

# Chromatographie en phase liquide

## Appareillage et applications

par **Marcel CAUDE**

*Ingénieur du Conservatoire National des Arts et Métiers (CNAM)*

*Docteur ès Sciences*

*Directeur de Recherche au Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)*

et **Alain JARDY**

*Ingénieur CNAM*

*Docteur ès Sciences*

*Maître de Conférences à l'École Supérieure de Physique et Chimie de Paris*

<b>1. Appareillage</b> .....	PE 1 456 – 2
1.1 Contraintes technologiques.....	— 2
1.2 Systèmes de pompage .....	— 3
1.2.1 Caractéristiques .....	— 3
1.2.2 Gradient d'éluion.....	— 4
1.3 Injecteurs.....	— 4
1.4 Colonnes et connexions.....	— 5
1.5 Détecteurs .....	— 5
1.5.1 Caractéristiques d'un détecteur .....	— 6
1.5.2 Spectrophotomètre UV-visible .....	— 7
1.5.3 Spectrofluorimètre .....	— 7
1.5.4 Réfractomètre différentiel.....	— 9
1.5.5 Détecteur électrochimique.....	— 9
1.5.6 Détecteur à diffusion de la lumière (DDL) .....	— 10
1.5.7 Autres détecteurs .....	— 11
<b>2. Exemples d'applications</b> .....	— 11
2.1 Analyse des acides aminés dans des matrices complexes .....	— 11
2.2 Analyse de micropolluants organiques dans les eaux.....	— 14
<b>Pour en savoir plus</b> .....	Doc. PE 1 458

**L**a chromatographie en phase liquide sur colonnes est devenue un outil analytique performant utilisé dans des domaines variés. Ce développement est dû à la fois à une meilleure compréhension des mécanismes d'interaction – au demeurant de plus en plus diversifiés –, aux grandes efficacités obtenues avec des phases stationnaires de plus en plus fines (3  $\mu\text{m}$ ) et enfin aux progrès importants effectués dans le domaine de l'appareillage, en particulier pour la détection.

La chromatographie en phase liquide couvre un vaste domaine d'applications que l'on peut scinder en quatre grands thèmes : pétrochimie, environnement, pharmacie et fluides biologiques, produits alimentaires et agroalimentaires (les séparations d'isomères optiques, l'analyse de composés inorganiques et de polymères font l'objet d'autres articles de ce traité).

Nous nous contenterons, devant l'abondance de la littérature, de donner pour chaque thème des références d'ouvrages et articles récents de synthèse et, à titre d'exemple, nous développerons deux applications caractéristiques.

# 1. Appareillage

Le principe d'un chromatographe en phase liquide est représenté sur la figure 1. Les éléments en trait plein permettent d'opérer en

régime isocratique (c'est-à-dire à composition de phase éluante constante) ; on peut y adjoindre les éléments en tireté pour permettre la mise en œuvre de l'éluion graduée, de l'automatisation des analyses, de l'analyse quantitative et du fractionnement de l'effluent (chromatographie semi-préparative).

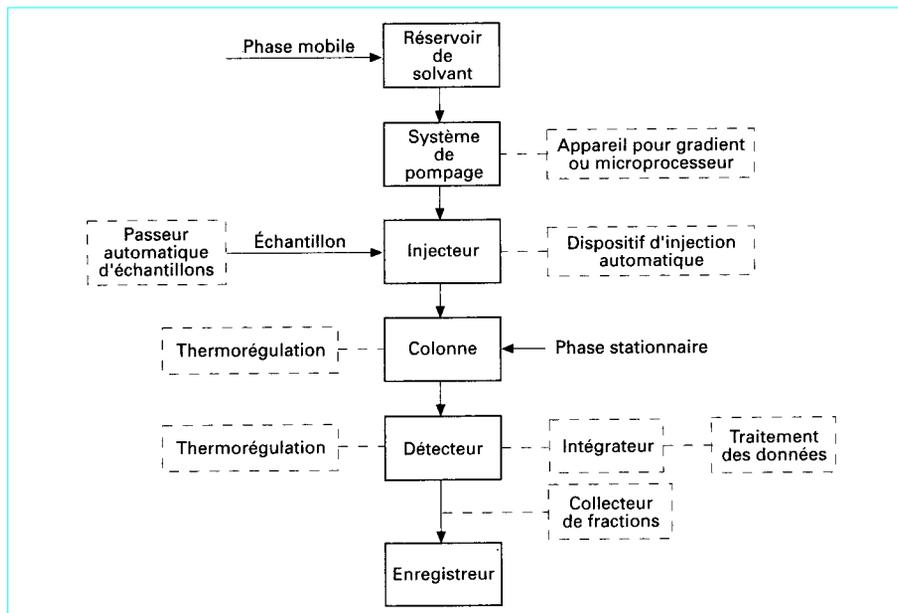


Figure 1 – Schéma de principe d'un chromatographe en phase liquide

En général, l'ensemble de ces éléments est piloté à l'aide de microprocesseurs.

## 1.1 Contraintes technologiques

La mise en œuvre de phases stationnaires de granulométrie de plus en plus fine ayant considérablement amélioré l'efficacité des colonnes implique de limiter la dispersion des bandes des solutés à l'extérieur de la colonne chromatographique. Les contraintes portent aussi bien sur l'injection, les connexions et raccords que sur la détection. En effet, le nombre de plateaux mesuré  $N$  sur un chromatogramme est donné par la relation :

$$N_{\text{mesuré}} = \left( \frac{V_R}{\sigma_T} \right)^2$$

avec  $V_R$  volume de rétention du pic considéré,  
 $\sigma_T$  écart-type volumique total,

$$\sigma_T^2 = \sigma_{\text{col}}^2 + \sigma_{\text{inj}}^2 + \sigma_{\text{det}}^2 + \sigma_{\text{conn}}^2$$

- $\sigma_T^2$  = variance totale,
- $\sigma_{\text{col}}^2$  = variance due à la colonne,
- $\sigma_{\text{inj}}^2$  = variance due à l'injection,
- $\sigma_{\text{det}}^2$  = variance due au détecteur,
- $\sigma_{\text{conn}}^2$  = variance due aux raccords et tubes de connexion.

Chaque variance traduit l'effet du facteur correspondant sur la dispersion de la bande du soluté.

Si les variances extérieures à la colonne ne sont pas négligeables devant celle de la colonne, alors  $N_{\text{mesuré}} \ll N_{\text{col}}$ .

La limitation des effets extracolonne implique, entre autres, celle des volumes d'injection et de la cellule du détecteur. Ainsi, pour limiter la perte d'efficacité due à chacun de ces deux facteurs à 5 %, on montre que les volumes d'injection  $V_{\text{inj}}$  et de la cellule du détecteur  $V_{\text{det}}$  doivent être tels que :

$$V_{\text{inj}} \text{ et } V_{\text{det}} \leq 0,5 \sigma_{\text{col}}$$

Un même raisonnement concernant la constante de temps  $\tau$  du détecteur montre que celle-ci doit être optimisée en fonction de l'écart-type de la colonne et du débit  $\mathcal{D}$  de la phase éluante selon la relation :

$$\tau \leq \frac{0,22 \sigma_{\text{col}}}{\mathcal{D}}$$

Enfin, dans le cas des tubes de connexion, on montre que la variance est proportionnelle au produit  $d_{\text{tube}}^4 \cdot L_{\text{tube}}$ . Il en résulte la nécessité de raccorder les différents éléments du chromatographe au moyen de tubes capillaires. Les contraintes sont d'autant plus

sévères que le volume du pic d'élué et la rétention du soluté sont plus faibles comme l'illustre l'exemple ci-après.

**Exemple :** soit une colonne de 20 cm de longueur et de 0,46 cm de diamètre intérieur contenant 10 000 plateaux théoriques et ayant une porosité totale  $\varepsilon$  de 0,75.

Le volume de phase mobile  $V_m$  contenu dans cette colonne est :

$$V_m = \frac{\pi d_c^2}{4} L \varepsilon \approx 2,5 \text{ mL}$$

Considérons deux solutés élués avec des facteurs de capacité  $k'$  respectivement égaux à 1 et 10. Les volumes de rétention  $V_R$  correspondants sont donnés par :

$$V_R = V_m (1 + k'), \text{ soit respectivement } 5 \text{ et } 27,5 \text{ mL.}$$

Il leur correspond un écart-type donné par :

$$\sigma_{\text{col}} = \frac{V_R}{\sqrt{N}}, \text{ soit respectivement } 50 \text{ et } 275 \mu\text{L.}$$

Une perte maximale d'efficacité de 10 % (5 % sur l'injection et sur la détection, en admettant une perte d'efficacité négligeable dans les tubes de connexion) exige que les volumes d'injection et de la cellule du détecteur soient inférieurs à 25  $\mu\text{L}$ . Cette contrainte est satisfaite avec l'appareillage courant (les volumes des cellules de détection sont généralement de l'ordre de 8  $\mu\text{L}$  et les boucles d'injection de 10 ou 20  $\mu\text{L}$ ). Notons qu'une injection d'un volume de 100  $\mu\text{L}$  entraînerait une perte notable d'efficacité pour le seul premier pic d'élué.

En ce qui concerne la constante de temps du détecteur et pour la même colonne utilisée avec un débit de 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , la limitation de la perte d'efficacité à 5 % pour ce seul facteur exigerait que cette constante soit telle que :

$$\tau \leq \frac{0,22 \sigma_{\text{col}}}{D} \text{ soit } 0,66 \text{ s}$$

Cette nouvelle contrainte est aisément satisfaite puisque la majorité des détecteurs ont des constantes de temps réglables entre 0,05 et 2 s.

Remarquons que la mise en œuvre de microcolonnes remplies ayant un diamètre intérieur de 325  $\mu\text{m}$  (colonne en silice fondue) exige, avec les mêmes contraintes, que les volumes d'injection et de détection soient inférieurs à 125 nL ( $k'=1$ ) et 680 nL ( $k'=10$ ). Ces contraintes ne peuvent être remplies qu'avec la mise en œuvre d'un appareillage spécialement adapté (microchromatographes).

## 1.2 Systèmes de pompage

### 1.2.1 Caractéristiques

Les pompes équipant la plupart des chromatographes ont des pressions maximales de refoulement voisines de 400 bar.

Un système de pompage idéal doit réunir les qualités suivantes :

- rendement de la pompe (rapport du débit effectivement délivré au débit demandé) indépendant de la nature du solvant, en particulier avec les solvants apolaires ;
- débit constant et reproductible ;
- absence de pulsations ;
- chambre de mélange très efficace et de faible volume (compositions reproductibles pour les systèmes à plusieurs solvants) ;
- grande gamme de débits (tout en maintenant, pour les forts débits, une pression de refoulement élevée) ;
- faible volume de la chambre du piston pour permettre un changement aisé de solvant ;

— maintien de la pression maximale de refoulement dans le corps de pompe afin d'éviter le dégazage des solvants et pour compenser les différences de compressibilité entre les solvants (ou pour ce dernier aspect, vitesse de remplissage du corps de pompe adaptable).

Ces contraintes ont entraîné la généralisation des pompes à piston à mouvement alternatif assurant l'aspiration et le refoulement de la phase éluante.

Ce système de pompe présente les avantages suivants :

- le volume de solvant délivré n'est pas limité ;
- le volume de la chambre est très faible, ce qui permet la mise en œuvre aussi bien des techniques de recyclage que du mélange de solvants en amont de la pompe dans le cas de l'élué gradué ;
- la régulation du débit est aisée car elle peut se réaliser en modifiant la fréquence du mouvement du piston et/ou le volume de la chambre.

Dans le but de diminuer le nombre de clapets (dont la mouillabilité varie en fonction de la polarité du solvant), un système utilisant un piston décalé pour l'alimentation du solvant (ouvert durant l'aspiration) est proposé (figure 2). Par ailleurs, ce dispositif permet d'opérer à pression constante dans la chambre du corps de pompe.

Ce type de pompe nécessite une filtration soignée des solvants afin d'éviter la détérioration rapide des pistons et des clapets. De même, il présente l'inconvénient de fournir un débit pulsé, mais le montage soit de plusieurs corps de pompe fonctionnant avec un déphasage approprié (deux têtes en opposition ou trois têtes déphasées de 120°), soit de dispositifs d'amortissement, permet d'obtenir un débit de phase liquide sans pulsations. Le schéma d'un système de pompage à deux têtes en opposition et où les pistons sont commandés par une came en forme de cardioïde légèrement modifiée de façon à obtenir un débit rigoureusement sans pulsations est représenté sur la figure 3. Ce dispositif est actuellement adopté par un grand nombre de constructeurs.

Aucune pompe ne fonctionne à débit rigoureusement constant sans dispositif de régulation. Ceux-ci sont fondés sur la mesure en continu de la perte de charge de part et d'autre d'un tube capillaire étalonné, ou d'une colonne remplie de microbilles de verre de granulométrie fine et serrée, ou encore d'une capacité hydraulique. Cette perte de charge corrigée des variations éventuelles de la viscosité est ensuite maintenue constante, par asservissement de la fréquence du piston et/ou du volume de la chambre de la pompe.

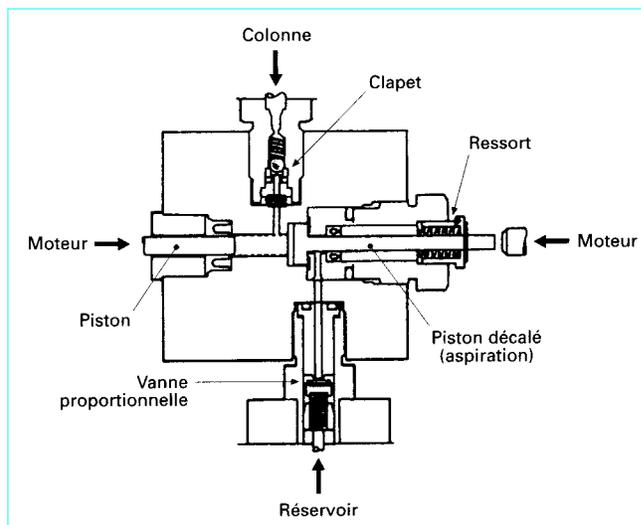


Figure 2 – Corps de pompe utilisant un seul clapet et opérant à pression constante, d'après doc. Varian

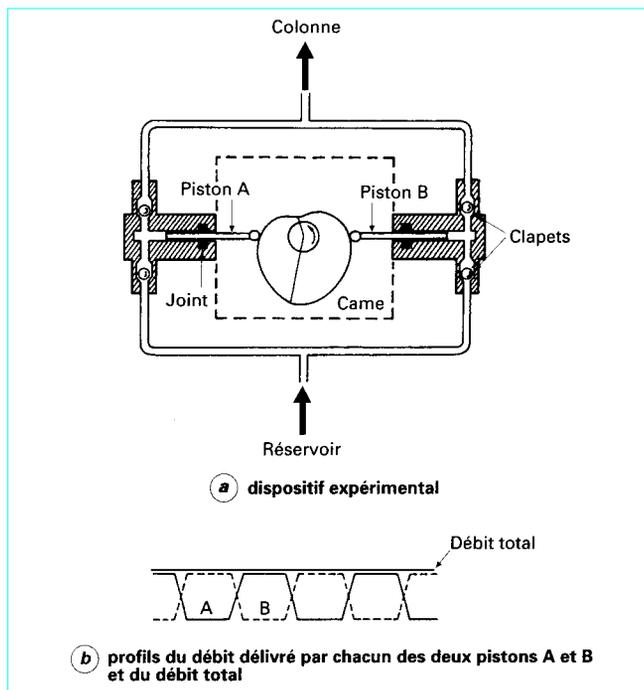


Figure 3 – Pompe à deux têtes montées en opposition et à came en forme de cardioïde

### 1.2.2 Gradient d'élution

L'élution graduée est utilisée pour la séparation de mélanges complexes et permet, en modifiant la composition de l'éluant, d'optimiser les valeurs des facteurs de capacité et, par là, de réduire la durée des analyses tout en limitant la dispersion des bandes de solutés (gain en détectabilité).

Les gradients peuvent être obtenus de deux façons différentes : mélange des solvants en amont de l'unique pompe (vannes proportionnelles à temps d'ouverture programmé) ou en aval des pompes du chromatographe. Ces deux dispositifs sont couramment appelés gradients basse et haute pression. Chaque système possède des avantages et des inconvénients ; toutefois la mise en œuvre du gradient basse pression tend à se généraliser car il minimise le nombre de clapets et partant le coût et les risques de dysfonctionnement dus à la non-étanchéité parfaite de ceux-ci.

De plus, le prémélange des solvants avant l'entrée dans le corps de pompe permet de s'affranchir des phénomènes de contraction de volume éventuels.

### 1.3 Injecteurs

Les pressions élevées en tête de colonne, pouvant atteindre 300 bar, interdisent l'utilisation d'une injection par seringue à travers un septum comme en chromatographie en phase gazeuse [113].

L'échantillon est donc injecté à l'aide de vannes à boucle d'échantillonnage interne ou externe. Les vannes peuvent être utilisées soit manuellement, soit commandées par un passeur automatique d'échantillons, soit encore motorisées de façon à ne permettre l'injection que d'une faible partie du contenu de la boucle d'échantillonnage. Cette dernière disposition permet d'optimiser le signal

d'entrée sur la colonne (élimination de la traînée arrière du créneau d'injection) et partant de conserver l'efficacité maximale de la colonne.

Le principe de fonctionnement d'une vanne d'injection est le suivant : l'échantillon préalablement introduit dans la boucle interne (figure 4) ou externe (figure 5) de volume connu est entraîné par la phase éluante en tête de colonne par rotation de la vanne. Les vannes à boucle interne se prêtent bien à l'injection de petits volumes ( $\leq 1 \mu\text{L}$ ). Les vannes à boucle externe permettent d'injecter de  $1 \mu\text{L}$  (remplissage partiel de la boucle) à plusieurs mL (enrichissement en tête de colonne).

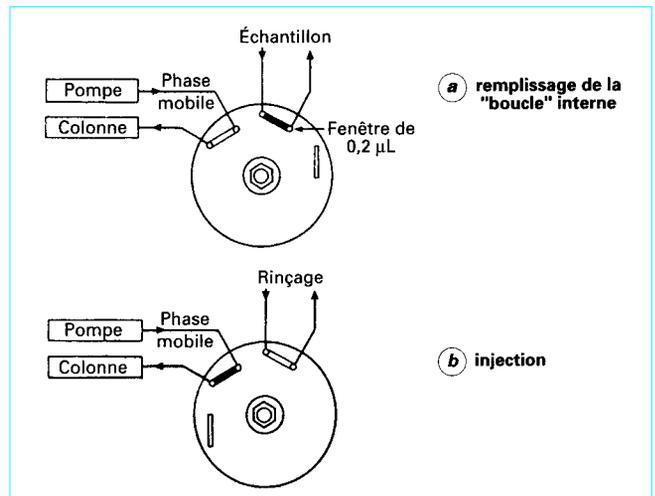


Figure 4 – Vanne d'injection à boucle interne

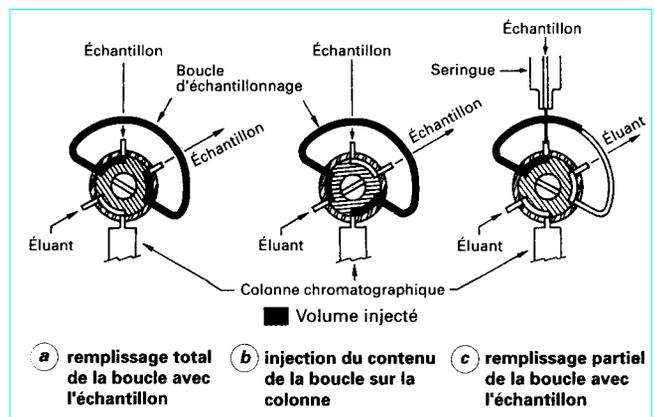
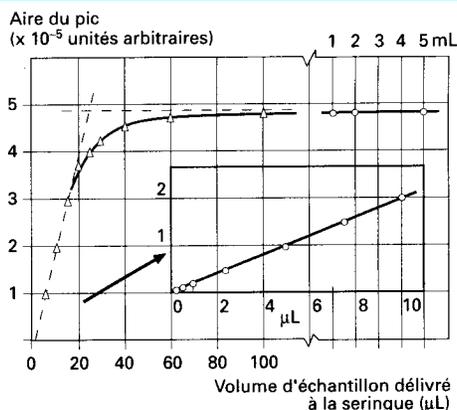


Figure 5 – Vanne d'injection à boucle externe

Le remplissage total de la boucle interne ou externe assure la meilleure reproductibilité du volume d'injection à la condition de s'assurer de la qualité du chargement de la boucle.

En effet, il a été montré expérimentalement que le remplissage parfait de la boucle exige le passage dans celle-ci d'un volume d'échantillon au moins égal à cinq fois son volume nominal (figure 6).

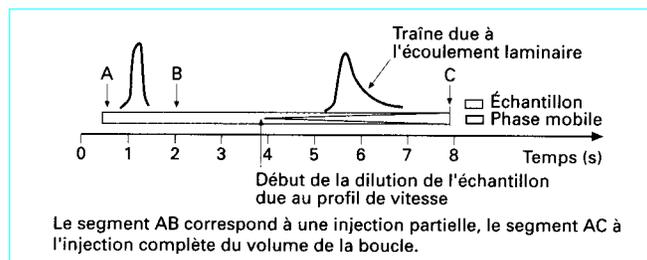
Dans le cas où le volume d'échantillon disponible est insuffisant, il vaut mieux opérer par remplissage partiel de la boucle avec une



**Figure 6 - Variation de l'aire d'un pic d'éluion en fonction du volume d'échantillon utilisé pour le remplissage d'une boucle d'injection externe de 20 µL de volume nominal [85]**

seringue étalonnée (volume injecté inférieur ou égal à la moitié du volume nominal de la boucle).

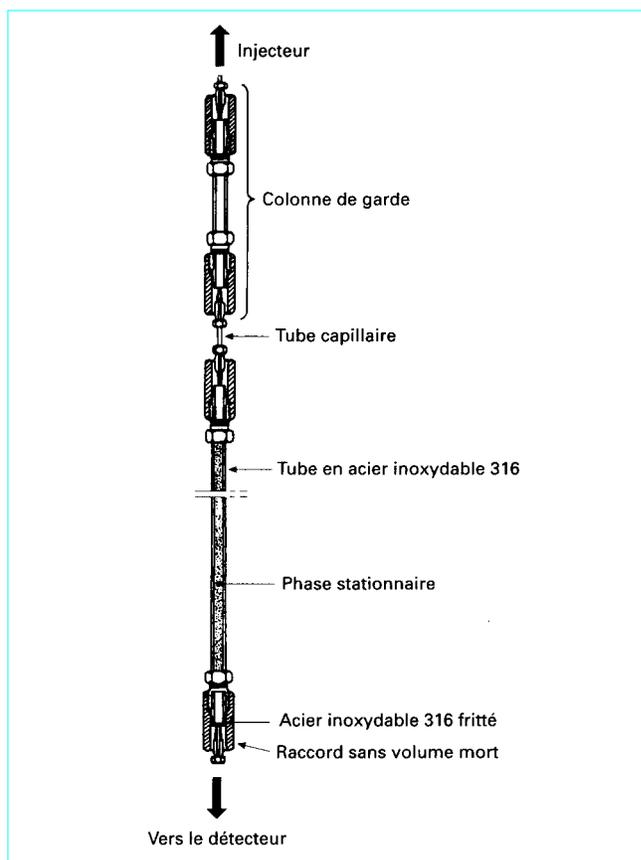
Ce phénomène est dû au fait que, lors du remplissage de la boucle (qui doit être réalisé à vitesse lente), le profil de concentration du soluté dans la boucle épouse le profil de vitesse du liquide dans celle-ci [vitesse très faible le long des parois de la tubulure (figure 7)].



**Figure 7 - Influence du volume injecté et du profil de vitesse sur la dispersion du créneau d'injection selon la fraction du contenu de la boucle injectée [86]**

## 1.4 Colonnes et connexions

Le choix, la construction et le remplissage de la colonne chromatographique revêtent une grande importance, car il ne faut jamais oublier que, quel que soit le degré de sophistication du chromatographe, la qualité d'une séparation est toujours fonction de celle de la colonne qui constitue le cœur du système. Quant aux connexions et raccords, on prendra soin de minimiser leur volume mort. Afin de prolonger l'efficacité et la durée de vie des colonnes, on met souvent en œuvre des colonnes de garde remplies avec la même phase stationnaire que la colonne analytique (figure 8).



**Figure 8 - Colonne chromatographique, d'après doc. Chrompack**

## 1.5 Détecteurs

Ils permettent de visualiser la séparation, voire d'améliorer la sélectivité dans le cas où celle du système chromatographique est insuffisante et, pour les plus performants d'entre eux, d'apporter des informations quant à l'unicité des pics chromatographiques ou encore l'identification des solutés.

Un grand nombre de détecteurs fondés sur des principes différents sont commercialisés compte tenu de l'absence d'un détecteur qui soit à la fois sensible et universel. On peut donc les classer soit selon leur principe de mesure, soit selon le degré d'information qu'ils peuvent apporter.

Dans le premier classement, on distingue les détecteurs mettant en œuvre une propriété spécifique du soluté (détection directe), une propriété spécifique d'un des constituants de l'éluant (détection indirecte) ou une différence de propriété entre le soluté et la phase éluante provoquant des variations au niveau de l'effluent (détection différentielle) (tableau 1).

Dans le second classement, on les regroupe en trois catégories (tableau 2) :

- détecteurs simples, qui n'assurent qu'une visualisation du chromatogramme ;
- détecteurs semi-informatifs, qui fournissent des critères de pureté (mesure du rapport des absorbances à deux longueurs d'onde différentes le long d'un pic d'éluion) ou encore permettent d'optimiser la sélectivité (programmation, dans le temps par exemple, de la longueur d'onde) ;

— « détecteurs intelligents » fournissant des éléments d'identification du soluté (par exemple, spectrophotomètre à barrette de diodes autorisant la mesure et le stockage des spectres UV ou visibles

des espèces éluées puis leur comparaison à ceux d'une bibliothèque).

**Tableau 1 – Classement des modes de détection selon leur principe de mesure et dans l'ordre décroissant d'utilisation**

Détection directe du soluté (1)	Détection indirecte du soluté	Détection différentielle
Absorptiométrie UV et IR Fluorimétrie Électrochimie Diffusion de la lumière Techniques de dérivation Polarimétrie Radioactivité Spectrométrie de masse Résonance magnétique nucléaire Flammes (émission ou absorption)	Absorptiométrie UV (mesure de la diminution de l'absorbance) Fluorimétrie (mesure de la diminution de la fluorescence)	Réfractométrie Conductométrie Permittivité

(1) On admet que l'éluant ne donne aucun signal avec ces modes de détection ou qu'il a été préalablement éliminé

**Tableau 2 – Classement des détecteurs en fonction du degré de l'information fournie**

Détecteurs simples	Détecteurs semi-informatifs	Détecteurs « intelligents »
Spectrophotomètre UV-visible Fluorimètre Réfractomètre Détecteur électrochimique Conductomètre Radioactivité Diffusion de la lumière Réactions de dérivation post- et précolonne Ionisation et émission de flamme Absorption atomique	Spectrophotomètre UV programmable (temps et longueur d'onde) Spectrophotomètre à deux longueurs d'onde Spectrofluorimètre programmable (temps et longueurs d'onde) Détecteur électrochimique programmable et à plusieurs électrodes indicatrices Polarimètre	Spectromètre de masse Spectrophotomètre à barrette de diodes Spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier Spectromètre de résonance magnétique nucléaire

### 1.5.1 Caractéristiques d'un détecteur

Les principales caractéristiques d'un détecteur sont les suivantes :

- bruits à court et à long termes qui conditionnent la détectabilité ;
- dérive, souvent occasionnée par la variation de la température, la variation de la composition de la phase éluante et l'usure de la source lumineuse ;
- sensibilité au débit de la phase éluante et à la pression dans la cuve de détection ;
- domaine de linéarité de la réponse et concentration minimale détectable (le domaine linéaire est défini par le rapport  $C_h/C_{min}$  où  $C_h$  est la limite supérieure du domaine de linéarité définie comme la concentration de la solution du soluté test introduit directement dans la cellule du détecteur fournissant une réponse correspondant

à un écart à la linéarité de 5 %,  $C_{min}$  est la concentration du soluté dont l'introduction directe dans la cellule donne un signal égal à deux fois le bruit de fond à court terme) (figure 9) ;

- sensibilité ; c'est la pente de la partie linéaire de la courbe d'étalonnage ;
- temps de réponse ; c'est le temps nécessaire pour que le signal passe de 10 à 90 % de la réponse à un échelon de concentration correspondant au domaine de linéarité ; ce temps de réponse  $t_{Rep}$  est lié à la constante de temps  $\tau$  par la relation  $t_{Rep} = 2,2 \tau$  ;
- quantité minimale détectable ; c'est la plus petite quantité du soluté qui soit détectable après injection dans la colonne chromatographique. On montre que l'on a  $Q_{min} = C_{min} \cdot \sigma_T \cdot \sqrt{2\pi}$ .

Nous ne présenterons ci-après que les détecteurs les plus couramment utilisés.

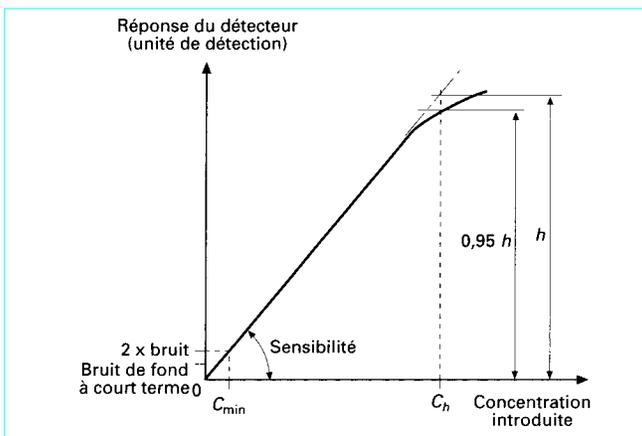


Figure 9 – Variation de la réponse du détecteur en fonction de la concentration de soluté introduite

### 1.5.2 Spectrophotomètre UV-visible

La réponse de ce type de détecteur est fondée sur la loi de Lambert-Beer :

$$A = \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon(\lambda) l^* C$$

avec	$\varepsilon(\lambda)$	absorptivité molaire du soluté à la longueur d'onde $\lambda$ ,
	$I_0$	intensité du rayonnement incident,
	$I$	intensité du rayonnement transmis,
	$l^*$	longueur du chemin optique,
	$C$	concentration du soluté dans l'effluent.

La détectabilité de ce détecteur dépend essentiellement de l'absorptivité du soluté, laquelle peut varier de plusieurs ordres de grandeur selon la nature de celui-ci. Aussi est-il impossible « d'estimer » la teneur d'un soluté à partir de la seule appréciation de l'aire de son pic d'élué sans étalonnage préalable. Pour une absorptivité molaire de  $10\,000 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$  du soluté (valeur moyenne), on atteint des quantités minimales détectables de l'ordre du ng pour une injection de  $5 \mu\text{L}$ . Ce mode de détection est très utilisé dans la mesure où un grand nombre de solutés absorbent dans l'ultraviolet et où des phases éluantes demeurent transparentes jusqu'à des longueurs d'onde de 200 nm.

**Nota :** l'utilisation de très faibles longueurs d'onde implique d'utiliser des solvants de très grande qualité y compris l'eau et soigneusement dégazés afin d'éliminer l'oxygène dissous [88].

La classification en fonction du degré d'information conduit à distinguer :

- les spectrophotomètres dont la longueur d'onde est réglée par l'opérateur ;
- les spectrophotomètres programmables en longueur d'onde et en sensibilité dans le temps ;
- les spectrophotomètres à barrette de diodes permettant une saisie en trois dimensions absorbance – longueur d'onde – temps, ce qui autorise l'identification des solutés par comparaison de leur spectres UV avec ceux stockés dans une bibliothèque ou encore la mise en œuvre d'un critère de pureté du soluté correspondant à un pic d'élué. Ce dernier est fondé sur une combinaison des absorbances mesurées à différents endroits du pic d'élué et à différentes longueurs d'onde.

Mentionnons enfin que le domaine de mise en œuvre de la spectrophotométrie UV-visible peut être étendu, dans le cas de solutés

transparents, par l'utilisation de réactions de dérivation pré- ou post-colonne (§ 1.5.3 et [89]). Quant à la spectrophotométrie infrarouge, elle n'a reçu que très peu d'applications dans le domaine de la CPL du fait de la non-transparence des solvants couramment utilisés. C'est une différence importante avec la chromatographie en phase supercritique où le dioxyde de carbone présente un large domaine de transparence particulièrement dans la région dite des empreintes digitales [114].

### 1.5.3 Spectrofluorimètre

Ce mode de détection a une grande sélectivité et une grande sensibilité. Le principe de la méthode est le suivant : certains composés organiques absorbent des radiations dans l'ultraviolet et réémettent une fraction de la lumière absorbée à une longueur d'onde supérieure (fluorescence naturelle).

La loi fondamentale de la fluorimétrie indique que l'intensité  $I_f$  du rayonnement émis par fluorescence est proportionnelle, pour un volume de solution donné, à l'intensité lumineuse absorbée :

$$I_f = k I_{\text{abs}} = k (I_0 - I)$$

Si, par ailleurs, la loi de Lambert-Beer est valable pour l'absorption de l'intensité incidente, on peut calculer :

$$\frac{I_0}{I} = 10^{\varepsilon l^* C} \quad I_f = k I_0 (1 - 10^{-\varepsilon l^* C})$$

si  $\varepsilon l^* C$  est faible (faible concentration et faible épaisseur traversée) :

$$10^{-\varepsilon l^* C} \approx 1 - 2,3 \varepsilon l^* C$$

$$I_f \approx 2,3 k I_0 \varepsilon l^* C = a C$$

La réponse de ce type de détecteur n'est donc linéaire en fonction de la concentration qu'aux faibles valeurs de celle-ci, ce qui justifie l'emploi de ce mode de détection pour l'analyse de traces, où la sensibilité est supérieure à celle de l'absorptiométrie. En effet, en fluorimétrie, on opère par mesure directe de l'intensité lumineuse, tandis qu'en absorptiométrie on effectue une mesure relative  $\lg(I_0/I)$ . Ainsi, les quantités minimales détectables des composés présentant une forte fluorescence peuvent être de l'ordre de quelques femtomoles ( $10^{-15}$  mole) injectées.

Un schéma de principe des spectrofluorimètres est donné sur la figure 10. On distingue trois types d'appareils :

- les spectrofluorimètres munis d'un monochromateur à l'excitation et d'un filtre à l'émission,
- les spectrofluorimètres munis de monochromateurs à l'excitation et à l'émission,
- les spectrofluorimètres à commutation de gammes automatique et programmables en longueurs d'onde dans le temps permettant d'optimiser à la fois la sensibilité et la sélectivité [57, 90].

Pour abaisser la concentration minimale détectable, on peut diminuer le bruit de fond soit en substituant une excitation par rayonnement laser à la source lumineuse classique [91], soit en utilisant une excitation chimique à la place de l'excitation lumineuse (**chimiluminescence**). On distingue la chimiluminescence directe où la lumière est émise par le réactif lui-même (luminol par exemple) et la chimiluminescence indirecte où la lumière est émise par un fluorophore différent, à qui l'énergie d'excitation nécessaire a été transmise par un intermédiaire réactionnel issu d'une réaction chimique [92].

La fluorimétrie est un mode de détection très sensible mais très sélectif (peu de molécules sont naturellement fluorescentes). On peut en étendre le champ d'application grâce aux techniques de dérivation pré- ou post-colonne qui permettent de modifier les molécules afin de les rendre fluorescentes.

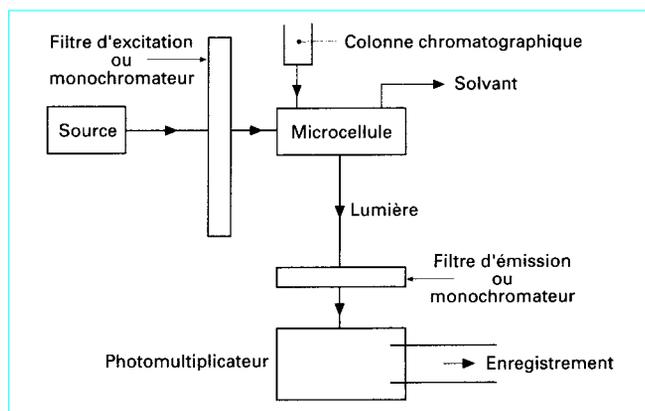


Figure 10 – Principe d'un spectrofluorimètre

### ■ Dérivations pré- et postcolonne

Dans le cas d'une réaction de dérivation précolonne, le soluté est modifié avant son injection sur la colonne chromatographique. Dans le cas d'une réaction postcolonne, le réactif est ajouté en continu en sortie de colonne et la réaction se développe dans un réacteur placé entre la chambre de mélange et le détecteur (figure 11). L'adjonction de ces deux éléments peut entraîner un élargissement des pics d'éluion, aussi convient-il de minimiser l'ensemble des volumes morts. Les volumes de la chambre de mélange et du réacteur doivent être adaptés aux caractéristiques de la séparation. D'autre part, afin de ne pas augmenter le bruit au niveau de la détection, la pompe d'addition du réactif doit délivrer un flux exempt de pulsations. La durée de la réaction est régie par le type et la longueur du réacteur. Pour des durées inférieures à 30 s, on utilise des réacteurs tubulaires enroulés, pour des temps de réaction inférieurs à 5 min des réacteurs à remplissage de microbilles de verre et, au-delà, un réacteur à flux segmenté [93].

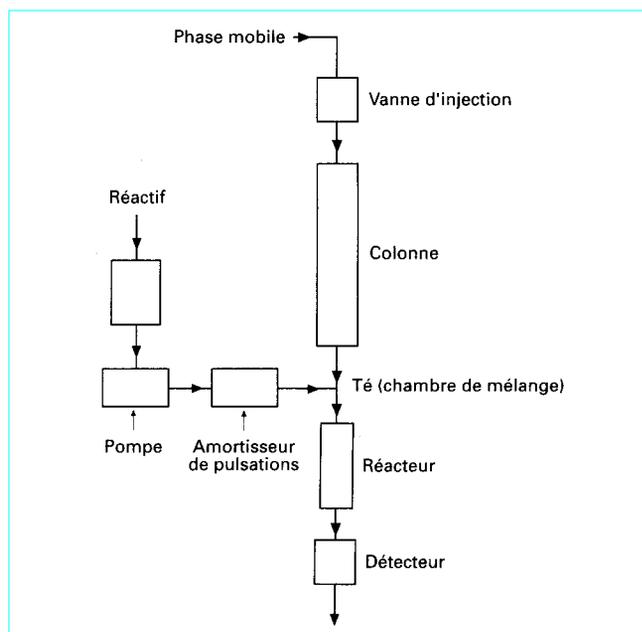


Figure 11 – Principe d'un dispositif de dérivation postcolonne

Les avantages et les inconvénients des dérivations pré- et postcolonne sont rassemblés dans le tableau 3.

Tableau 3 – Dérivations pré- et postcolonne : avantages et inconvénients	
Avantages	Inconvénients
Dérivations précolonne	
Libre choix des conditions de la réaction	Solutés non chromatographiés sous leur forme initiale
Possibilité de réactions à cinétique lente	Chaque soluté peut donner plusieurs sous-produits de réaction (augmentation de la complexité du chromatogramme)
Possibilité d'élimination de l'excès de réactif	La réaction doit être sinon quantitative, du moins reproductible
Adaptation des propriétés chromatographiques du soluté à la phase stationnaire préalablement choisie	
Dérivations postcolonne	
Formation d'artéfacts non gênante	Appareillage plus complexe
Utilisation possible de plusieurs modes de détection en série (avant et après dérivation par exemple)	La phase mobile doit être compatible avec la réaction chimique
Réaction complète non nécessaire lorsqu'elle est reproductible	La cinétique de réaction doit être suffisamment rapide
Pas de discrimination et absence de pollution de l'échantillon	Le soluté dérivé doit être décelable dans des conditions différentes de celles du réactif (du fait de l'excès de ce dernier)
	La réaction de dérivation peut provoquer un élargissement plus ou moins important des pics chromatographiques, détériorant la qualité de la séparation

### 1.5.4 Réfractomètre différentiel

Le réfractomètre différentiel mesure en continu la différence d'indice de réfraction entre la phase mobile et l'effluent de la colonne chromatographique. La limite de détection dépend à la fois de la nature du soluté et de celle de la phase éluante. En effet, la réponse  $R_1$  du réfractomètre est donnée par la relation :

$$R_1 = Z (n - n_0)$$

avec  $Z$  constante caractéristique de l'appareil,  
 $n$  indice de réfraction de l'effluent,  
 $n_0$  indice de réfraction de la phase éluante.

L'indice de réfraction de l'effluent peut être calculé en première approximation par la relation

$$n = n_i p_i + n_0 (1 - p_i)$$

où  $n_i$  est l'indice de réfraction du soluté  $i$  pur et  $p_i$  la fraction massique du soluté  $i$  dans l'effluent.

Des deux relations précédentes, il vient :

$$R_1 = Z p_i (n_i - n_0)$$

Avec un bruit de fond exprimé en unité d'indice de réfraction ( $R_1 / Z$ ) égal à  $10^{-7}$ , une différence d'indice de réfraction entre la phase éluante et l'effluent égale à 0,1 unité et une injection de 5  $\mu\text{L}$  et un facteur de dilution de 25, la quantité minimale détectable est de l'ordre de 100 à 200 ng donc beaucoup plus importante qu'en absorptiométrie dans l'ultraviolet où elle est de l'ordre du nanogramme.

La réfractométrie différentielle présente d'autres inconvénients. Le plus important est sa grande sensibilité aux variations de température et de pression en raison de la variation de l'indice de réfraction en fonction de la densité des solvants.

Les variations des indices de réfraction des principaux solvants utilisés en CPL en fonction de la température et de la pression sont représentées dans le tableau 4. Elles montrent que, pour limiter le bruit de fond à  $10^{-7}$  unité d'indice de réfraction, il faut réguler la température à quelques  $10^{-4}$  °C près, ce qui implique l'emploi d'un ultrathermostat et d'un échangeur de chaleur dans le réfractomètre.

**Tableau 4 – Indice de réfraction de quelques solvants : influence de la température et de la pression**

Solvants	Indice de réfraction $n$ à 20 °C	$a = -dn/dT$ ( $\text{K}^{-1} \times 10^4$ )	Domaine de validité de $a$	$b = dn/dp$ ( $\text{bar}^{-1} \times 10^5$ )
<i>n</i> -Pentane.....	1,3577	5,9	- 50 à 30 °C	
<i>n</i> -Hexane.....	1,3749	5,0	- 10 à 50 °C	6,56
<i>n</i> -Heptane.....	1,3876			
Isooctane.....	1,3916	5,1	- 100 à 100 °C	
Éther diisopropylique.....	1,3679			
Dichlorométhane.....	1,4244	6,8	- 10 à 60 °C	5,56
Chloroforme.....	1,4476			
Acétate d'éthyle.....	1,3719			
Acétonitrile.....	1,3441	4,4	15 à 30 °C	
Chlorobenzène.....	1,5248			
Méthanol.....	1,3288	2,9	15 à 20 °C	
Éthanol.....	1,3611	4,2		4,1
Isopropanol.....	1,3776	6,0	15 à 20 °C	
Eau.....	1,3330	0,7	20 à 30 °C	15

En revanche, l'influence des variations de pression est moins critique : la même qualité de bruit de fond exige une régulation de la pression à  $2 \times 10^{-3}$  bar près. Par contre, les indices de réfraction variant de quelques dixièmes d'unité, l'élution graduée ne peut être mise en œuvre avec ce détecteur.

Les réfractomètres sont de trois types :

— le réfractomètre de Fresnel (basé sur la réflexion de Fresnel : la fraction de lumière réfléchie ou transmise par une interface verre-liquide est proportionnelle aux indices de réfraction des deux substances) ;

— le réfractomètre à déviation (la déviation d'un faisceau lumineux traversant une cellule séparée en deux compartiments de forme triangulaire par une cloison en verre, chaque compartiment contenant un liquide différent, est fonction de la différence d'indices des deux liquides) ;

— le réfractomètre interférométrique (la différence des vitesses de la lumière dans les deux liquides est mesurée à l'aide d'un interféromètre).

Contrairement à la détection spectrophotométrique, où une très faible perte de charge calibrée est souvent placée à la sortie de la cellule afin d'éviter le dégazage de l'effluent dans celle-ci, ce dispositif ne doit pas être utilisé avec la détection réfractométrique en raison de l'extrême fragilité des cellules (prismes en verre collés traversés par l'influent et l'effluent).

Dans le cas de l'utilisation en série de plusieurs détecteurs, il convient de placer le réfractomètre en dernier pour la raison pratique précédente (absence de perte de charge) et pour limiter les effets extracolonne entraînés par le dispositif interne de thermorégulation de l'effluent.

### 1.5.5 Détecteur électrochimique

La détection électrochimique met à profit le fait que de nombreux solutés peuvent être oxydés ou réduits à une électrode portée au potentiel adéquat ; pour ce faire, il faut que l'effluent de la colonne

chromatographique soit suffisamment conducteur pour permettre le passage du courant.

C'est le cas en chromatographie d'échange d'ions, de paires d'ions où l'on utilise des phases éluantes naturellement conductrices, et souvent en chromatographie de partage à polarité de phases inversée.

### ■ Principe et choix de la méthode de détection

Considérons une substance électroactive contenue dans un liquide en mouvement au contact d'une électrode ; la charge  $Q$  échangée avec l'électrode est donnée par la loi de Faraday :

$$Q = n_e F N_m$$

avec  $n_e$  nombre d'électrons mis en jeu dans la réaction électrochimique d'oxydation ou de réduction ( $A \pm n_e e \rightleftharpoons B$ ),

$F$  constante de Faraday,

$N_m$  nombre de moles de substance transformées.

Le courant  $i_t$ , qui circule dans la cellule d'électrolyse à l'instant  $t$  est :

$$i_t = \frac{dQ}{dt} = n_e F \frac{dN_m}{dt}$$

$i_t$  est proportionnel au nombre de moles transformées par unité de temps. On a encore :

$$i_t = n_e F (C_i - C_f) \mathcal{D}$$

avec  $C_i$  concentration de la substance électroactive à l'entrée de la cellule ( $\text{mol.L}^{-1}$ ),

$C_f$  concentration de la substance électroactive à la sortie de la cellule ( $\text{mol.L}^{-1}$ ),

$\mathcal{D}$  débit de liquide à travers la cellule ( $\text{L.s}^{-1}$ ).

On peut, a priori, utiliser deux méthodes pour réaliser un détecteur électrochimique [94, 95] :

— soit s'efforcer de réaliser une électrolyse totale du soluté lors de son passage dans la cellule d'électrolyse ( $C_f = 0$ ) : le détecteur est dit **coulométrique** ; il nécessite une grande surface de contact entre le soluté et l'électrode, ce qui implique d'utiliser des électrodes poreuses traversées par l'effluent, permettant d'obtenir un rapport surface/volume très élevé ;

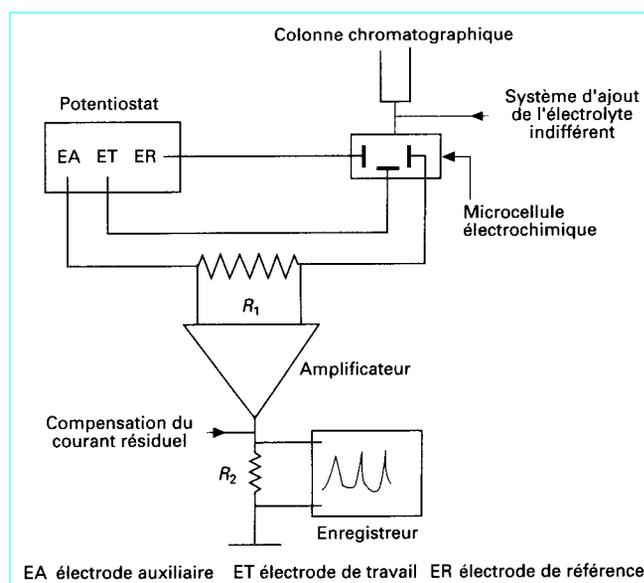
— soit effectuer une électrolyse partielle ne transformant qu'une fraction du soluté (< 10 %) lors de son passage dans la cellule : le détecteur est dit **ampérométrique à électrolyse partielle** ; il faut alors que la fraction de soluté électrolysée soit constante (elle dépend de la géométrie de la cellule, du débit de la phase mobile, de la viscosité, de la température, etc.) et on a :

$$i_t = n_e F C_i \left(1 - \frac{C_f}{C_i}\right) \mathcal{D}$$

Si  $C_f/C_i$  est constant,  $i_t$  est proportionnel à  $C_i$ . On doit évidemment procéder par étalonnage.

Généralement, la détection électrochimique est mise en œuvre à l'aide d'un montage à trois électrodes, dont le schéma est donné figure 12.

Compte tenu de la grande difficulté d'élimination de l'oxygène dissous, qui est électroactif, l'essentiel des applications fait appel à des réactions d'oxydation. Le matériau d'électrode le plus utilisé est le carbone vitreux parfaitement poli (au moyen d'une pâte diamantée 1  $\mu\text{m}$ ) ou réticulé (électrode poreuse pour détecteur coulométrique). Certaines applications font appel à des électrodes d'or comme pour la détection de sucres et d'acides aminés (la détection électrochimique fait intervenir ici des courants catalytiques et la formation transitoire d'oxydes d'or [96]).



**Figure 12 – Principe d'un montage à trois électrodes avec amplification du courant d'électrolyse et compensation du courant résiduel**

Pour déterminer le potentiel le mieux adapté à la détection d'un soluté (la sensibilité maximale correspond à un potentiel situé sur le palier de diffusion de l'espèce considérée), on a intérêt à déterminer la courbe intensité-potential ou encore à opérer par voltampérométrie cyclique sur une électrode de même nature que l'électrode de travail du détecteur [115].

Le domaine d'application de la détection électrochimique est très vaste comme le montre la figure 13 et concerne, en particulier, le domaine biomédical [97, 98]. Il peut encore être élargi par la mise en œuvre de réactions de dérivation [99].

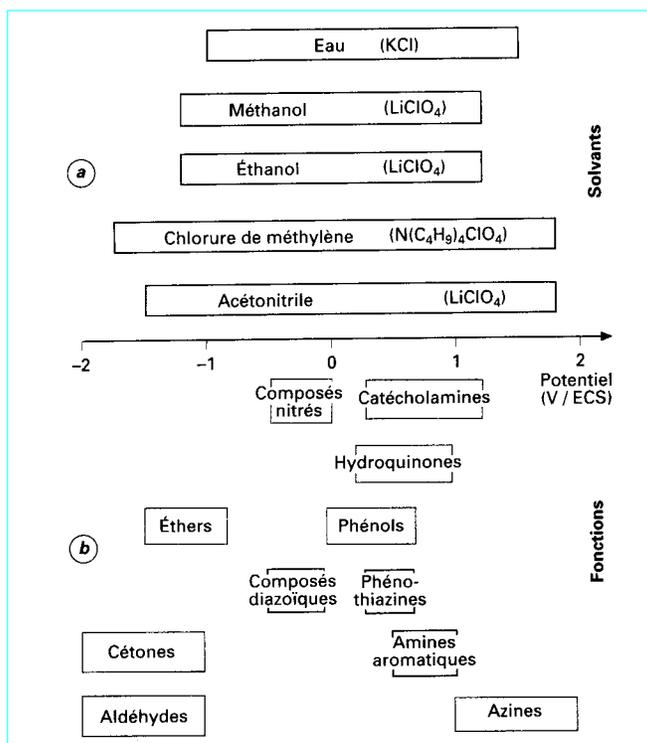
La mise en œuvre de plusieurs électrodes de travail disposées en série ou en parallèle portées à des potentiels différents permet d'augmenter soit la sensibilité, soit la spécificité si la sélectivité chromatographique est insuffisante, soit encore le degré d'information à des fins d'identification ou de contrôle de l'unicité du pic d'élué.

### 1.5.6 Détecteur à diffusion de la lumière (DDL)

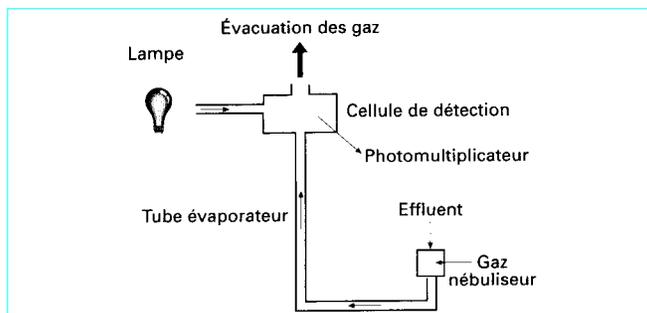
Le principe de ce détecteur est fondé sur l'évaporation partielle de l'effluent de la colonne chromatographique de façon à obtenir un brouillard de particules solides ou liquides du soluté qui traverse un faisceau lumineux. La lumière diffusée sous un angle déterminé est détectée par un photomultiplicateur.

L'appareillage comporte trois parties distinctes (figure 14) : un nébuliseur pneumatique dans lequel se forme un brouillard de gouttelettes de diamètre homogène, un tube chauffé où se produit l'évaporation de la phase éluante et une cellule de détection traversée par le faisceau lumineux. La lumière diffusée par le fin brouillard de particules solides ou liquides est recueillie sur un photomultiplicateur et constitue le signal de détection.

La mise en œuvre de ce détecteur est limitée à l'emploi de phases éluantes volatiles et de solutés non volatils. En revanche, il est parfaitement compatible avec un gradient d'élué, ce qui le rend très complémentaire du réfractomètre différentiel. Sa réponse dépend de la population et de la taille des particules provoquant la diffusion de la lumière. Elle n'est pas directement proportionnelle à la quan-



**Figure 13 – Domaines d'électroactivité des principaux solvants et électrolytes indifférents utilisés en détection électrochimique (a) et intervalles de potentiel adaptés à la détection de grandes familles de composés organiques (b)**



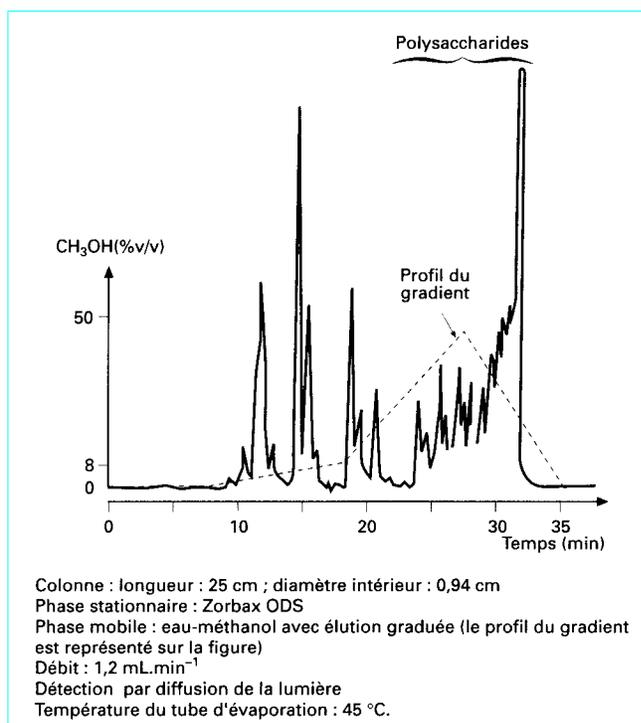
**Figure 14 – Principe d'un détecteur à diffusion de la lumière**

tité injectée [100] mais suit une loi complexe qui dépend des mécanismes de diffusion de la lumière mis en jeu ; la réponse peut cependant être linéarisée en coordonnées logarithmiques [101]. La pente de la droite obtenue dépend des mécanismes de diffusion, donc du diamètre des particules ; elle varie de 1 à 2 en fonction des différents systèmes de nébulisation utilisés [102].

D'un point de vue pratique, la sensibilité du détecteur à diffusion de la lumière varie peu en fonction de la nature des solutés, ce qui le rend intéressant dans le cas de l'analyse de solutés inconnus. Le domaine d'application est vaste, de l'analyse des fluides biologiques à celle des produits pétroliers [103, 104]. Il présente un intérêt marqué pour l'analyse des sucres, triglycérides, phospholipides dont la séparation requiert la mise en œuvre de gradients d'élution.

Des quantités minimales aussi faibles qu'une vingtaine de nanogrammes ont été détectées [105].

La figure 15 montre la séparation, par chromatographie de partage à polarité de phases inversée, de sucres contenus dans de la bière.



**Figure 15 – Séparation par chromatographie de partage à polarité de phases inversée de sucres contenus dans la bière [104]**

## 1.5.7 Autres détecteurs

Outre les détecteurs classiques précédents, il existe différentes possibilités de couplage parmi lesquelles on peut citer : les spectrométries de masse, de résonance magnétique nucléaire et les détecteurs de radioactivité pour les molécules marquées [1].

## 2. Exemples d'applications

### 2.1 Analyse des acides aminés dans des matrices complexes

L'importance de la séparation des acides aminés tient au fait qu'ils sont les éléments de base des protéines, constituants fondamentaux des cellules vivantes.

De ce fait, ils sont présents dans les différents milieux biologiques. Aux acides aminés classiques s'ajoutent d'autres acides aminés dont la nature dépend soit du milieu biologique, soit de la méthode d'hydrolyse effectuée dans le cas des protéines. A titre d'exemple, la glutamine et l'asparagine sont transformées en acides

correspondants dans les hydrolysats de protéines après l'hydrolyse acide. En revanche, elles sont présentes dans les hydrolysats de protéines ayant subi une hydrolyse enzymatique. On les trouve également dans des échantillons alimentaires (jus de fruits, par exemple). Il est illusoire de vouloir utiliser une méthode différente, adaptée à chaque mélange. Il est, de loin, préférable de disposer d'une méthode unique suffisamment performante pour s'adapter à tous les milieux rencontrés. C'est pourquoi une méthode chromatographique permettant de séparer les 31 acides aminés susceptibles d'être présents dans les fluides physiologiques et les échantillons agroalimentaires a été proposée.

La chromatographie en phase liquide est une méthode de choix pour l'analyse de ces molécules peu volatiles [106]. La séparation et la détection des acides aminés ne peuvent être dissociées car la détection directe par absorptiométrie n'est ni suffisamment sensible ni suffisamment spécifique pour le dosage dans les milieux biologiques.

Deux voies sont possibles : dérivation avant la séparation chromatographique (précolonne) ou après (postcolonne), et deux modes de détection sont principalement utilisés : la spectrophotométrie UV et la spectrofluorimétrie.

La difficulté de la séparation des acides aminés résulte de la variété des molécules concernées qui sont soit purement aliphatiques : glycine, alanine, valine, etc., soit aromatiques : phénylalanine, tyrosine ; elles peuvent, en outre, posséder une fonction alcool : sérine, thréonine ; elles peuvent posséder une deuxième fonction amine : lysine, arginine, etc., ou une deuxième fonction acide : acide aspartique, etc. La fonction amine est souvent primaire, mais elle peut aussi être secondaire dans le cas de la proline. Deux méthodes peuvent être envisagées pour leur séparation :

a) l'une, fondée sur l'influence du pH sur leur degré d'ionisation, met en œuvre la chromatographie d'échange d'ions ; la détection implique une dérivation postcolonne pour former un composé qui absorbe dans l'ultraviolet ou qui soit fluorescent (selon la sensibilité recherchée) ;

b) l'autre est fondée sur la formation préalable de dérivés hydrophobes des acides aminés qui puissent être retenus sur une phase stationnaire apolaire (silice greffée *n*-alkyle). On choisit alors comme dérivés des composés qui puissent être détectés dans l'UV ou le plus souvent par spectrofluorimétrie. Il s'agit, cette fois, de dérivation précolonne. Les réactifs utilisés pour détecter les acides aminés permettent également d'accroître leur hydrophobie.

La méthode dont les résultats sont présentés ici possède une remarquable détectabilité et appartient à la seconde catégorie. Il s'agit d'une dérivation précolonne des acides aminés avec le 9-fluorényl méthylchloroformiate (FMOC) associée à une détection par spectrofluorimétrie [107].

Le FMOC possède l'avantage de réagir aussi bien avec les acides aminés secondaires que primaires. La réaction de dérivation est très rapide (quelques secondes).

Les acides aminés dérivés avec le FMOC acquièrent une hydrophobie suffisante qui permet de réaliser leur séparation par chromatographie de partage à polarité de phases inversée. La détection est effectuée par spectrofluorimétrie ( $\lambda_{\text{ex}} = 265 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 340 \text{ nm}$ ).

Afin de déterminer le profil du gradient d'éluion nécessaire, les acides aminés sont divisés en deux groupes en fonction de leur hydrophobie :

#### GROUPE I : acides aminés les plus hydrophiles

acide cystéique ; arginine ; asparagine ; glutamine ; sérine ; acide aspartique ; acide glutamique ; thréonine ; glycine ; alanine ; proline ; acide  $\gamma$ -aminobutyrique ; méthionine ; valine ; norvaline.

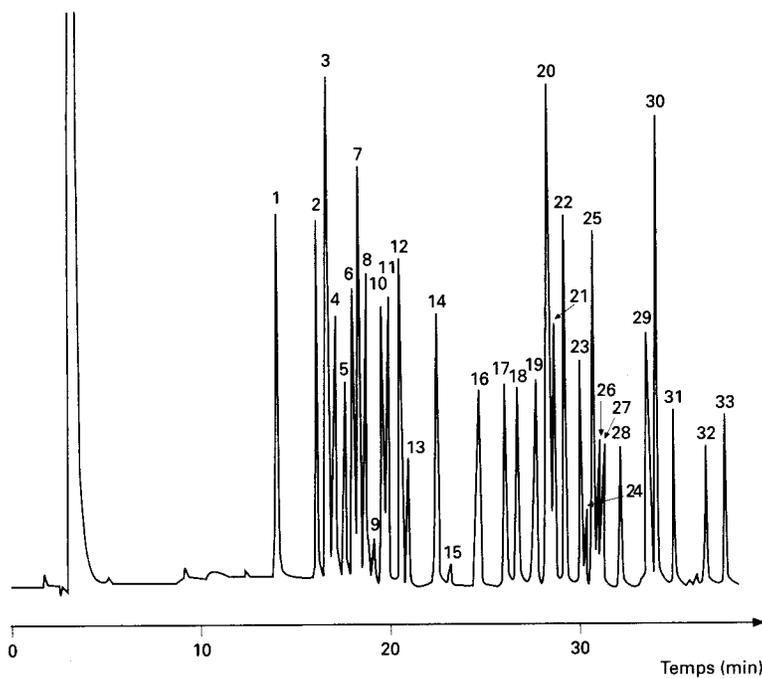
#### GROUPE II : acides aminés les plus hydrophobes

phénylalanine ; tryptophane ; isoleucine ; leucine ; cystine ; hydroxylysine ; histidine ; ornithine ; lysine ; tyrosine.

Pour la séparation du premier groupe, les deux paramètres gouvernant la sélectivité sont le pH et la teneur en acétonitrile. Une résolution satisfaisante peut être obtenue en utilisant simultanément deux gradients, l'un de pH par le mélange en proportions variables de deux tampons citrate, l'autre de la teneur en acétonitrile.

En ce qui concerne le groupe II, un gradient binaire tampon citrate pH 4,5-acétonitrile variant de 40 à 80 % du solvant organique permet de réaliser la séparation.

Pour atteindre la résolution requise de la totalité des acides aminés, il faut accroître l'efficacité (la sélectivité a déjà été optimisée) ; cela est obtenu en augmentant la longueur de la colonne. La figure 16 représente la séparation d'un mélange synthétique de 31 acides aminés et la figure 17 l'application à l'analyse des acides aminés contenus dans un jus d'orange commercial.



- |                           |                                   |
|---------------------------|-----------------------------------|
| 1 Acide cystéique         | 19 Acide $\gamma$ -aminobutyrique |
| 2 Arginine                | 20 Fmoc-OH                        |
| 3 Asparagine              | 21 Valine                         |
| 4 Glutamine               | 22 Norvaline                      |
| 5 Citrulline              | 23 Phénylalanine                  |
| 6 Sérine                  | 24 Tryptophane                    |
| 7 Acide aspartique        | 25 Cystine ou cystéine            |
| 8 Acide glutamique        | 26 Iso-leucine                    |
| 9 Taurine                 | 27 Leucine                        |
| 10 Méthioninesulfone      | 28 Hydroxylysine                  |
| 11 Thréonine              | 29 Histidine                      |
| 12 Glycine                | 30 Ornithine                      |
| 13 Dihydroxyphénylalanine | 31 Lysine                         |
| 14 Alanine                | 32 Dityrosine                     |
| 15 Mono-tyrosine          | 33 Fmoc-Cl                        |
| 16 Proline                |                                   |
| 17 Éthanolamine           |                                   |
| 18 Méthionine             |                                   |

Conditions du gradient			
Temps (min)	% A	% B	% C
0,0	80	0	20
4,0	76	0	24
8,0	0	72	28
11,5	0	68	32
13,5	0	68	32
17,0	0	56	44
20,0	0	55	45
25,0	0	52	48
30,0	0	28	72
37,0	0	20	80
39,0	0	20	80
39,1	80	0	20

**Conditions chromatographiques :**

Colonne : longueur : 25 cm ; diamètre intérieur : 0,4 cm  
 Phase stationnaire : TSK-GEL C-18, 5  $\mu$ m  
 A : citrate de sodium 0,02M pH ajusté à 2,85 avec H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>  
 B : même solution que "A", mais pH ajusté à 4,5  
 C : acétonitrile

Débit : 1,4 mL/min  
 Température : 32°C  
 Détection : UV à 269 nm  
 Sensibilité : 0,06 UAPE (Unité d'Absorbance Pleine Échelle)  
 Volume injecté : 25  $\mu$ L

**Figure 16 – Séparation de l'ensemble des acides aminés par chromatographie de partage à polarité de phases inversée après dérivation précolonne avec le Fmoc [107]**

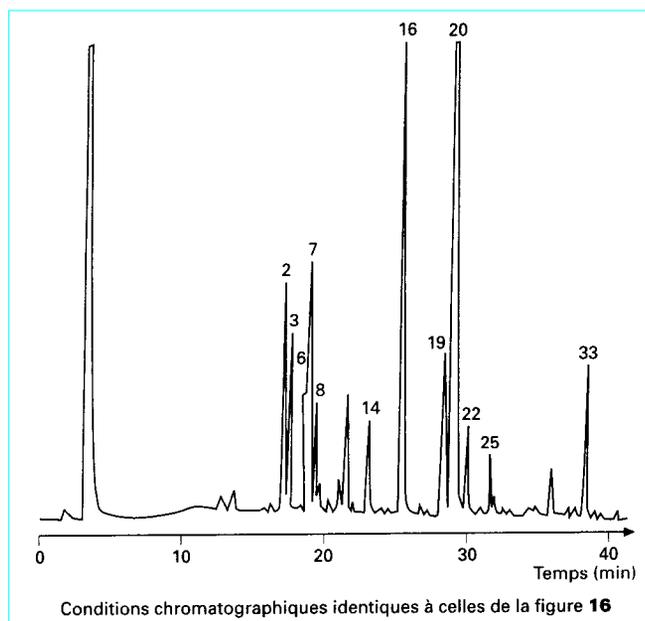


Figure 17 – Chromatogramme obtenu à partir d'un jus d'orange commercial (50  $\mu\text{L}$  de jus d'orange dans 1 mL de tampon borate)

## 2.2 Analyse de micropolluants organiques dans les eaux

La détermination des micropolluants organiques dans les eaux de distribution, de surface, etc., constitue un problème d'analyse courant dans le domaine de la chimie de l'environnement, suite à la mise en place de textes réglementaires. Compte tenu de la complexité des matrices et des niveaux de teneur recherchés, quelques  $\mu\text{g/L}$ , voire moins, l'analyse par CPL implique la mise en œuvre d'un traitement préalable de l'échantillon visant d'une part à l'élimination des multiples interférents et, d'autre part, à la préconcentration des solutés recherchés. Ainsi, à titre d'exemple, la Directive de la Communauté Économique Européenne du 15 juillet 1980 a fixé des normes de potabilité des eaux : dans le cas des pesticides, les concentrations maximales admissibles sont de  $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour chacun et de  $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour la totalité, ce qui implique de disposer, pour le contrôle analytique, de détectabilités encore plus basses.

L'opération d'extraction sélective et de préconcentration peut être menée par extraction liquide-solide, ELS (ou *solid phase extraction SPE*) [108], laquelle utilise des phases stationnaires, contenues dans des précolonnes, cartouches ou disques, choisies pour retenir sélectivement les composés d'intérêt lors de la percolation de volumes d'échantillons aussi importants que 500 mL par exemple ; cette première phase est suivie d'une seconde où les composés fixés sont désorbés dans un très petit volume et analysés soit en ligne, soit en différé. Il faut donc trouver des conditions où la rétention des solutés soit :

- très forte lors de la phase extraction, c'est-à-dire correspondant à des valeurs très élevées des facteurs de capacité dans des conditions analytiques où l'eau est la phase éluante ; si la quantité minimale détectable lors de l'analyse chromatographique correspond à 10 ng de soluté injecté, pour atteindre une concentration minimale détectable de  $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$  dans l'échantillon analysé, il faut opérer l'extraction sur un volume minimal de 100 mL ;
- très faible lors de la phase désorption, c'est-à-dire correspondant à des valeurs très petites de  $k'$  dans des conditions analytiques

où le solvant de transfert est la phase éluante pour permettre soit la récupération des solutés dans un petit volume dans le cas d'une analyse en différé, soit leur transfert dans la colonne analytique, sans dispersion notable, dans le cas d'une analyse en ligne.

Nous illustrerons ces divers aspects de l'ELS sur l'exemple de la détermination de chlorotriazines, herbicides d'usage très répandu en agriculture [109].

Leur préconcentration sélective s'effectue en deux étapes successives, conduisant avec l'analyse opérée ici en ligne aux trois étapes suivantes.

a) Les analytes, sous forme moléculaire, peuvent être retenus par effet hydrophobe sur un copolymère styrène-divinylbenzène PRP-1, alors que les cations inorganiques, très hydrophiles, ne le sont pas. Les analytes sont donc préconcentrés en milieu neutre ( $\text{pH} = 6$ ), au même titre que les solutés d'hydrophobie comparable ou supérieure, sur une première précolonne remplie de PRP-1 (copolymère styrène-divinylbenzène) dont les dimensions (1,5 cm  $\times$  3,2 mm  $\varnothing$  int.) permettent la percolation de 500 mL d'eau, sans « fuite » des solutés recherchés (leur volume de fin de fixation quantitative est supérieur au volume percolé).

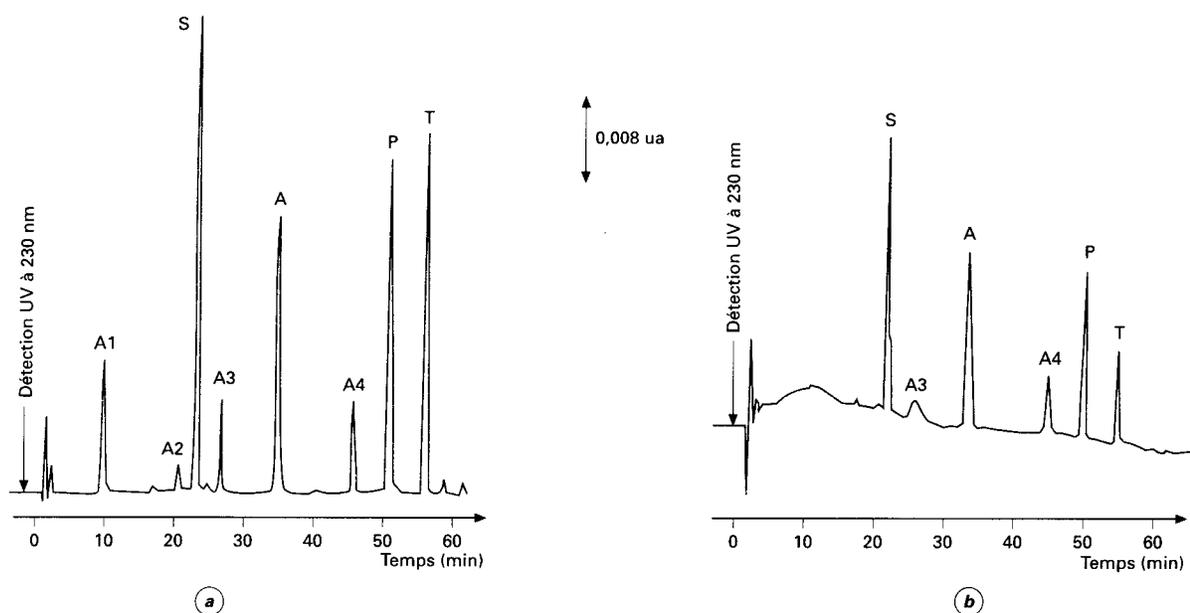
b) Dans la seconde étape, on opère le transfert des chlorotriazines au moyen d'un très petit volume, 3 mL, d'un mélange 75-25 v/v d'eau et d'acétonitrile amené à pH 1, vers une seconde pré-colonne remplie d'un échangeur de cations. À pH 1, soit 0,65 unité de moins que la plus petite valeur de  $\text{pK}_a$ , la forme prépondérante des solutés est alors la forme cationique, ce qui, en accroissant leur hydrophilie, entraîne leur désorption de la première précolonne et leur fixation sélective sur la seconde.

c) Dans la troisième étape, la précolonne contenant l'échangeur de cations est placée en série avec la colonne analytique et les solutés sont analysés en ligne par chromatographie de partage à polarité de phases inversée sur silice greffée octadécyle.

Le transfert à la colonne analytique est assuré en opérant à pH 4, soit un peu plus de 2 unités au-dessus de  $\text{pK}_a$  le plus élevé : les solutés sont à plus de 99 % sous forme moléculaire donc non retenus par l'échangeur de cations. La séparation analytique met en œuvre un gradient d'éluant eau-acétonitrile, à teneur croissante en solvant organique, de façon à permettre l'analyse avec une résolution élevée, sans durée excessive. Il est à noter, en effet, que la terbutylazine présente un caractère hydrophobe beaucoup plus prononcé que la simazine.

La figure 18 compare le chromatogramme obtenu par injection directe de  $0,7 \mu\text{g}$  de chaque soluté avec celui résultant de leur préconcentration à partir de 500 mL d'eau milli-Q dopée à  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ .

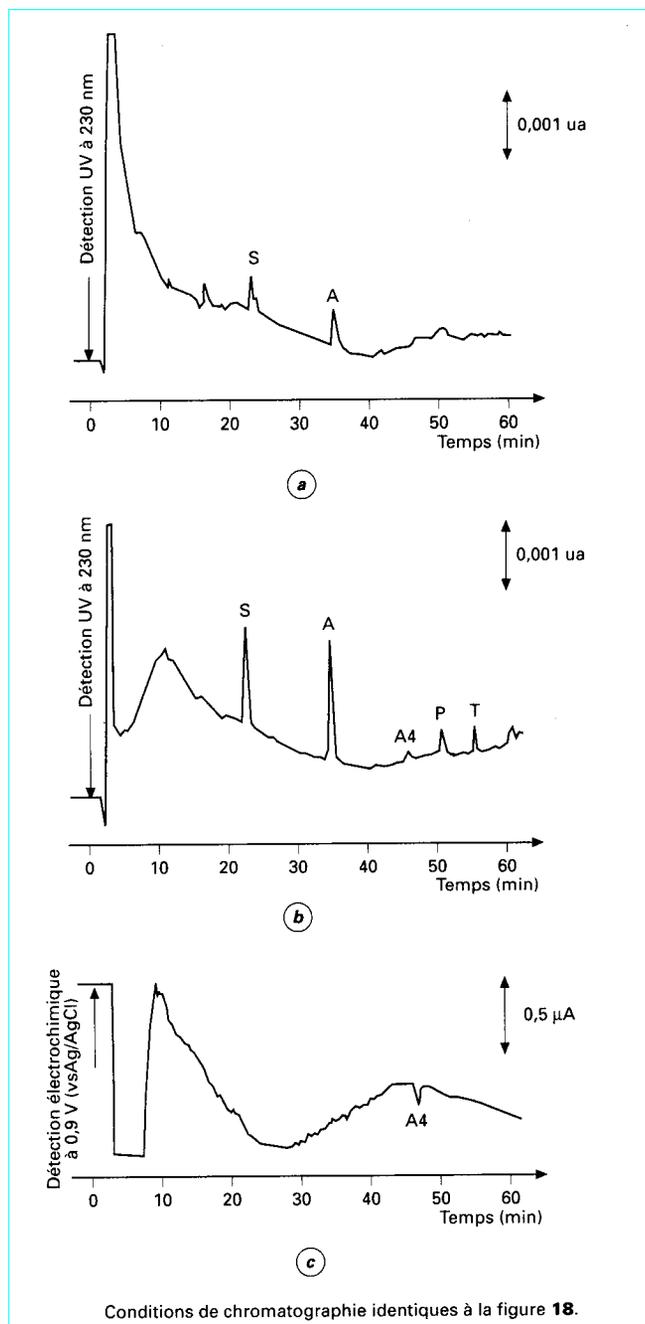
Outre les chlorotriazines précédentes, sont également présentes dans les échantillons injectés des anilines de dégradation de phénylurées qui sont également recherchées dans les analyses d'eaux. On voit que, pour ce qui concerne les chlorotriazines, la préconcentration en ligne et le transfert à la colonne analytique s'opèrent correctement, sans donner lieu à un élargissement de bande notable par rapport à leur injection directe (les différences observées au niveau des aires de pics s'expliquent, d'une part, par les quantités injectées, respectivement 0,7 et  $0,5 \mu\text{g}$  pour chaque soluté et par les rendements d'extraction, compris entre 85 et 100 %. Il n'en est pas de même dans le cas des anilines et en particulier des premières d'entre elles. Elles souffrent à la fois d'une dispersion de bande et d'une faible absorptivité à la longueur d'onde de détection. S'agissant de composés oxydables, leur détection est possible avec une meilleure détectabilité par voie électrochimique, le détecteur correspondant étant placé en série avec le détecteur UV. Cette disposition permet de plus d'apporter un élément supplémentaire d'identification des chlorotriazines : puisqu'elles ne sont pas électroactives, le



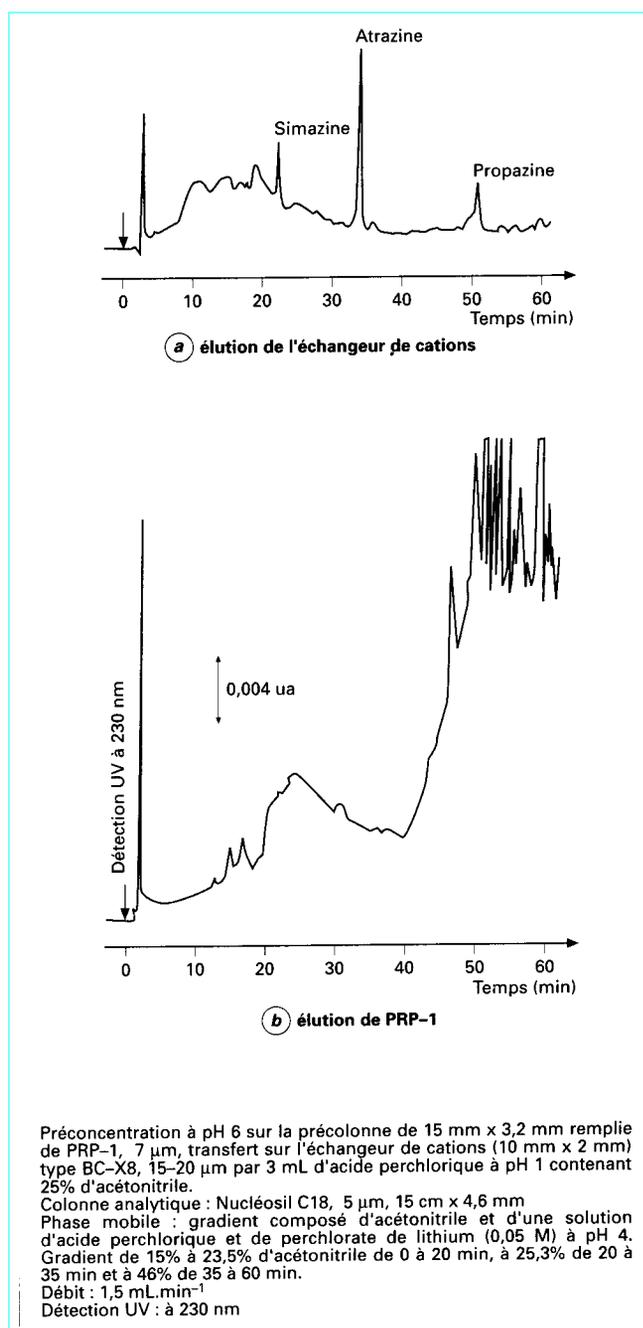
Solutés : S = simazine, A = atrazine, P = propazine et T = terbutylazine, A1 = 3-chloro-4-méthoxyaniline, A2 = 3-chloro-4-méthylaniline, A3 = 4-isopropylaniline, A4 = 3,4-dichloroaniline.  
 Préconcentration à pH 6 sur la précolonne de 15 mm x 3,2 mm remplie de PRP-1, 7 µm,  
 Transfert sur l'échangeur de cations (10 mm x 2 mm) type BC-X8, 15-20 µm par 3 mL d'acide perchlorique à pH 1 contenant 25 % d'acétonitrile  
 Colonne analytique : Nucléosil C18, 5 µm, 15 cm x 4,6 mm  
 Phase mobile : gradient composé d'acétonitrile et d'une solution d'acide perchlorique et de perchlorate de lithium (0,05 M) à pH 4.  
 Gradient de 15 % à 23,5 % d'acétonitrile de 0 à 20 min, à 25,3 % de 20 à 35 min et à 46 % de 35 à 60 min  
 Débit : 1,5 mL.min<sup>-1</sup>  
 Détection UV à 230 nm

**Figure 18 – Chromatogrammes obtenus (a) par injection directe de 0,7 µg d'une solution de triazines et de dérivés d'aniline et (b) par analyse en ligne de l'échangeur de cations après préconcentration de 500 mL d'eau milli-Q dopée à 1 µg L<sup>-1</sup> de chaque composé**

second détecteur ne doit pas délivrer de signal pour les pics d'élu-tion correspondants.



**Figure 19** - Analyse en ligne de l'échangeur de cations après préconcentration de 500 mL d'eau potable non dopée (a) et dopée à 0,02 µg.L<sup>-1</sup> avec détection UV à 230 nm (b) et détection électrochimique à 0,9 V (c)



**Figure 20** - Analyse en ligne après préconcentration de 500 mL d'eau de l'Yerres (au 12-11-89) non dopée

La figure 19 montre l'application de la méthode à l'analyse d'un échantillon d'eau potable, après préconcentration de 500 mL d'eau brute ou dopée à 0,02 µg.L<sup>-1</sup>. On voit qu'il est possible de détecter la présence de simazine et d'atrazine à des teneurs aussi faibles que 10 et 15 ng.L<sup>-1</sup>, ce qui est très en deçà des normes de potabilité. De même, l'intérêt de la détection électrochimique, plus sélective, est illustré par l'exemple de la 3,4-dichloroaniline.

---

La figure **20** montre que l'application de la méthode à l'analyse des chlorotriazines dans une eau de rivière, qui constitue un milieu plus chargé en polluants organiques divers que l'eau potable, n'est rendue possible que par la mise en œuvre de l'extraction en deux étapes. L'efficacité de l'élimination des interférents absorbant à la longueur d'onde de détection est illustrée par le chromatogramme *b*, qui correspond à l'analyse des espèces retenues sur la première précolonne remplie de PRP-1, et qui, non transformées à l'état de cations en milieu acide, n'ont pas été transférées ni retenues sur la seconde précolonne contenant l'échangeur de cations, au cours de la seconde étape. Seule cette préconcentration sélective autorise la détermination de traces de chlorotriazines aussi faibles que celles rencontrées ici, respectivement  $0,2 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour la simazine,  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour l'atrazine et  $0,4 \mu\text{g.L}^{-1}$  pour la propazine ; les détectabilités dans les eaux de rivière déterminées dans ces conditions sont comprises entre 15 et  $20 \text{ ng.L}^{-1}$  pour les quatre chlorotriazines.

Le même procédé d'extraction sélective et de préconcentration de traces, suivi d'une analyse en ligne, s'applique aux chloroanilines, qui constituent des produits de dégradation d'herbicides et de polluants organiques divers présents dans les eaux [110]. En effet, les  $\text{p}K_a$  de ces composés étant compris entre 2,0 et 4,2, ils sont bien sous forme moléculaire à pH 6, et partant, retenus sur PRP-1 d'une part, et majoritairement sous forme protonée à pH 1, donc retenus sélectivement sur l'échangeur de cations d'autre part.

Là encore, les détectabilités obtenues dans le cas des eaux de rivière sont comparables à celles déterminées pour l'eau potable, de l'ordre de  $5 \text{ ng.L}^{-1}$  pour la détection électrochimique, du fait de l'élimination efficace des interférents.