_{ep} + \mu_{eo}} \right)$$

# Électrophorèse capillaire

## □ En solution libre – modification de la paroi

**Table 1. Comparison of separation efficiencies for different capillary coatings<sup>a</sup>**

	Peptides	m/z	Theoretical plates		
			APS	Polybrene	BCQ
1	Leu-enkephalin	556	62 000	185 000	352 000
2	Glu-Fibrinogen	786	38 000	185 000	380 000
3	Substance P <sub>3-11</sub>	548	76 000	249 000	505 000
4	Cholecystokinin <sub>10-20</sub>	418	49 000	273 000	312 000
5	Substance P <sub>1-9</sub>	553	29 000	355 000	355 000
6	Angiotensin I	433	31 000	230 000	237 000
7	Val <sub>4</sub> I <sub>17</sub> Angiotensin III	442	26 000	152 000	152 000
8	ACTH <sub>4-10</sub>	482	60 000	111 000	256 000
9	pGlu <sub>1</sub> -MBP <sub>4-14</sub>	459	18 000	268 000	288 000

### Aminopropylsilane

Réactif silane liaison covalente, avec  $V_{eo}$  élevée

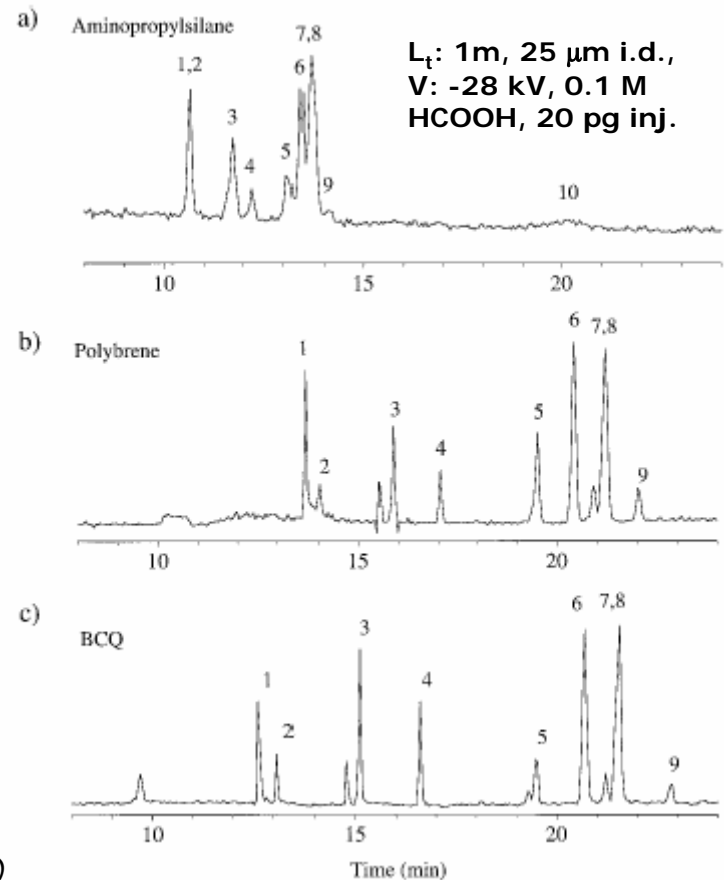
### Polybrene

Garnissage dynamique  
 $V_{eo}$  faible

### BCQ

Réactif silane longue chaîne amine quat.  
Liaison covalente, avec  $V_{eo}$  faible

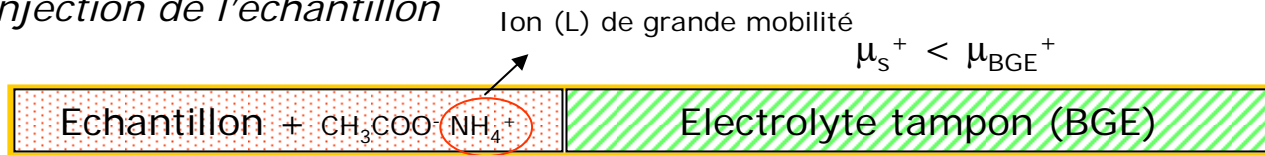
*Rapid Commun. in Mass Spectrom.*, **11**, 307 (1997)



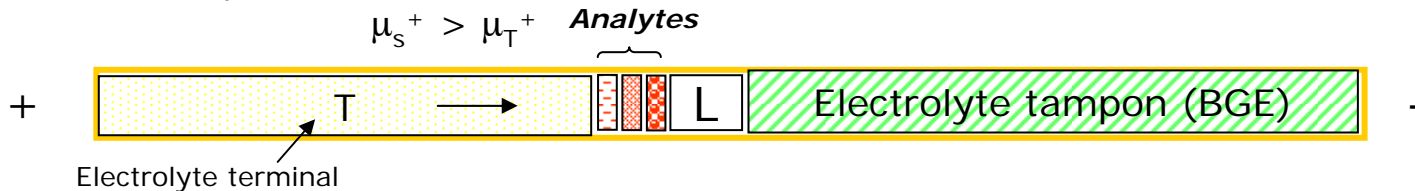
# Électrophorèse capillaire

## □ En solution libre – préconcentration CITP-CZE

*Injection de l'échantillon*



*Isotachophorèse*



*Electrophorèse solution libre*



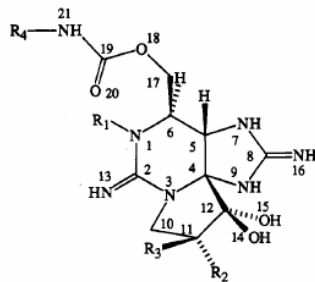
*J. Microcol. Sep., 2, 127 (1990)*  
*Anal. Chem., 65, 900 (1993)*

BGE: 35 mM  $\beta$ -alanine, pH 3.2  
 T: 50 mM HCOOH  
 Colonne modifiée avec polyacrylamide linéaire (LPA)

# Électrophorèse capillaire

En solution libre – préconcentration CITP-CZE

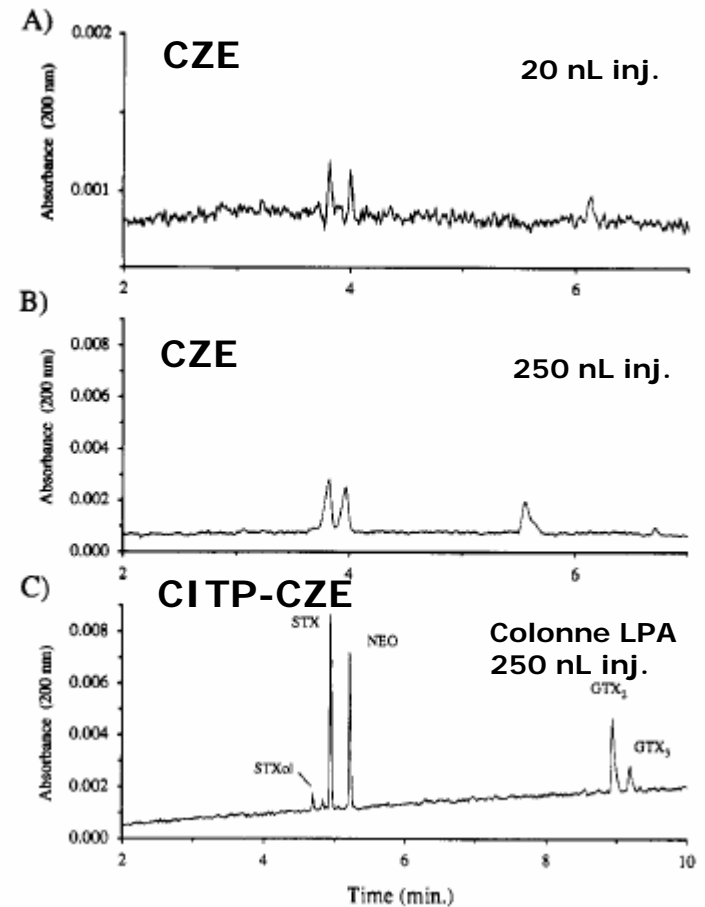
## Toxines marines paralysantes



R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	Toxin	Molecular mass (Da)
H	H	H	H	STX	299
H	H	H	SO <sub>3</sub> H	B <sub>1</sub>	379
H	OSO <sub>3</sub> H	H	H	GTX <sub>2</sub>	395
H	H	OSO <sub>3</sub> H	H	GTX <sub>3</sub>	395
H	OSO <sub>3</sub> H	H	SO <sub>3</sub> H	C <sub>1</sub>	475
H	H	OSO <sub>3</sub> H	SO <sub>3</sub> H	C <sub>2</sub>	475
OH	H	H	H	NEO	315
OH	H	H	SO <sub>3</sub> H	B <sub>2</sub>	395
OH	OSO <sub>3</sub> H	H	H	GTX <sub>1</sub>	411
OH	H	OSO <sub>3</sub> H	H	GTX <sub>4</sub>	411
OH	OSO <sub>3</sub> H	H	SO <sub>3</sub> H	C <sub>3</sub>	491
OH	H	OSO <sub>3</sub> H	SO <sub>3</sub> H	C <sub>4</sub>	491

1.4 µg/mL STX, NEO, 1.2 et 0.3 µg/mL GTX<sub>2</sub>, GTX<sub>3</sub>,  
BGE: 35 mM morpholine, pH 5, L<sub>t</sub>: 0.6 m, d: 50 µm

*Anal. Chem.* 66, 3436-3446 (1994)



# Électrophorèse capillaire

En solution libre – préconcentration CITP-CZE

## Avantage:

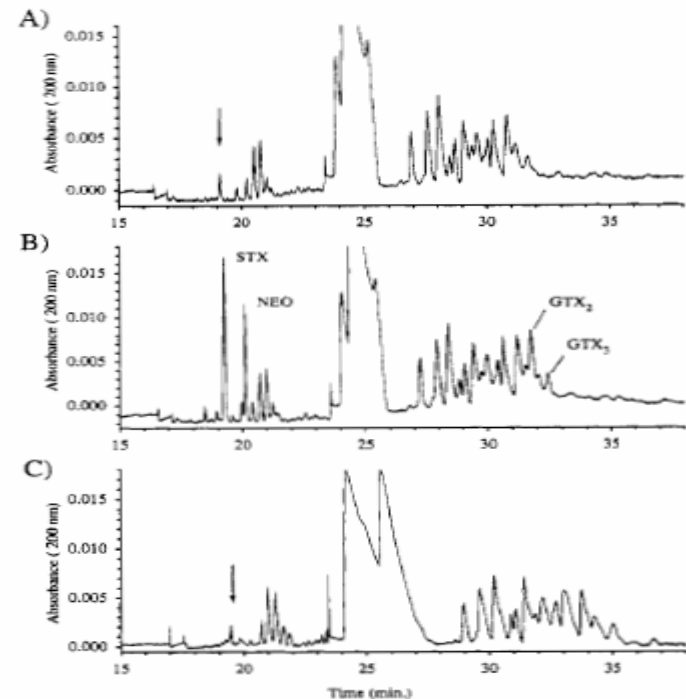
CITP permet de pré-concentrer l'échantillon et d'injecter jusqu'à 50% volume du capillaire (~1  $\mu\text{L}$  pour capillaire de 1 m x 50  $\mu\text{m}$  i.d.).

Les bandes d'analyte restent focaliser et près l'une de l'autre lors de l'étape CITP.

Résolution accrue en CZE est généralement obtenue.

Applicable pour mélange complexe, compatible avec MS

*Anal. Chem.* 66, 3436-3446 (1994)

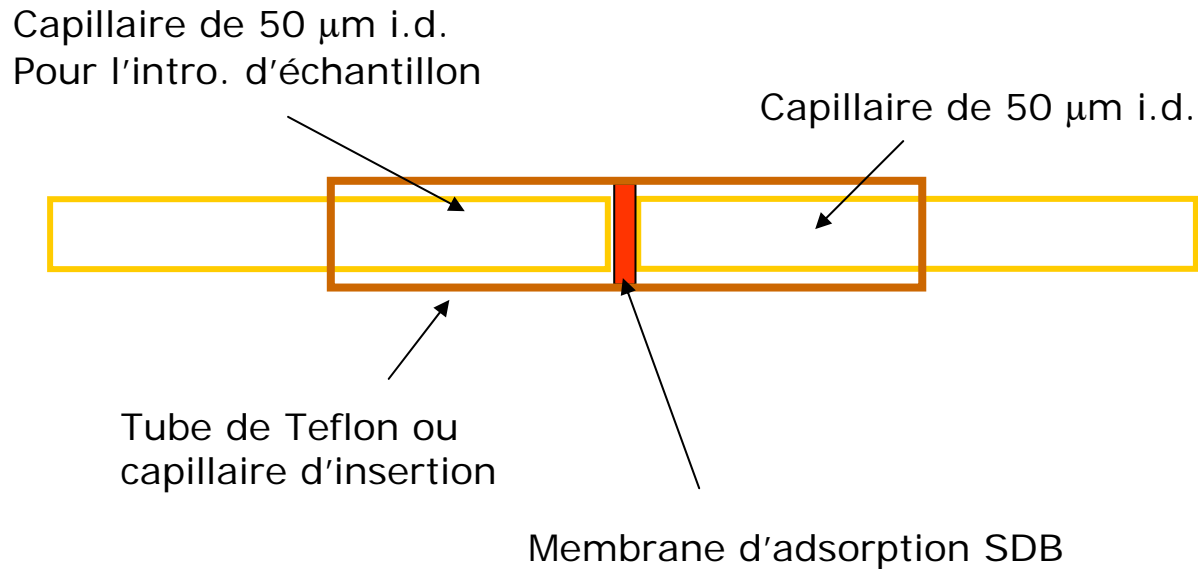


**Figure 5.** Analysis of a contaminated scallop liver extract using CITP/CZE/UV for the injection of 2.2  $\mu\text{L}$  of a mild acid extract on a 107 cm  $\times$  75  $\mu\text{m}$  i.d. coated column (A) and for the same sample spiked with 650 pg of STX, NEO, and GTX<sub>2,3</sub> (B). Injection of 490 nL of the scallop extract on a 107 cm  $\times$  50  $\mu\text{m}$  i.d. coated column (C). Arrow indicates the STX peak in the native extract. Separation conditions as for Figure 3.

# Électrophorèse capillaire

---

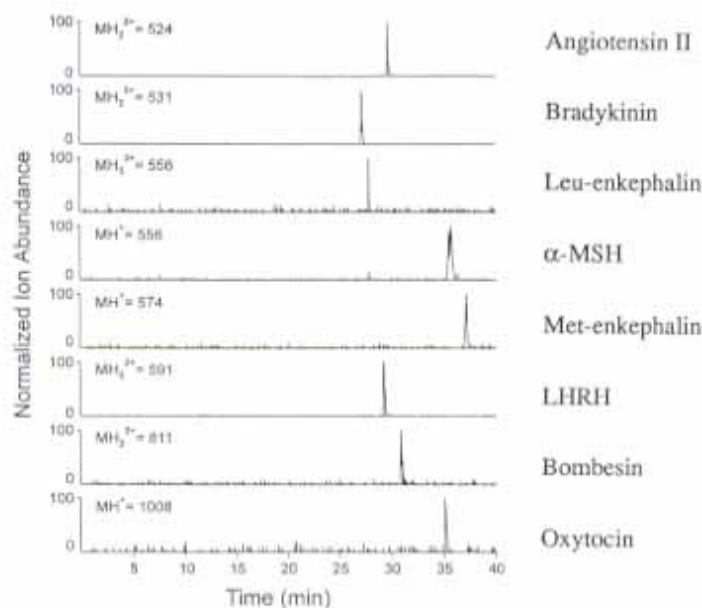
En solution libre – préconcentration adsorption-CZE



*J. Cap. Electro., 2, 224 (1995)*

# Électrophorèse capillaire

En solution libre – préconcentration adsorption-CZE



25  $\mu\text{m}$  i.d. x 74 cm, separation buffer: 2 mM amm. acetate, 1% acetic acid (pH 2.9)  
5  $\mu\text{L}$  inj. (50 pg/mL), leading electrolyte (280 nL): 0.1% aqueous  $\text{NH}_4\text{OH}$ ,  
elution buffer (70 nL): 80%  $\text{CH}_3\text{OH}$ , terminator (70 nL): 1% acetic acid.

*J. Cap. Electro.*, 2, 224 (1995)

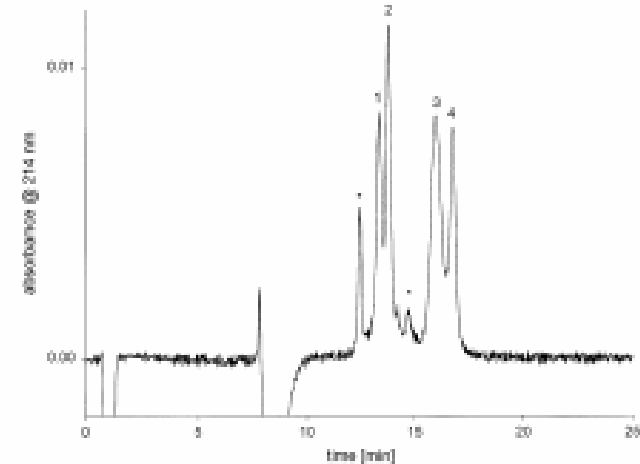


Fig. 1. Separation of a mixture of protein standards (concentration of 0.5  $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$  each) by mPC-CE. Injection volume=1  $\mu\text{L}$ . The mPC-cartridge contained a  $\text{C}_2$  impregnated Empore membrane. The polybrene coated capillary had dimensions of 57 cm (effective length 50 cm)  $\times$  50  $\mu\text{m}$  I.D. The BGE was 2 mM  $\text{NH}_4\text{OAc}$  in 5% aqueous acetic acid. Proteins were recovered from the  $\text{C}_2$  membrane with 60 ml of 80% acetonitrile in water, and 60 ml of a TSB of 0.5% ammonium hydroxide was followed by a zone of 240  $\mu\text{L}$  BGE to prevent protein re-adsorption on the membrane. The separation potential was -15 kV, and analyte detection was by UV at a wavelength of 214 nm. Protein identification: (1) carbonic anhydrase, (2) myoglobin, (3) human serum albumin, (4) lysozyme, (\*) unknown degradation product.

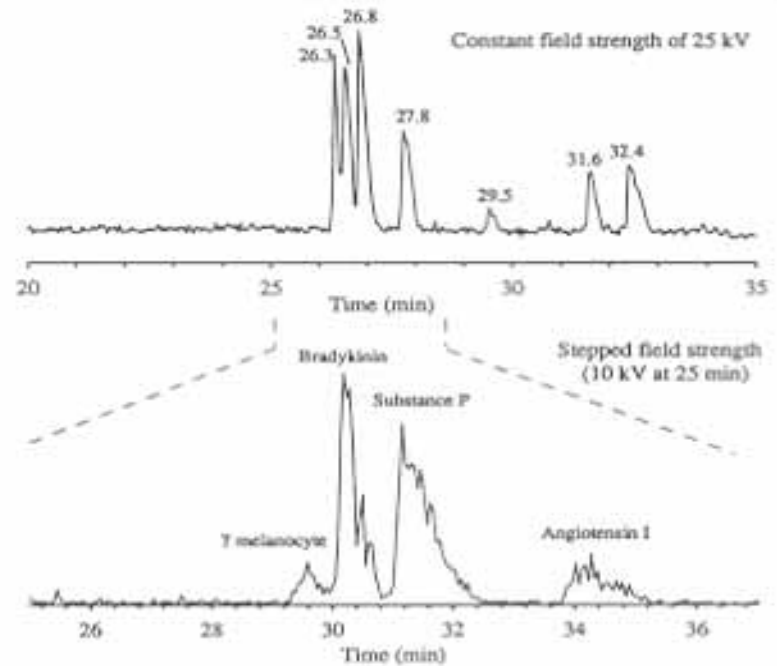
# Électrophorèse capillaire

## □ En solution libre – Résolution et voltage appliqué

La résolution et l'intégrité de la séparation est maintenue avec la réduction de voltage en solution libre.

Le bandes ne sont pas soumises à une diffusion anormale bien que la migration se poursuivra plus longtemps.

Cet avantage est utile pour l'analyse par SM afin de maximiser l'enregistrement de spectres MS-MS.



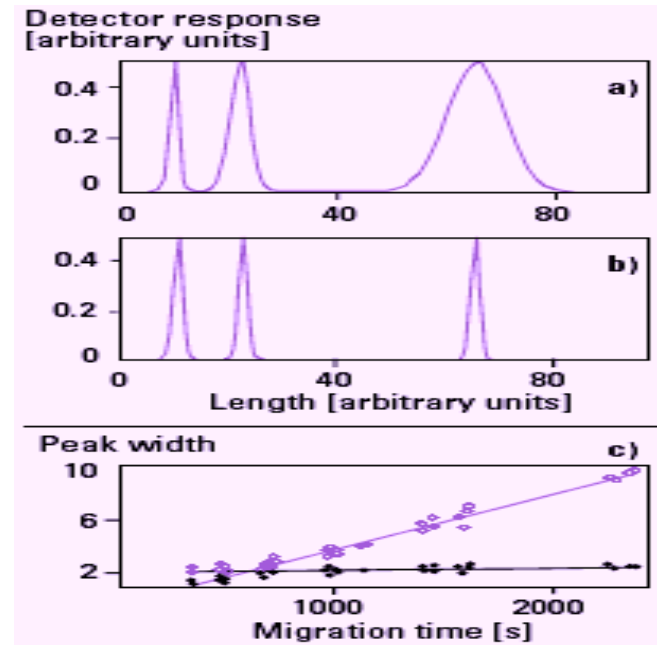
CITP-CZE-MS analysis of a mixture of seven peptides. Total ion electropherogram ( $m/z$  500 to 1500) conducted under a constant field strength of 25 kV (A), and a stepped field strength (B). Product ion spectrum of  $m/z$  531 obtained from combined CITP-CZE-MS-MS analysis. Conditions: 0.95 m  $\times$  50  $\mu$ m i.d. capillary coated with linear polyacrylamide, 25 kV, background electrolyte: 35 mM  $\beta$ -alanine-formate pH 3.5, terminator: 10 mM formic acid. All separations were obtained for the injection of 0.5  $\mu$ L of a 5  $\mu$ g/mL of each peptide. (Fragment ion nomenclature according to Beaudouin, D. and Cotté, J. *Journal of Mass Spectrometry*, 1998, 33, 1000-1005.)

*Capillary Electrophoresis: Theory and practice, 2<sup>nd</sup> Ed., Academic Press, p. 71*

# Électrophorèse capillaire

## □ En solution libre – Aspect quantitatif

Contrairement à la LC les analytes en EC migrent à différentes vitesses et on doit corriger l'aire de pics correspondants de façon à ce que la réponse du détecteur ne soit pas sur-estimée. Les analytes de faible mobilité seront visibles par le détecteur pour une plus longue période ce qui ne sera pas le cas pour les analytes de grande mobilité. On corrige ce phénomène en normalisant l'aire mesurée par le temps de migration.



Réponse du détecteur en fonction du temps (a), corrigée pour la vitesse des zones (b) et comparaison des pics de Lys-dansyl à différent voltage pour la même quantité injectée avec (•) et sans correction (o)

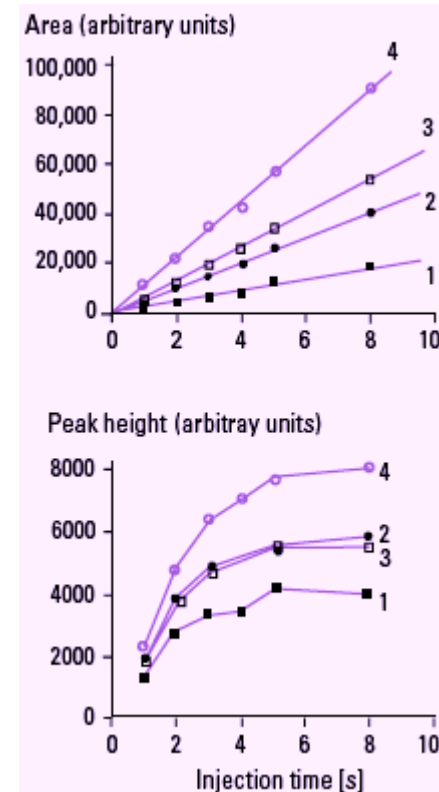
*HPCE – An introduction*  
**D. Heiger**

# Électrophorèse capillaire

## □ En solution libre – Aspect quantitatif

Comparaison de la réponse du détecteur en utilisant la hauteur de pic et l'aire correspondante. La hauteur de pic est généralement dépendante des phénomènes de stacking entre la conductivité de l'échantillon et du tampon. Ces différences peuvent affecter la hauteur de pic mais pas son aire. Cette dernière est donc plus reproductible pour des fins de quantification.

*HPCE – An introduction*  
**D. Heiger**



1 = mesityl oxide, 2 = phenylglycine,  
3 = mandelic acid, 4 = benzoic acid

# Électrophorèse capillaire

## □ Séparation par pI (CIEF)

Remplissage  
du capillaire



Introduction  
d'ampholytes



Introduction  
de l'échantillon



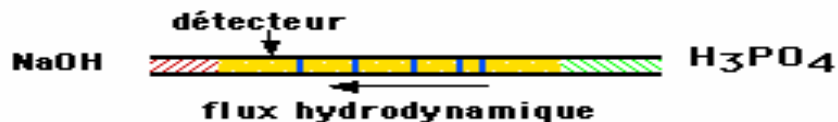
Introduction  
d'ampholytes



L'électrofocalisation  
ne dure que quelques  
minutes

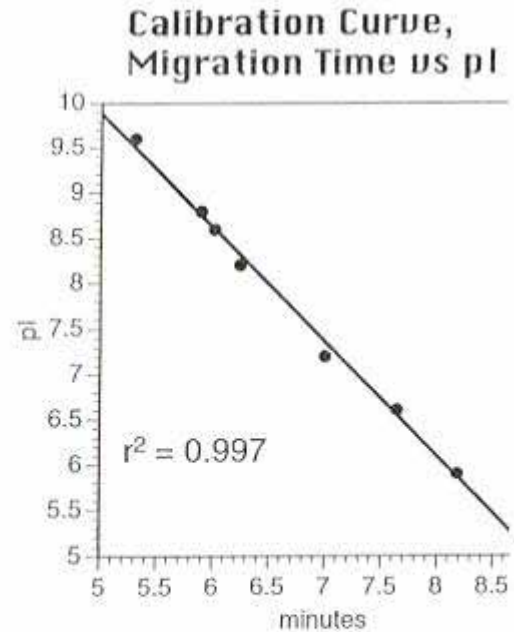
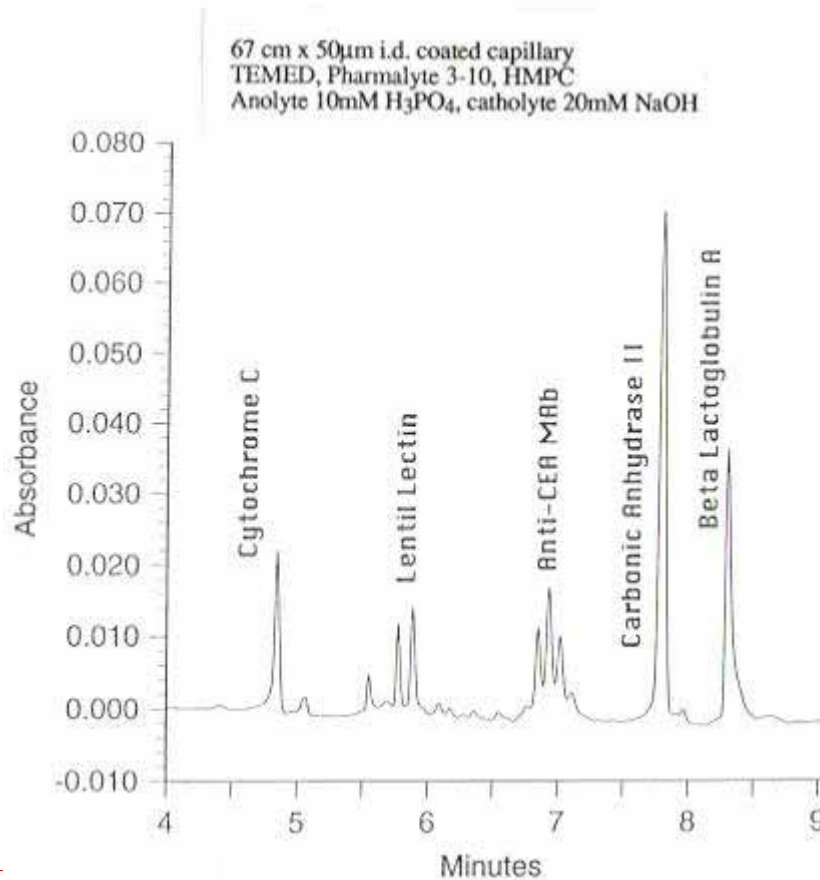


Elution et  
détection.



# Électrophorèse capillaire

## □ Séparation par pI (CIEF)

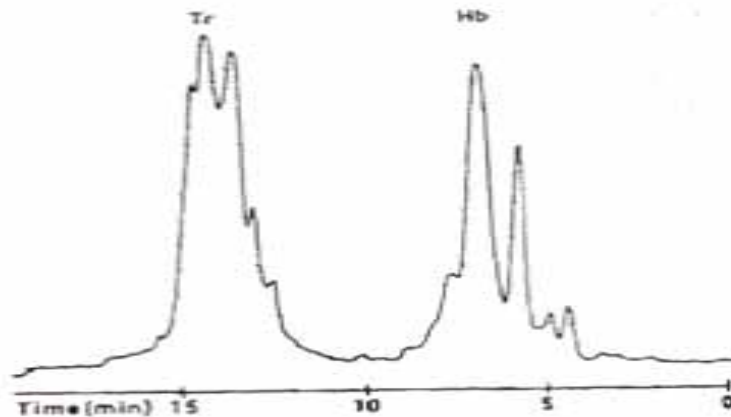
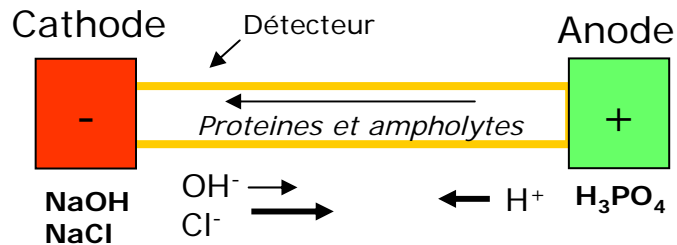


T. Pritchett, 1994  
Mazzeo & Krull, 1992

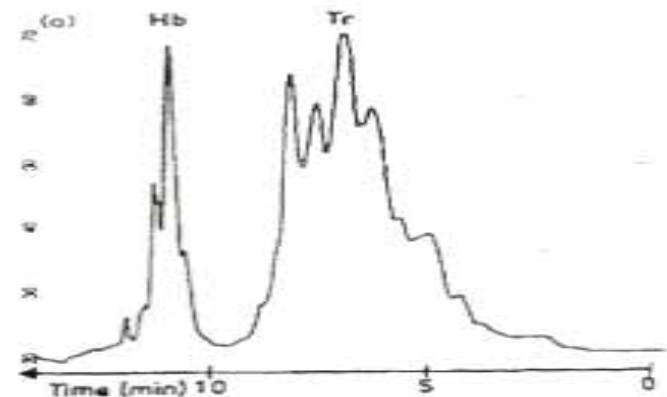
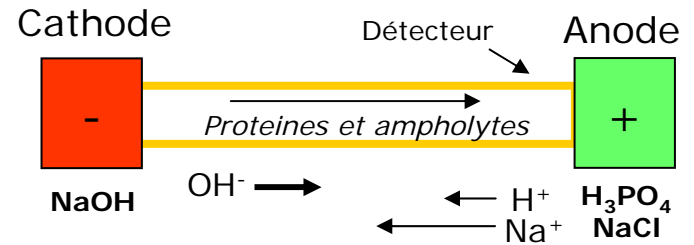
# Électrophorèse capillaire

## □ Séparation par pI (CIEF)

### Mobilisation cathodique



### Mobilisation anodique



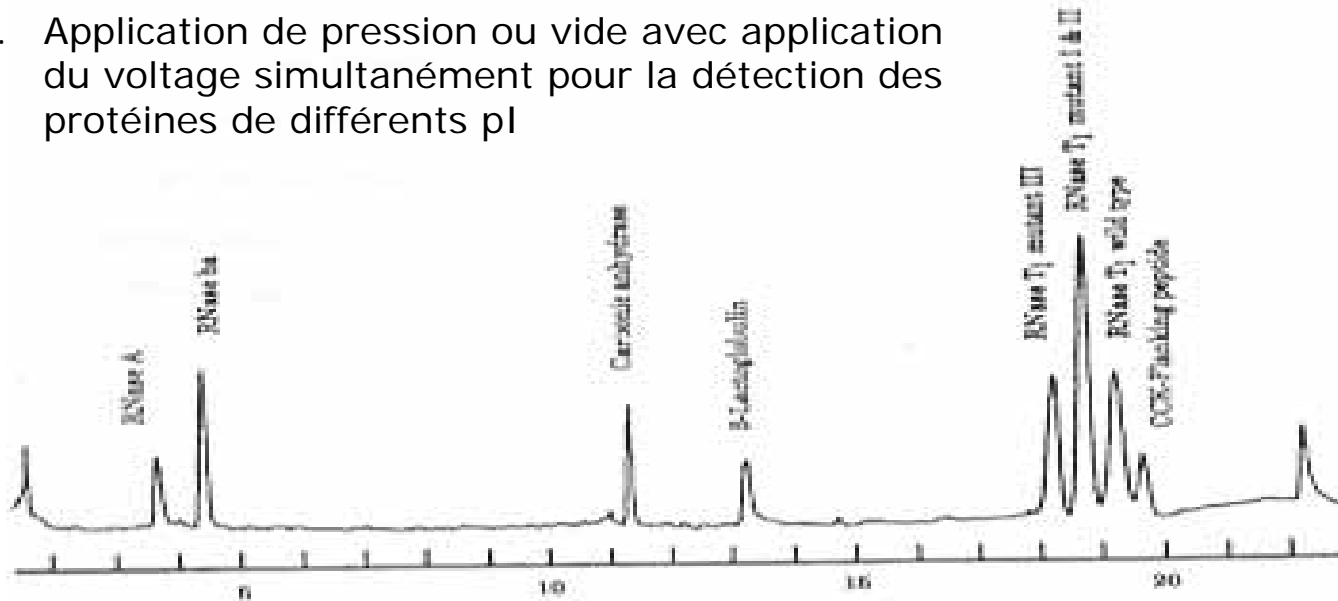
*J. Chromatogr. A, 346, 265 (1985)*

# Électrophorèse capillaire

## □ Séparation par pI (CIEF)

### Mobilisation hydrodynamique

1. Capillaire DB-1
2. Injection de l'échantillon avec ampholytes (Servalytes 3-10 (0.5%), 0.4% methylcellulose)
3. Focalisation
4. Application de pression ou vide avec application du voltage simultanément pour la détection des protéines de différents pI



*Anal. Biochem.*, 206, 84 (1992)

# Électrophorèse capillaire

---

## □ Séparation par pI (CIEF) - résolution

La résolution en CIEF est exprimée par:

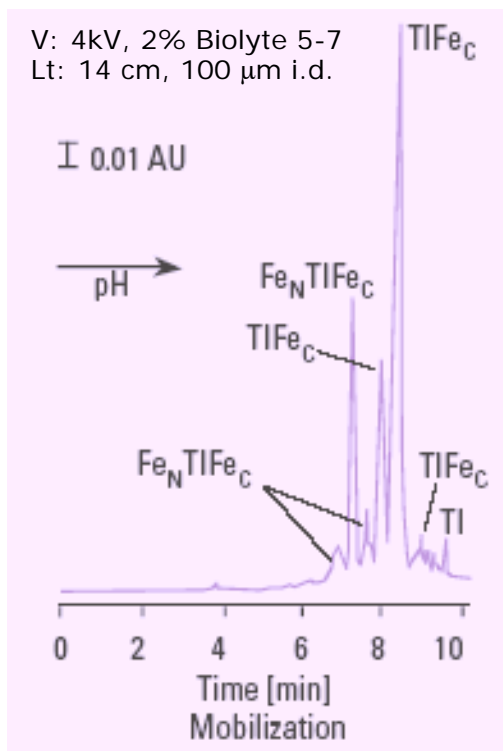
$$\Delta pI = 3 \sqrt{\frac{D_m (dpH/dx)}{E (d\mu/dpH)}} \quad \text{où:} \quad \begin{array}{l} D_m: \text{coefficient de diffusion} \\ E: \text{champ électrique} \\ \mu: \text{mobilité de la protéine} \end{array}$$

**Des protéines variant de 0.02 unité de pH peuvent être résolues**

# Électrophorèse capillaire

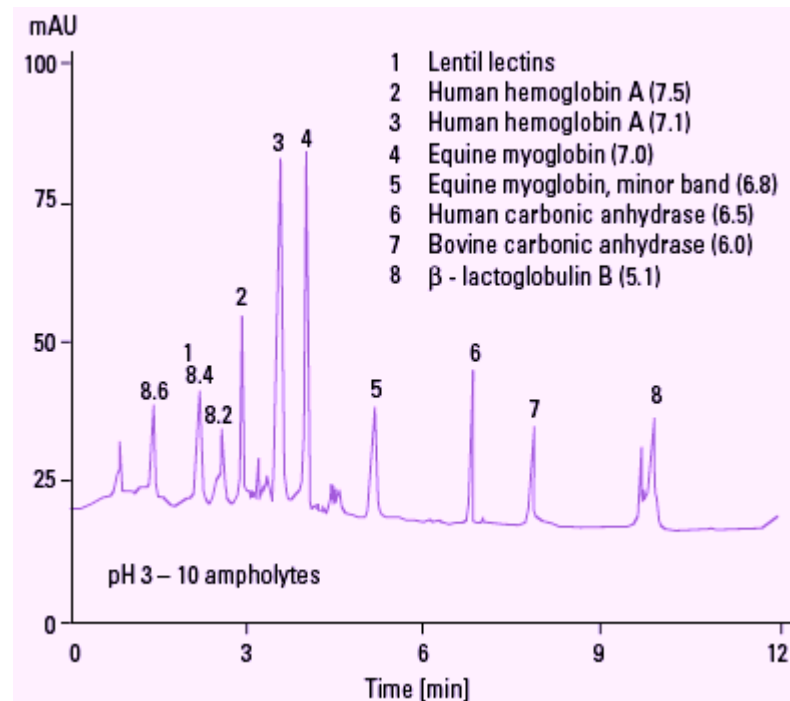
## □ Séparation par pI (CIEF) - résolution

### *Séparation d'isoformes de transferrin*



*Electrophoresis*, 10, 23 (1989)

### *Séparation de protéines standards*



*Am. Biotech. Lab.*, 8, 22 (1990)

# Électrophorèse capillaire

## □ EC avec gel – généralités



*Séparation basée sur la taille des protéines ou oligonucléotides*

Polymère	Concentration	Application
Cross-linked; polyacrylamide/bis- acrylamide	2-6 %T, 3-6 %C	<input type="checkbox"/> Oligonucleotides, séquençage d'ADN <input type="checkbox"/> Protéines liées au SDS ou natives
Linéaire; Polyacrylamide Hydroxyalkyl cellulose, PVA, dextran	< 0.1-6 % 6-15 %	<input type="checkbox"/> Fragments de restriction <input type="checkbox"/> Oligonucleotides, séquençage d'ADN, protéines
Agarose	0.05-1.2%	<input type="checkbox"/> Fragments de restriction <input type="checkbox"/> Protéines

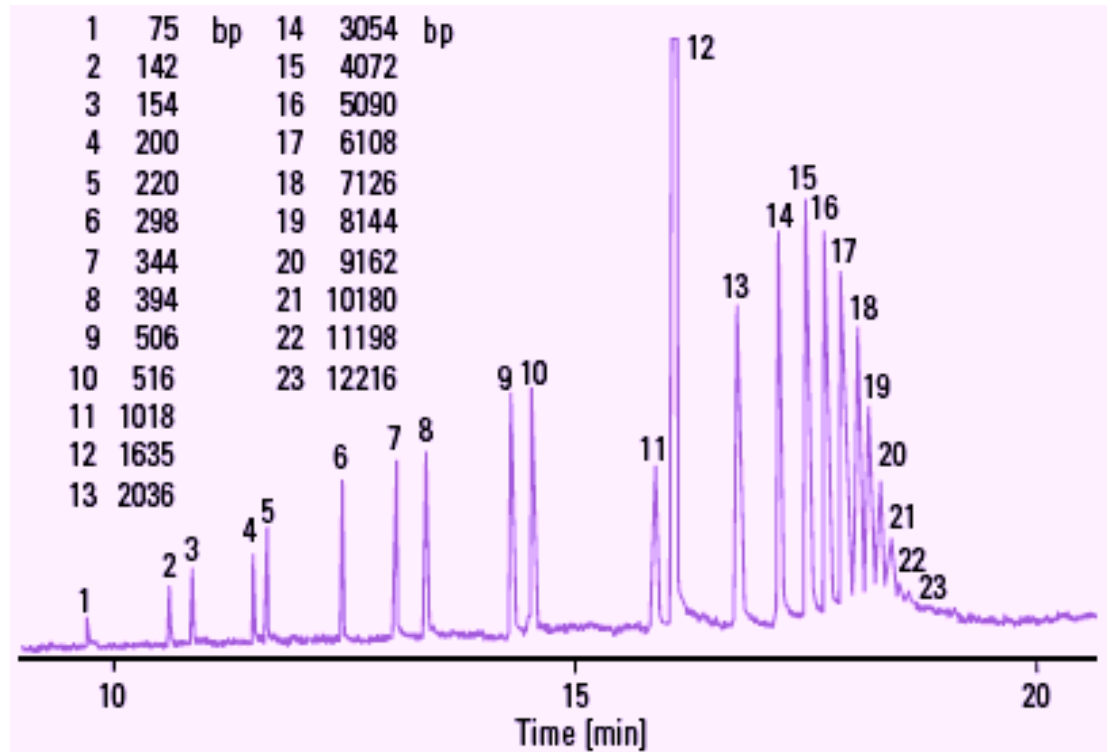
# Électrophorèse capillaire

## □ EC avec gel – applications

**CGE d'oligonucléotides de 1k paire de base base en utilisant le minimum d'agent de réticulation**

Conditions:

Bis-polyacrylamide réticulé  
(3 % T, 0.5 % C), 100 mM  
Trisborate, pH 8.3,  $E = 250$   
 $V/cm$ ,  $i = 12.5 \mu A$ ,  $L_d = 30$  cm,  
 $L_t = 40$  cm,  $id = 75 \mu m$ ,  $\lambda 260$   
nm, capillaire modifié avec le  
polyacrylamide



*J. Chromatogr.* 516, 33 (1990)

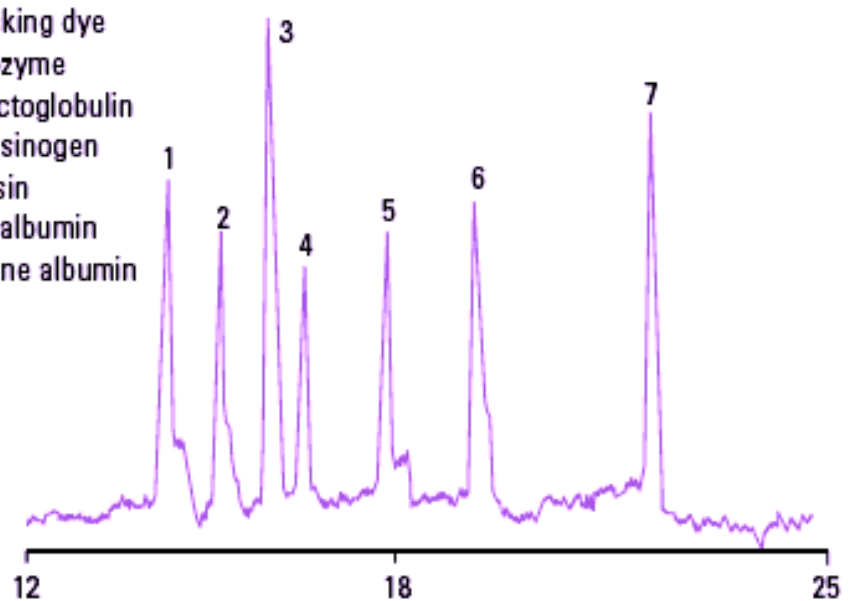
# Électrophorèse capillaire

## □ EC avec gel – applications

### Séparation de protéines standards en utilisant électrophorèse sur gel et SDS

Conditions: Bis- polyacrylamide reticulé, (7.5 % T, 5 % C), 100 mM trisborate, 0.1 % SDS, 8 M urée, pH7.3,  $E = 300 \text{ V/cm}$ ,  $i = 12 \text{ } \mu\text{A}$ ,  $L_d = 15 \text{ cm}$ ,  $id = 75 \text{ } \mu\text{m}$ ,  $\lambda 280 \text{ nm}$ , capillaire modifié avec le polyacrylamide

- 1 Tracking dye
- 2 Lysozyme
- 3  $\beta$ -lactoglobulin
- 4 Trypsinogen
- 5 Pepsin
- 6 Egg albumin
- 7 Bovine albumin

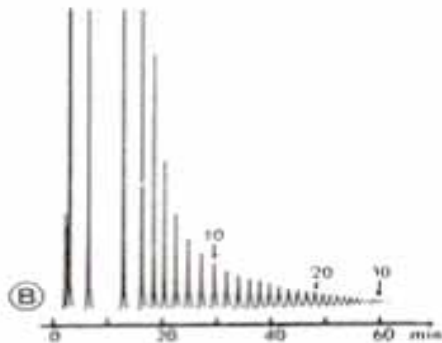
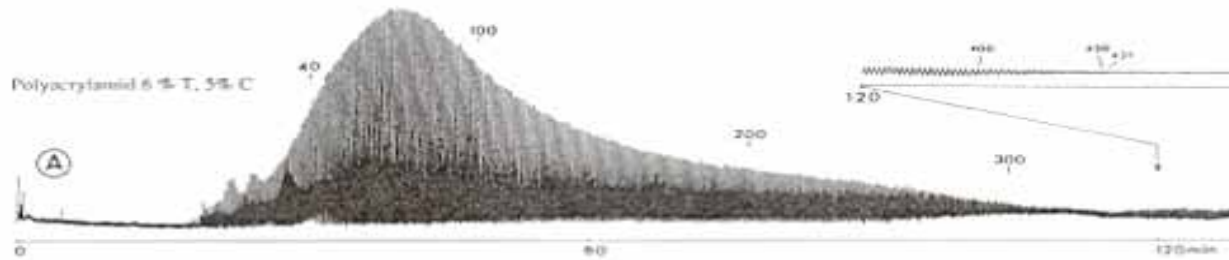


J. Chromatogr. 492, 585 (1989)

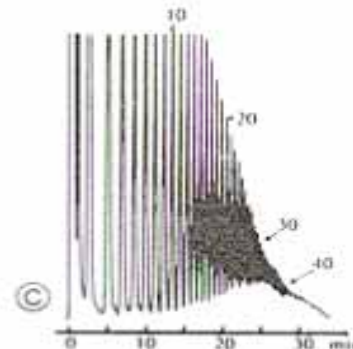
# Électrophorèse capillaire

- EC avec gel – comparaison avec HPLC

CGE from Yin, Lux & Schomburg, 1990



RP-HPLC (TSK gel OligoDNA RP; Tosoh)



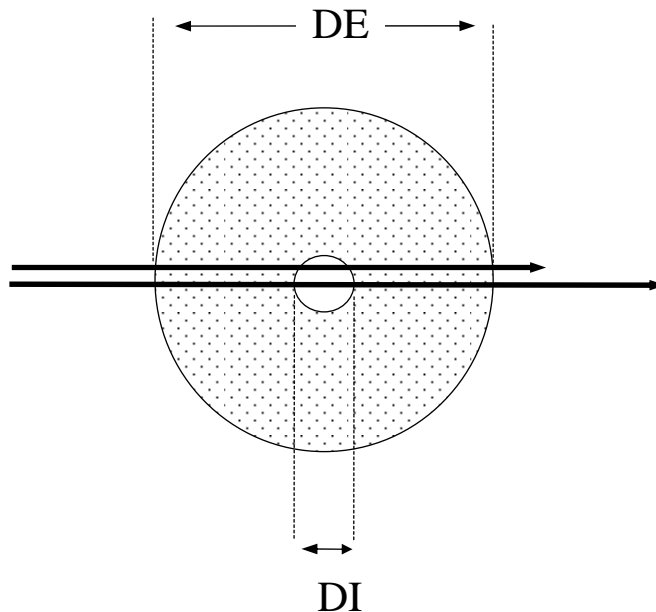
RP-HPLC (TSK gel DEAE-NPR; Tosoh), fro

# Électrophorèse capillaire

## □ Détection en EC par absorption

Loi de Beer-Lambert:  $A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon c l$

où  $A$  = absorbance  
 $I_0$  = intensité de lumière incidente  
 $I$  = intensité de lumière transmis  
 $\varepsilon$  = absorptivité molaire ( $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )  
 $c$  = concentration d'analyte ( $\text{mol L}^{-1}$ )  
 $l$  = chemin optique (cm)



$$l = \frac{\pi \cdot DI}{4}$$

donc, pour un capillaire de  
50  $\mu\text{m}$  DI,  $l$  est  $\sim 39 \mu\text{m}$

# Électrophorèse capillaire

---

## □ Limites de l'électrophorèse capillaire

Détection spectrophotométrique dépend du chemin optique,  $l$ , selon la loi de Beer-Lambert:  $A = \varepsilon c l$

### HPLC

$l$  est de l'ordre de mm

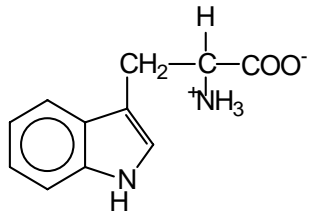
### EC

$l$  est 50 ou 75  $\mu\text{m}$

donc, à concentration identique  $\Rightarrow$  absorbance (i.e., signal) est 10 à 100 fois plus faible en EC

# Électrophorèse capillaire

EC vs CLHP pour la détection de tryptophane par absorption UV



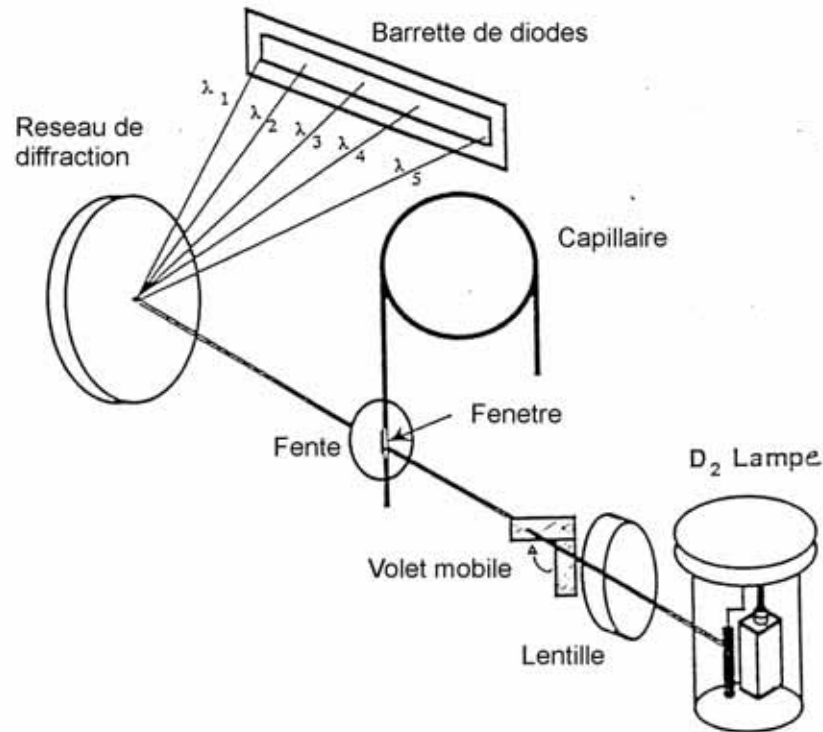
	EC	RP-HPLC
volume injecté	8,3 nl	20 $\mu\text{l}$
UV détection (280 nm)		
LD <sub>conc</sub>	9 $\mu\text{M}$	0,85 $\mu\text{M}$
LD <sub>masse</sub>	75 fmol	17 000 fmol

- ❑ LD calculé comme  $S/B=2$
- ❑ **ÉC**; capillaire: I.D.=50 $\mu\text{m}$ ,  $L_t=70\text{cm}$ ,  $L_d=50\text{cm}$ ; tampon: 50mM sodium phosphate, pH 8,  $V_{inj}=10\text{kV}$ ,  $t_{inj}=5\text{ s}$ ,  $V_{sep}=20\text{kV}$
- ❑ **HPLC**; I.D.=4.6mm,  $L=10\text{cm}$ , phase stationnaire: 3 $\mu\text{m}$  ODS-Hypersil; phase mobile: 50mM acétate d'ammonium:MeOH (250:30), pH 6, 1.2 ml/min

# Électrophorèse capillaire

---

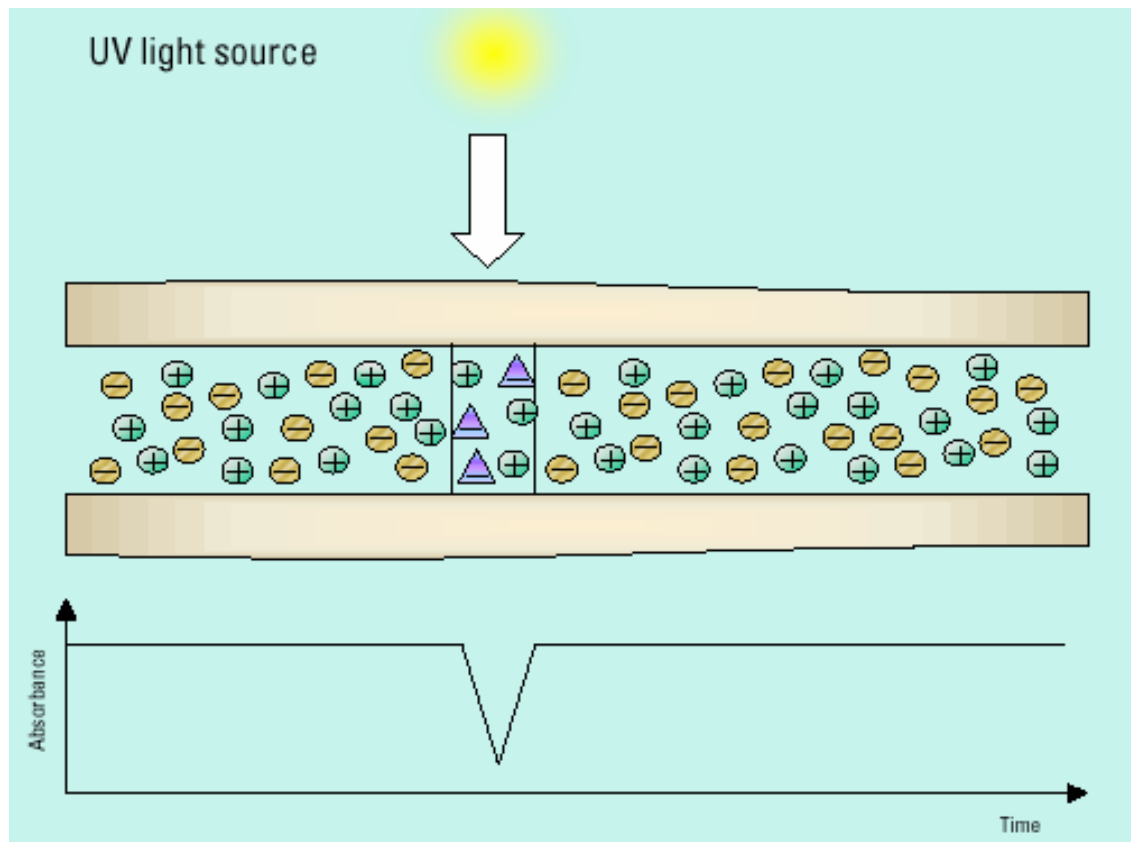
Détection par Barrette de diodes (DAD) dans le UV-Vis



# Électrophorèse capillaire

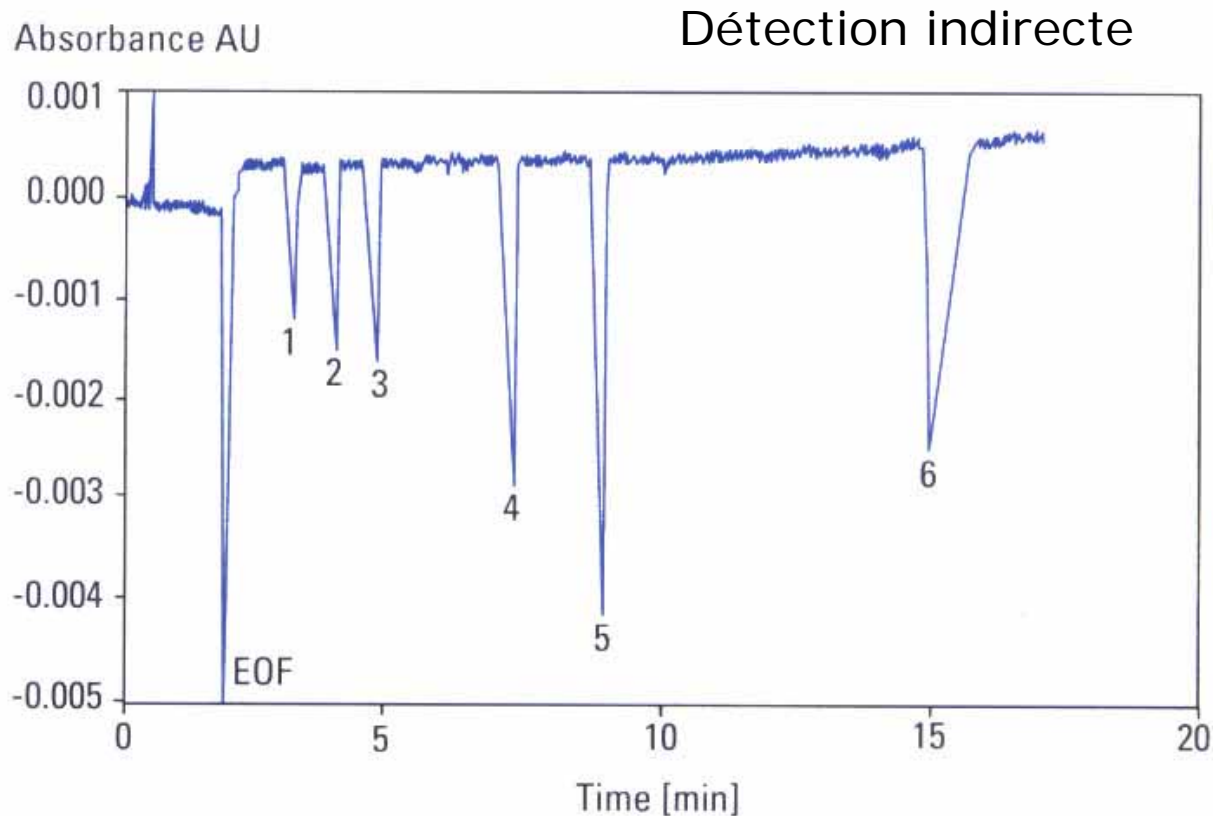
---

Détection par absorption indirecte



# Électrophorèse capillaire

---

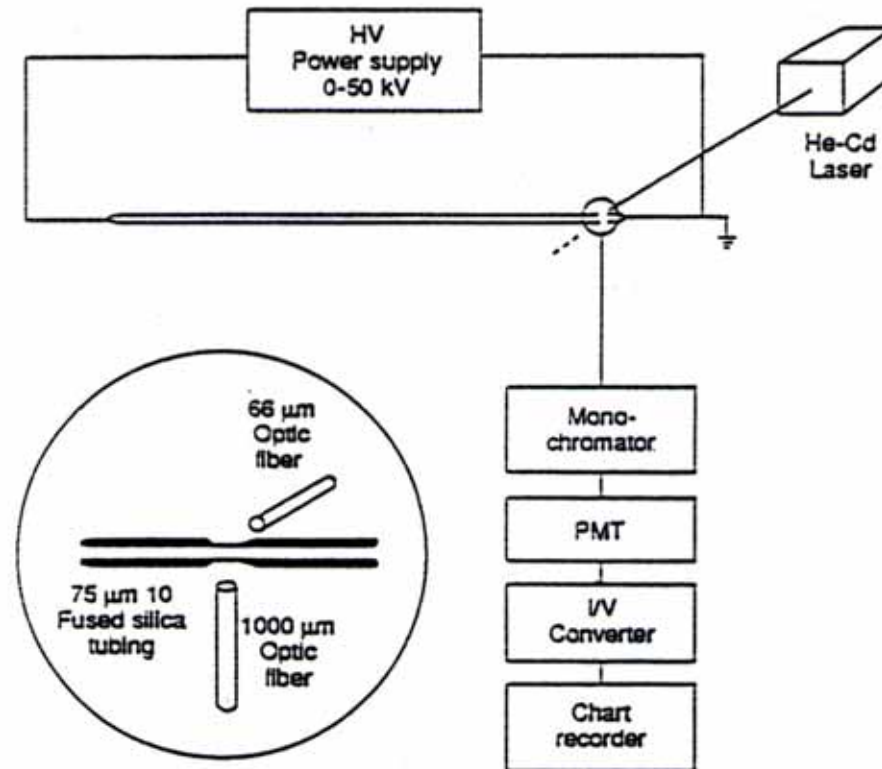


Tampon: acide benzoïque 0.01 M, Tris à pH 8. Détection à 254 nm.

Analytes: 1: chlorure; 2: chlorate; 3: fluorure; 4: acétate; 5: propionate; 6: MES.

# Électrophorèse capillaire

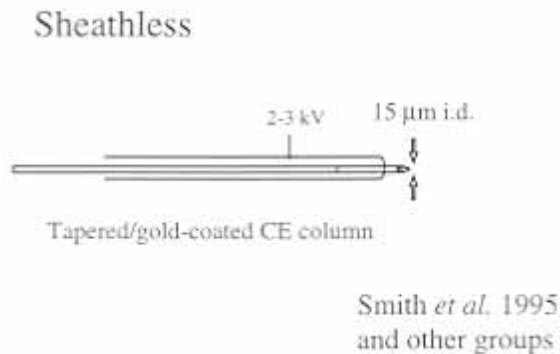
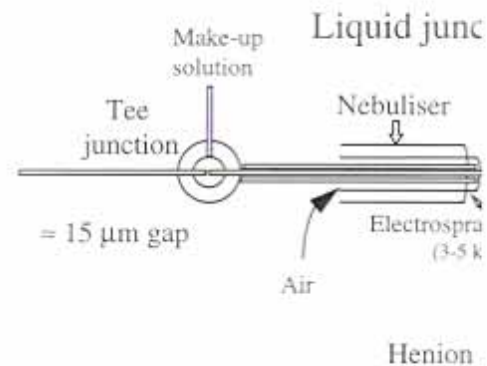
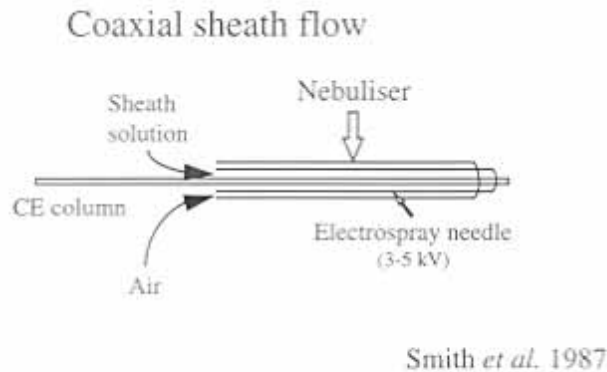
Détection par fluorescence induite par laser



**Figure 4** Experimental set-up for capillary zone electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. Reproduced with permission from Roach *et al.* (1988).

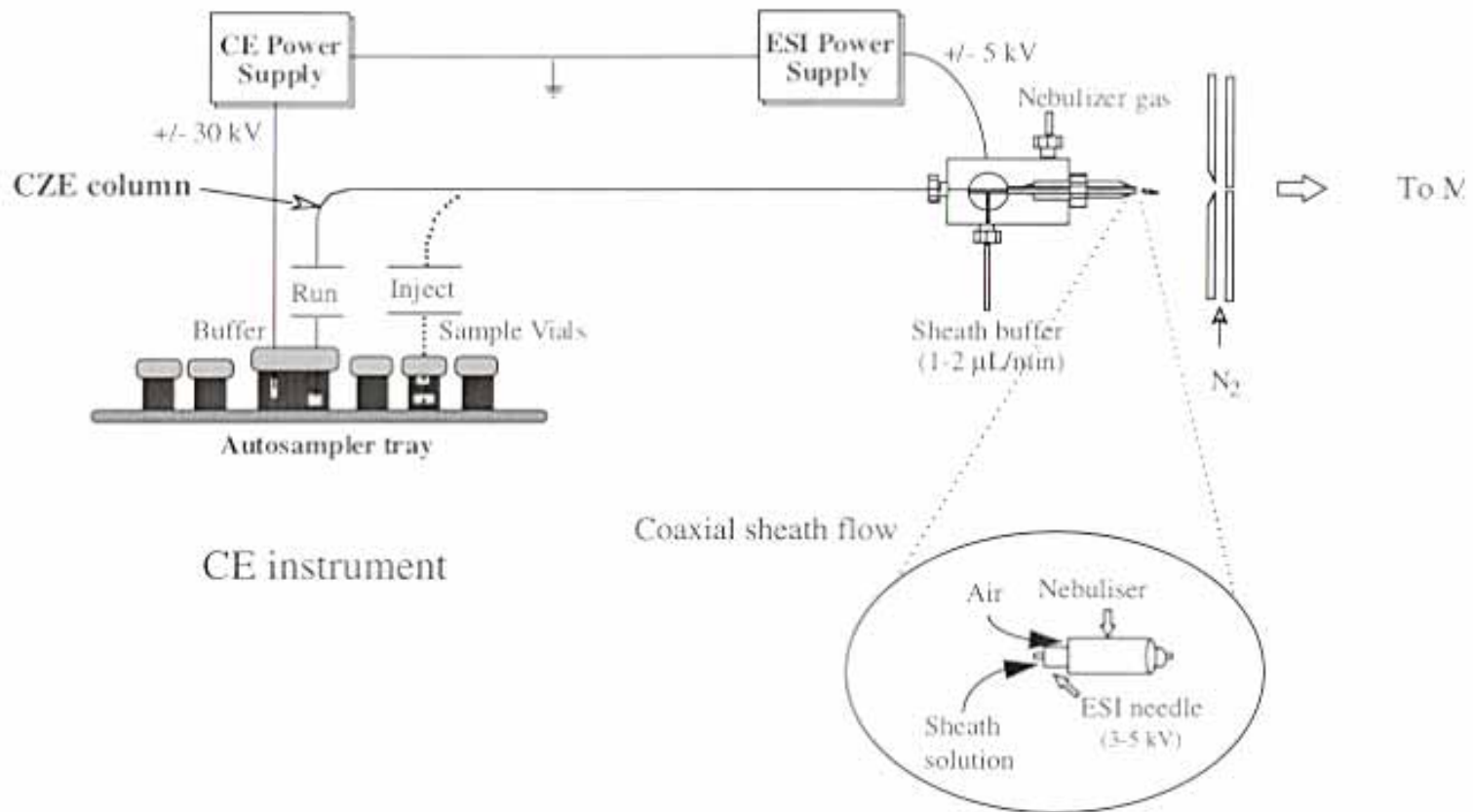
# Électrophorèse capillaire

## □ Interface avec spectrométrie de masse



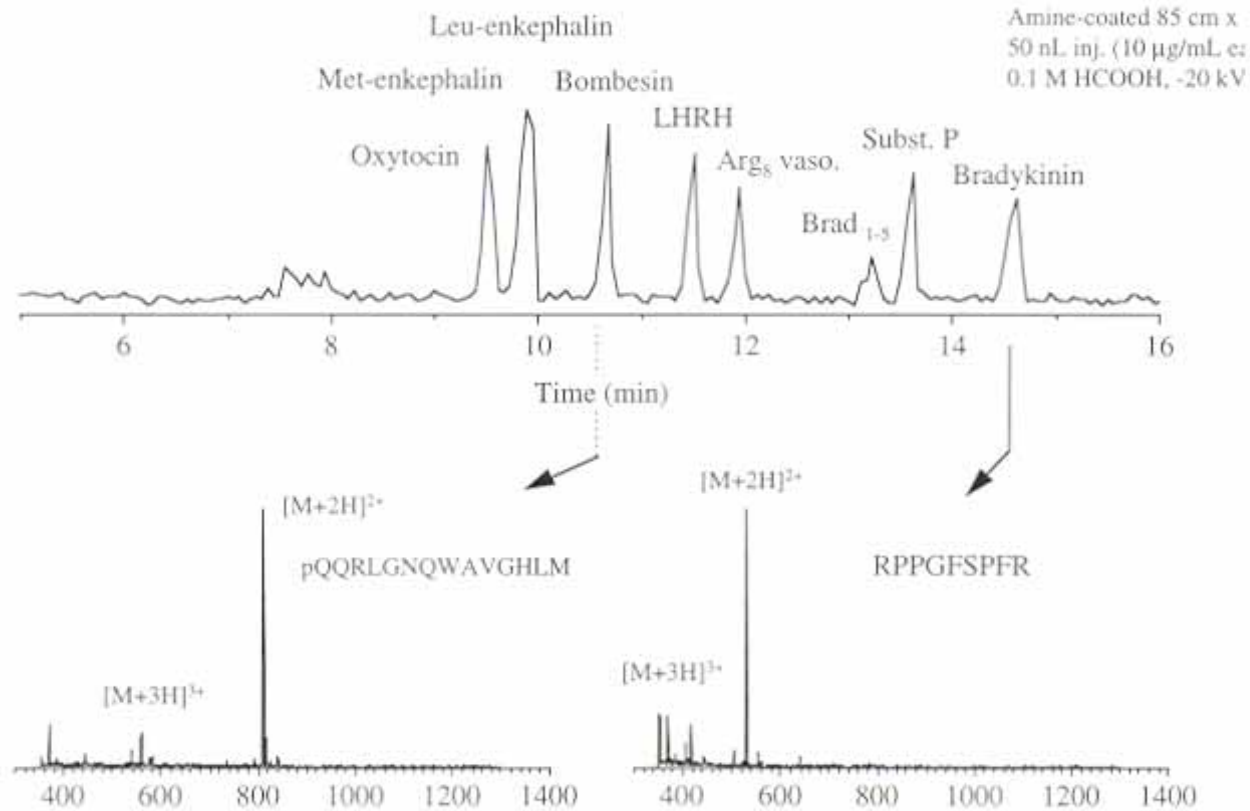
# Électrophorèse capillaire

## □ Interface avec spectrométrie de masse



# Électrophorèse capillaire

- Interface avec spectrométrie de masse



# Électrophorèse capillaire

## Sensibilité des différents détecteurs

Method	Mass detection limit (moles)	Concentration detection limit (molar)*	Advantages/ disadvantages
UV-Vis absorption information	$10^{-13}$ - $10^{-15}$	$10^5$ - $10^8$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Universal</li> <li>• Diode array offers spectral</li> </ul>
Fluorescence	$10^{-15}$ $10^{-11}$	$10^7$ - $10^9$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sensitive</li> <li>• Usually requires sample derivatization</li> </ul>
Laser-induced fluorescence	$10^{-18}$ - $10^{-20}$	$10^{-14}$ - $10^{-16}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Extremely sensitive</li> <li>• Usually requires sample derivatization</li> <li>• Expensive</li> </ul>
Amperometry	$10^{-18}$ - $10^{-19}$	$10^{-10}$ - $10^{-11}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sensitive</li> <li>• Selective but useful only for electroactive analyses</li> <li>• Requires special electronics and capillary modification</li> </ul>
Conductivity	$10^{-15}$ - $10^{-16}$	$10^7$ - $10^8$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Universal</li> <li>• Requires special electronics and capillary modification</li> </ul>
Mass spectrometry	$10^{-16}$ - $10^{-17}$	$10^8$ - $10^9$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sensitive and offers structural information</li> <li>• Interface between CE and MS complicated</li> </ul>
Indirect UV, fluorescence, amperometry	10-100 times less than direct method	—	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Universal</li> <li>• lower sensitivity than direct methods</li> </ul>
Others: Radioactivity, thermal lens, refractive index, circular dichroism, Raman			
*assume 10 nL injection volume			

*HPCE – An introduction*  
**D. Heiger**