



HAL
open science

Analyse des produits d'oxydation d'effluents aqueux : les acides organiques à chaînes courtes

Guillaume Aubert

► **To cite this version:**

Guillaume Aubert. Analyse des produits d'oxydation d'effluents aqueux : les acides organiques à chaînes courtes. Optimisation et contrôle [math.OC]. 2011. dumas-01086481

HAL Id: dumas-01086481

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01086481>

Submitted on 24 Nov 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

CONSERVATOIRE NATIONAL DES ARTS ET METIERS
CENTRE REGIONAL ASSOCIE DE LYON

MEMOIRE

Présenté en vue d'obtenir

le diplôme d'**INGENIEUR CNAM**

Spécialité : Mesure Analyse

Option : Sciences et techniques analytiques appliquées à la chimie et au vivant

Par

Guillaume AUBERT

<p>Analyse des produits d'oxydation d'effluents aqueux : les acides organiques à chaînes courtes</p>

Soutenu le 28 juin 2011

JURY

PRESIDENT :

Christine PERNELLE	Professeur titulaire de la chaire de Génie Analytique – CNAM Paris
--------------------	--

MEMBRES :

Daniel DERUAZ	Maître de conférences
Jean FAVRE-BONVIN	Ingénieur de recherches – CNAM Lyon
Corinne FERRONATO	Maître de conférences, Encadrant
Michèle BESSON	Directeur de recherches, Co-encadrant
Alain PERRARD	Chargé de recherches, Co-encadrant

Ce travail a été réalisé à l'Institut de Recherches sur la Catalyse et l'Environnement de Lyon (IRCELYON) au sein de l'équipe « Traitement de l'eau et des effluents liquides ». Je remercie Michel Lacroix, directeur de l'IRCELYON, d'avoir soutenu mes sept années d'études supérieures se finalisant par ce mémoire et de m'avoir permis d'allier mon activité professionnelle et mon parcours CNAM.

Ce travail a été encadré par Corinne FERRONATO. Je tiens à la remercier chaleureusement pour sa disponibilité, ses précieux conseils en chromatographie et ses remarques constructives lors de l'élaboration de ce rapport.

Je voudrais exprimer mes sincères remerciements à Michèle BESSON, Catherine PINEL et plus particulièrement à Alain PERRARD pour leur soutien et leur aide quotidienne durant ces sept années de CNAM. Ils ont toujours pris de leur temps pour répondre à mes interrogations sur de nombreux sujets et leur contribution à ce mémoire a été précieuse.

Je remercie Chantal GUILLARD d'avoir apporté son avis sur ce manuscrit mais également Claire DEMESMAY et Christine SUISENG pour leurs conseils en chromatographie et Pierre MIGNON pour ses explications sur les interactions moléculaires et son soutien.

J'exprime mes remerciements aux membres du jury pour avoir accepté de juger ce rapport. Merci à Eléonore GONDEAU pour ses réponses rapides et efficaces ainsi que ses messages d'encouragement.

Mes remerciements vont également à tous les permanents et non-permanents des équipes « Traitement de l'eau et des effluents liquides » et « Valorisation des agroressources et chimie verte » pour leur présence quotidienne et j'y associe tous mes collègues de l'IRCELYON, amis et famille.

TABLE DES MATIERES

Introduction	1
<hr/>	
Partie I : Bibliographie	4
<hr/>	
A. Les acides organiques	5
B. Etudes réalisées au laboratoire	7
B.1 Oxydation par voie humide catalytique	7
B.2 Photocatalyse	10
C. Analyses d'acides organiques en phase aqueuse	12
C.1 Préparations d'échantillons	12
C.2 Techniques analytiques	18
D. Choix, propriétés et préparations des acides	24
D.1 Choix des acides étudiés	24
D.2 La polarité des solutés en LC	25
D.3 Les solutions étalons	26
<hr/>	
Partie II : Généralités sur la chromatographie	28
<hr/>	
A. Théorie de la chromatographie	29
B. Grandeurs de rétention	29
B.1 Les temps et volume de rétention	29
B.2 Le volume mort	30
B.3 Le facteur de capacité ou de rétention	30
C. L'efficacité	30
D. Grandeurs de séparation	31
D.1 La sélectivité	31
D.2 La résolution	31
<hr/>	
Partie III : La chromatographie ionique	33
<hr/>	
<i>La chromatographie d'exclusion ionique</i>	<i>34</i>
A. Appareillage	34
B. Principe de fonctionnement	34
C. Résultats et discussions	36
C.1 Optimisation de la séparation	36
C.2 Validation de la méthode	41
D. Conclusion sur la chromatographie d'exclusion ionique	43

<i>La chromatographie d'échange anionique</i>	44
A. Appareillage	44
B. Les phases stationnaire et mobile	44
C. Résultats et discussions	46
C.1 Ordre d'élution	46
C.2 Validation de la méthode	48
D. Conclusion sur la chromatographie d'échange anionique	48
Partie IV : La chromatographie de phase inversée	49
A. Appareillage	50
B. Les colonnes	50
B.1 Propriétés physiques	50
B.2 Propriétés chimiques	51
C. La phase mobile	53
D. Résultats et discussions	53
D.1 Acidification ou recul d'ionisation	53
D.2 Ajout d'un tampon phosphate	64
D.3 Appariement d'ions	65
E. Conclusion sur la chromatographie de phase inversée	67
Partie V : La chromatographie en phase gazeuse	69
A. Appareillage	70
B. La phase mobile ou gaz vecteur	70
C. Les colonnes	71
D. Résultats et discussions	73
D.1 Réponse des acides en GC-FID	73
D.2 Optimisation de la séparation	74
D.3 Validation de la méthode	76
D.4 Extraction sur phase solide (SPE)	77
E. Conclusion sur la chromatographie en phase gazeuse	81
Conclusion générale	82
Annexes	85
Références bibliographiques	117

INDEX DES FIGURES

Figure 1	: pH et pKa pour un acide carboxylique	6
Figure 2	: Principe de l'OVH	7
Figure 3	: Oxydation de l'acide succinique	8
Figure 4	: Analyse des acides carboxyliques au cours du traitement d'une boue	9
Figure 5	: Structure du boscalide	10
Figure 6	: Structure de l'IOME	11
Figure 7	: Evolution des acides au cours de la dégradation photocatalytique de l'IOME	11
Figure 8	: Principe de l'HS-GC	13
Figure 9	: Cartouche SPE	14
Figure 10	: Principe de la SPME	15
Figure 11	: Principe de l'HS-SPME	15
Figure 12	: Réaction d'estérification d'un acide par un alcool	17
Figure 13	: Mécanisme réactionnel d'une silylation	17
Figure 14	: Caractéristiques d'un pic chromatographique	29
Figure 15	: Résolution entre 2 pics	31
Figure 16	: Principe de l'exclusion ionique	35
Figure 17	: IEC, pH = 2,7, Chromatogramme des acides gras volatils	37
Figure 18	: IEC, pH = 2,7, Chromatogramme des autres acides	37
Figure 19	: IEC, Courbe pKa = f(k)	38
Figure 20	: IEC, Effet du pH sur la rétention	40
Figure 21	: AEC, Mécanisme d'échange	45
Figure 22	: RP-LC, Structure en brosse d'une phase greffée	51
Figure 23	: RP-LC, Collapse des chaînes alkyles	52
Figure 24	: RP-LC, "End-capping" polaire avec un alcool	52
Figure 25	: RP-LC, Insertion d'un groupe polaire	52
Figure 26	: RP-LC, Colonne Pyramid, pH = 2, $\log(k) = f(\log(P))$	55
Figure 27	: RP-LC, Colonne Pyramid, pH = 2, $\log(k) = f(\text{pH})$	56
Figure 28	: RP-LC, Colonne Pyramid, pH = 2, Chromatogramme des acides les plus polaires	57
Figure 29	: RP-LC, Colonne Pyramid, pH = 2,3, Chromatogramme des acides les plus polaires	57
Figure 30	: RP-LC, Colonne Pyramid, pH = 2,5, Chromatogramme des acides les plus polaires	57

Figure 31	: RP-LC, Colonne Pyramid, pH = 2,5, D = 1mL/min, Chromatogramme des acides les plus polaires	58
Figure 32	: RP-LC, Colonne HDO, pH = 2, log(k) = f(log(P))	62
Figure 33	: RP-LC, Colonne HDO, log(k) = f(pH)	63
Figure 34	: RP-LC, Couples acide/base et leur pKa pour l'acide phosphorique	64
Figure 35	: RP-LC, Principe de l'appariement d'ions	65
Figure 36	: GC, Courbes de Van Deemter	71
Figure 37	: GC, Viscosité de 3 gaz en fonction de la température	71
Figure 38	: GC, Structure des colonnes Carbowax	72
Figure 39	: GC, Structure des colonnes FFAP	72
Figure 40	: GC, Colonne ZB-FFAP, Chromatogramme des acides gras volatils	74
Figure 41	: GC, Colonne ZB-FFAP, log(k) = f(nombre de carbones)	76
Figure 42	: GC, Colonne ZB-FFAP, SPE, Rendements d'extraction	79
Figure 43	: GC, Colonne ZB-FFAP, SPE, HRP 2mL	80
Figure 44	: GC, Colonne ZB-FFAP, SPE, HRP 1mL	80
Figure 45	: Principe de l'extraction liquide-liquide	86
Figure 46	: Principe de l'extraction sur phase solide SPE	86
Figure 47	: Gamme et choix des phases SPE, Macherey-Nagel	87
Figure 48	: Schéma d'un détecteur à ionisation de flamme	92
Figure 49	: Schéma d'un détecteur à capture d'électrons	92
Figure 50	: Schéma simplifié d'une GC-MS	93
Figure 51	: Schéma d'un analyseur de carbone organique total	98
Figure 52	: Spectre UV de l'acide valérique à 500 mg/L	99
Figure 53	: Schéma du suppresseur à lit fixe Metrohm	101
Figure 54	: Courbe de Van Deemter	102
Figure 55	: Titration de H ₃ PO ₄ par NaOH	107
Figure 56	: Pouvoir tampon dans le titrage de H ₃ PO ₄ par NaOH	108
Figure 57	: Stéarate de sodium C ₁₇ H ₃₅ COONa	112
Figure 58	: Mise en solution d'un tensioactif dans un solvant polaire et cmc	112
Figure 59	: Courbe tension superficielle = f(c)	113
Figure 60	: Contre-ions et point de charge zéro pHP _{CZ}	113
Figure 61	: Nanoparticule colloïdale de silice	114
Figure 62	: Schéma d'un injecteur split	116

INDEX DES TABLEAUX

Tableau I	: Structures, pKa et masses molaires d'acides organiques	5
Tableau II	: Limites de détection en GC	20
Tableau III	: Liste des acides étudiés	24
Tableau IV	: IEC, pH = 2,7, Données chromatographiques	37
Tableau V	: IEC, pH = 2,7, Résolutions entre les pics	39
Tableau VI	: IEC, Données statistiques pour la validation de la méthode	42
Tableau VII	: AEC, Conditions analytiques	45
Tableau VIII	: AEC, Données chromatographiques	46
Tableau IX	: AEC, Données statistiques pour la validation de la méthode	48
Tableau X	: Caractéristiques des colonnes RP-LC	50
Tableau XI	: RP-LC, Colonne Pyramid, pH = 2, Données chromatographiques	54
Tableau XII	: RP-LC, Colonne Pyramid, pH = 2,5, D = 1mL/min, Résolutions	58
Tableau XIII	: RP-LC, Colonne Pyramid, pH = 2,5, Programme du gradient	59
Tableau XIV	: RP-LC, Colonne Pyramid, Répétabilité et linéarité	60
Tableau XV	: RP-LC, Colonne Pyramid, Limites de détection et quantification	61
Tableau XVI	: RP-LC, Colonne HDO, pH = 2, Données chromatographiques	61
Tableau XVII	: RP-LC, Colonne HDO, Appariement d'ions, Données chromatographiques	66
Tableau XVIII	: GC, Propriétés physiques des acides étudiés	73
Tableau XIX	: GC, Colonne ZB-FFAP, Données chromatographiques	75
Tableau XX	: GC, Colonne ZB-FFAP, Données statistiques pour la validation de la méthode	76
Tableau XXI	: GC, Colonne ZB-FFAP, SPE, Coefficients de variation	78
Tableau XXII	: GC, Colonne ZB-FFAP, SPE, Coefficients de variation pour la préconcentration	80
Tableau XXIII	: Caractéristiques des colonnes RP-LC utilisées	103
Tableau XXIV	: Ajustement de pH avec H ₃ PO ₄ seul et avec un mélange H ₃ PO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , Application numérique	105
Tableau XXV	: Ajustement de pH avec un mélange NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ , Application numérique	105
Tableau XXVI	: GC, Conditions opératoires sur l'injecteur split	116

ACRONYMES

Vous trouverez répertoriées ci-dessous une liste des acronymes des techniques régulièrement utilisés dans cet exposé. Dans la suite de ce rapport, nous utiliserons les acronymes en anglais, qui sont pour la plupart, plus souvent rencontrés dans la littérature.

Langue	Acronymes	Définitions
Français	LLE	Extraction Liquide-Liquide
Anglais	LLE	Liquid-Liquid Extraction
Français	SPE	Extraction sur Phase Solide
Anglais	SPE	Solid Phase Extraction
Français	SPME	MicroExtraction sur Phase Solide
Anglais	SPME	Solid Phase MicroExtraction
Français	HS	Espace de tête
Anglais	HS	HeadSpace
Français	IEC	Chromatographie d'Exclusion Ionique
Anglais	IEC	Ionic Exclusion Chromatography
Français	AEC	Chromatographie d'Echange Anionique
Anglais	AEC	Anion Exchange Chromatography
Français	CPG	Chromatographie en Phase gazeuse
Anglais	GC	Gas Chromatography
Français	CPL	Chromatographie en Phase Liquide
Anglais	LC	Liquid Chromatography
Anglais	RP-LC	Reverse Phase – Liquid
Français	EC	Electrophorèse Capillaire
Anglais	CE	Capillary Electrophoresis
Français	ECD	Détecteur à Capture d'Electron
Anglais	ECD	Electron Capture Detector
Français	FID	Détecteur à Ionisation de Flamme
Anglais	FID	Flame Ionisation Detector
Français	SM	Spectrométrie de Masse
Anglais	MS	Mass Spectrometry
Français	UV	UltraViolet
Anglais	UV	UltraViolet
Français	COT	Carbone Organique Total
Anglais	TOC	Total Organic Carbon
Français	LD	Limite de Détection
Anglais	LOD	Limit Of Detection
Français	LQ	Limite de Quantification
Anglais	LOQ	Limit Of Quantification

Introduction

La présence d'acides organiques dans l'environnement est principalement due à de nombreuses sources biologiques, géologiques, chimiques ou émissions anthropogéniques. Certains de ces acides organiques sont produits naturellement et ont un rôle important dans l'alimentation comme l'acide acétique par exemple, tandis que beaucoup d'autres sont utilisés ou produits dans des procédés industriels chimiques ou biochimiques. De nombreux procédés utilisent les acides organiques trouvant notamment leur utilisation pour la fabrication de pesticides, de produits pharmaceutiques, de plastiques, de colorants ou de produits cosmétiques. Ils peuvent également être utilisés en tant que solvants ou désinfectants. Lors des réactions de dégradation des polluants organiques dans les effluents aqueux (comme par exemple lors de traitements biologiques ou de divers procédés d'oxydation chimique utilisant l'ozone, l'eau de javel, le peroxyde d'hydrogène, l'oxygène de l'air ou la photocatalyse), les acides et diacides carboxyliques à chaînes courtes sont des intermédiaires ou des produits finaux systématiquement formés et cela, quel que soit le polluant (hydrocarbures, pesticides, colorants, effluents de papeterie, boues de station d'épuration, acides aminés). Les axes de recherche de l'équipe « Traitement de l'eau et des effluents liquides » du laboratoire IRCELYON concernent ce type d'études et plus particulièrement, la dégradation par photocatalyse ou par oxydation en voie humide catalytique (OVHC).

Il s'avère donc nécessaire de développer des méthodes efficaces pour analyser ces différents acides organiques.

Dans ce cadre, ce mémoire porte sur l'utilisation de différentes techniques pour l'analyse de plusieurs acides et diacides organiques à chaînes courtes rencontrés lors des études de dégradations réalisées au laboratoire. Actuellement, les séparations de ces molécules en phase aqueuse sont principalement réalisées par chromatographie d'exclusion ionique. Cette étude se propose de développer et de comparer de nouvelles méthodes d'analyse en vue d'une amélioration.

Ce mémoire comprend 5 parties :

- une étude bibliographique présentant les techniques et méthodes utilisées dans la littérature pour ces analyses, suivie par un descriptif du choix de 10 acides et diacides

régulièrement formés ou produits lors de ces dégradations et qui feront l'objet de ce mémoire,

- une partie comportant quelques généralités sur la chromatographie pour définir les termes utilisés dans la suite du rapport,
- et trois parties développant chacune des techniques analytiques utilisées à savoir la chromatographie ionique regroupant la chromatographie d'exclusion ionique et la chromatographie d'échange anionique, la chromatographie liquide de phase inversée et la chromatographie en phase gazeuse. Nous développerons pour chaque technique l'appareillage et son principe de fonctionnement, le choix des colonnes et des conditions analytiques. Tous ces essais seront comparés et feront l'objet d'une discussion.

Partie I :

Bibliographie

Dans cette partie, nous définirons dans un premier temps ce qu'est un acide organique et présenterons leurs sources dans l'environnement. Dans un deuxième temps, nous verrons par le biais de quelques études réalisées au laboratoire dans le groupe « Traitement de l'eau et des effluents liquides » la formation de divers acides organiques produits lors du traitement d'effluents aqueux par oxydation voie humide ou par photocatalyse. Ensuite, les techniques de préparation d'échantillons et les techniques d'analyses rencontrées dans la littérature concernant les acides organiques dans des matrices aqueuses seront présentées. Enfin, nous définirons les choix ainsi que les propriétés et préparation des acides étudiés dans la suite de l'exposé.

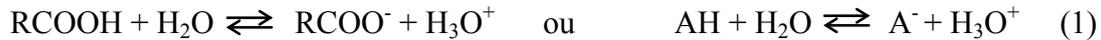
A. Les acides organiques

Les acides organiques sont des molécules organiques polaires possédant un groupement fonctionnel carboxylique (-COOH). Leurs structures chimiques peuvent être très différentes : chaîne aliphatique ou aromatique, saturée ou insaturée, ramifiée ou non. Ils peuvent différer par leur longueur de chaîne, peuvent posséder un ou plusieurs groupements carboxyliques ainsi que d'autres groupements fonctionnels, par exemple hydroxyliques (-OH) ou cétoniques (=O). Cela leur procure des propriétés chimiques et physiques différentes. Le Tableau I regroupe quelques acides organiques avec les pKa et les masses molaires correspondants.

Tableau I : Structures, pKa et masses molaires d'acides organiques [Nollet, 2006]

Nom	Formule	Structure	pKa1	pKa2	Masse molaire (g/mol)
Acides monocarboxyliques					
Acide formique	CH ₂ O ₂	HCOOH	3,75	-	46,03
Acide acétique	C ₂ H ₄ O ₂	CH ₃ -COOH	4,75	-	60,05
Acide propionique	C ₃ H ₆ O ₂	CH ₃ -CH ₂ -COOH	4,87	-	74,08
Acide butyrique	C ₄ H ₈ O ₂	CH ₃ -(CH ₂) ₂ -COOH	4,81	-	88,12
Acide isobutyrique	C ₄ H ₈ O ₂	(CH ₃) ₂ -CH-COOH	4,84	-	88,12
Acide n-valérique	C ₅ H ₁₀ O ₂	CH ₃ -(CH ₂) ₃ -COOH	4,82	-	102,13
Acide isovalérique	C ₆ H ₁₀ O ₂	(CH ₃) ₂ -CH-CH ₂ -COOH	4,77	-	102,13
Hydroxyacides					
Acide glycolique	C ₂ H ₄ O ₃	CH ₂ (OH)-COOH	3,83	-	76,05
Acide lactique	C ₃ H ₆ O ₃	CH ₃ -HC(OH)-COOH	3,08	-	90,08
α-aldoacide					
Acide glyoxylique	C ₂ H ₂ O ₃	CHO-COOH	3,34	-	74,04
Acide monocarboxylique insaturé					
Acide acrylique	C ₃ H ₄ O ₂	CH ₂ =CH-COOH	4,25	-	72,06
Acides dicarboxyliques					
Acide oxalique	C ₂ H ₂ O ₄	HOOC-COOH	1,23	4,19	90,04
Acide malonique	C ₃ H ₄ O ₄	HOOC-CH ₂ -COOH	2,85	5,69	104,06
Acide succinique	C ₄ H ₆ O ₄	HOOC-(CH ₂) ₂ -COOH	4,16	5,61	118,09

En solution dans l'eau, l'acide se dissocie partiellement en ion carboxylate selon la réaction acide-base (1).



La constante d'acidité est définie suivant la relation (2) :

$$K_A = ([\text{A}^-] * [\text{H}_3\text{O}^+]) / [\text{AH}] \quad (2)$$

(avec $[\text{A}^-]$, la concentration en A^- dans la solution en mol/L, $[\text{AH}]$, la concentration en AH et $[\text{H}_3\text{O}^+]$, la concentration en H_3O^+).

On utilise souvent le $\text{pKa} = -\log(K_A)$. Les acides carboxyliques sont des acides faibles.

Tout au long de cet exposé, nous verrons que le pKa des ces espèces aura un rôle important pour leur analyse. On a la relation :

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log\left(\frac{[\text{A}^-]}{[\text{AH}]}\right) \quad (3)$$

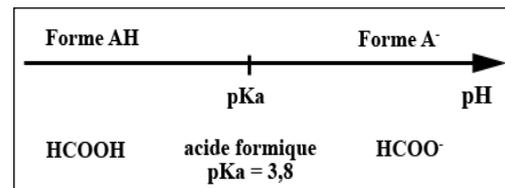


Fig.1 : pH et pKa pour un acide carboxylique

Sur la Fig.1, nous rappelons que pour des pH inférieurs au pKa, l'acide carboxylique est majoritairement sous sa forme moléculaire (AH) alors que pour des pH supérieurs, il est essentiellement sous sa forme ionisée (A^-).

Beaucoup d'acides sont générés industriellement lors de la production de polymères, solvants, additifs et on en trouve beaucoup dans la nature. Ils font partie des polluants organiques dans l'environnement. La présence d'acides organiques dans tous les domaines touchant à l'environnement (air, eau, sol) a augmenté ces dernières décennies et des matrices telles que l'air, les eaux de surface, les eaux souterraines, les effluents industriels, l'eau potable et les eaux de ruissellement doivent être analysées. Ces acides sont présents à des concentrations très variables allant du $\mu\text{g/L}$ à plusieurs g/L suivant les origines.

Les acides gras sont des acides carboxyliques à chaînes aliphatiques. Ils possèdent une chaîne carbonée de 2 à 36 atomes de carbone. Les acides gras volatils (AGV) sont les acides organiques aliphatiques à chaînes courtes (C_2 à C_7) et sont principalement formés à partir de la dégradation photochimique ou biochimique de matière organique (fermentation anaérobique par exemple). Dans les publications anglo-saxonnes, nous trouverons souvent les termes « Short-Chain Fatty Acid (SCFA) » ou « low-weight carboxylic acid ». Des acides tels que les acides formique, oxalique ou glyoxylique sont des sous-produits du traitement de l'eau potable par ozonation. Les acides lactique, acétique, oxalique, succinique, fumarique et citrique sont fréquemment analysés dans les eaux de ruissellement. [Nollet, 2006]. Les acides

organiques nous intéressant dans cette étude sont les acides et diacides organiques à chaînes courtes comportant de 1 à 7 atomes de carbone.

B. Etudes réalisées au laboratoire

Dans l'équipe « Traitement de l'eau et des effluents liquides », les principaux axes de recherche concernent l'élimination de polluants organiques en phase aqueuse par des réactions d'oxydation en voie humide catalytique (OVHC) ou par photocatalyse. Les polluants traités peuvent être de toutes sortes : des pesticides, des herbicides, des molécules présentes dans des effluents industriels de papeterie ou de production d'huile d'olives, dans des boues de station d'épuration par exemple. Une étude de différentes réactions permettra de connaître les principaux acides formés lors de ces dégradations.

B.1 Oxydation par voie humide catalytique

L'oxydation voie humide (OVH) a été développée dès les années 1950 pour le traitement de déchets organiques aqueux trop dilués pour être incinérés ou trop concentrés ou toxiques pour subir un traitement biologique. Elle consiste à chauffer à haute température (160-320°C) un effluent liquide sous pression (20-120 bar) en présence d'un gaz oxydant (oxygène de l'air) dans le but de minéraliser complètement les composés organiques ou au moins de les oxyder en composés biodégradables, en un rejet gazeux et en un résidu solide essentiellement minéral comme schématisé dans la Fig.2.

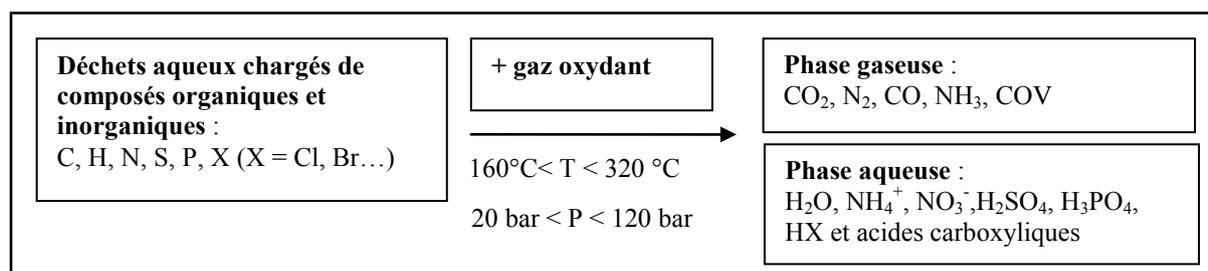


Fig. 2 : Principe de l'OVH

Les conditions opératoires requises pour l'OVH entraînent des coûts d'investissement et d'opérations très élevés qui constituent un frein à leur développement. Cependant, l'efficacité de l'OVH peut être améliorée par l'introduction de catalyseurs. On parle alors d'OVHC. Un catalyseur permet d'augmenter la vitesse d'une réaction, d'abaisser les conditions (température, pression, par exemple) et d'agir sur la sélectivité de la réaction.

Les effluents étudiés au laboratoire sont des solutions aqueuses de molécules modèles identifiées comme intermédiaires de réaction telles que l'acide succinique [Béziat, 1999], l'acide p-hydroxybenzoïque [Pham Minh, 2007] ou la 3,4 dichloroaniline [Carrier, 2009] ou directement des effluents de papeterie, de production d'huile d'olive, de boues de station d'épuration [Dodouche, 2010], de lixiviats de décharge, de pesticides. Nous allons maintenant voir deux applications de cette technologie.

B.1.1 Oxydation de l'acide succinique

L'acide succinique a été identifié comme intermédiaire de réaction de plusieurs polluants en OVHC. Cette étude porte sur des tests d'activité et de sélectivité de catalyseurs à base de ruthénium supporté dans l'oxydation de l'acide succinique.

Un suivi cinétique sur 8 heures de réaction a été réalisé en réacteur batch et est présenté sur la Fig.3. La concentration d'acide succinique en début de réaction est de 5 g/L soit 42 mmol/L. Dans les conditions de réaction (190°C et 50 bar d'air) et en présence d'un catalyseur à base de ruthénium supporté, il est majoritairement converti en CO₂ et en H₂O. Le principal intermédiaire est l'acide acétique, qui se forme dès le début de

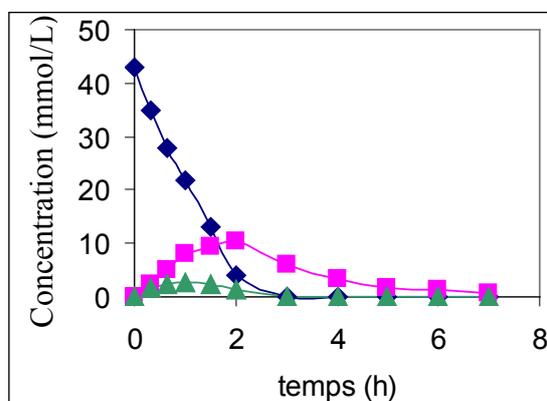


Fig.3 : Oxydation de l'acide succinique à 190°C et 50 bars d'air en présence de 3%masse Ru/TiO₂, Concentrations en : ◆ acide succinique ; ■ acide acétique ; ▲ acide acrylique

la réaction. Sa concentration atteint un maximum (10 mmol/L) lorsque l'acide succinique est totalement converti. L'acide acrylique, formé intermédiairement, n'apparaît qu'en faible quantité (3 mmol/L au maximum). La minéralisation est complète après 8 heures de réaction. Les analyses quantitatives ont été réalisées par LC sur le principe d'exclusion ionique (colonne CarboSep Coregel 107H). La détection est faite par ultraviolet (UV) à une longueur d'onde de 210 nm et par réfractométrie.

L'OVHC de l'acide succinique est une réaction très étudiée au laboratoire, elle permet de comparer l'activité de nouveaux catalyseurs à des catalyseurs de référence. Dans cette réaction mais également dans d'autres réactions d'OVHC de polluants organiques, les acides succinique, acétique et acrylique sont couramment formés.

B.1.2. Oxydation de boues de station d'épuration [Dodouche, 2010]

La deuxième application concerne la valorisation de boues de station d'épuration. Le but n'est pas de dégrader l'effluent, mais de le convertir en un maximum d'acides gras volatils (AGV) pour être utilisés ensuite pour la production de bioplastiques. En effet, par biofermentation, à partir d'un milieu nutritif sous forme d'AGV, certains microorganismes sont capables de synthétiser et accumuler au sein de leurs cellules des polyhydroxyalcanoates (PHA), des bioplastiques.

Suivant les conditions de réaction en OVH (température, pression, temps de réaction, pH par exemple), la matière organique est transférée vers la phase liquide et des quantités plus ou moins importantes d'AGV sont produites. Le but de cette étude a été d'optimiser cette réaction afin d'obtenir le maximum d'acides souhaités et d'éviter en même temps leur minéralisation. Suivant la nature des boues traitées, la répartition des acides produits sera également différente.

Les analyses quantitatives ont été réalisées par LC sur le principe d'exclusion ionique et sont réalisées de la même manière que dans la première étude. Elles ont également été réalisées par GC sur une colonne capillaire VF-Waxms (Varian) avec comme étalon interne le n-pentanol et détection par un détecteur à ionisation de flamme (FID). Un exemple d'analyse des acides au cours d'une réaction est donné dans la Fig.4.

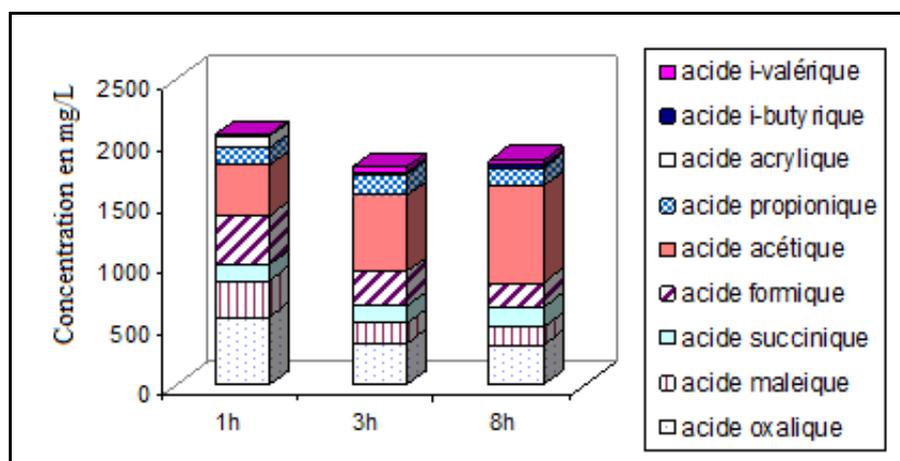


Fig.4 : Analyse des acides carboxyliques au cours du traitement d'une boue à 200°C et 56 bars d'air [Dodouche, 2010]

On observe par exemple que l'acide acétique est majoritaire en fin de réaction et que les acides oxalique et formique sont en quantité maximale au bout d'1h de réaction. L'acide acétique est souvent produit en fin de réaction d'OVH en raison de sa stabilité et de son caractère réfractaire à l'oxydation [Quitain, 2002].

B.2. Photocatalyse

La photocatalyse hétérogène est une méthode prometteuse pour l'élimination de polluants environnementaux. Elle utilise des semi-conducteurs irradiés par ultraviolet (UV), généralement le dioxyde de titane (TiO_2), pour produire des espèces fortement oxydantes (principalement OH^\bullet) pouvant détruire une grande variété de composés organiques toxiques. Idéalement, les produits en fin de réaction sont le dioxyde de carbone, l'eau et des ions inorganiques. Par rapport à l'OVHC précédente, la méthode s'applique à des effluents bien moins concentrés.

Nous allons étudier deux exemples d'applications réalisées au laboratoire sur la dégradation photocatalytique de pesticides ou d'herbicides. Les pesticides sont souvent utilisés en grandes quantités pour le traitement de certains fruits contre certaines maladies. Une partie va s'infiltrer dans le sol pour ensuite se retrouver dans les eaux de surface ou souterraines. Une contamination est alors possible devenant ainsi un réel danger pour l'environnement.

B.2.1. Dégradation du boscalide [Lagunas, 2010]

Cette étude porte donc sur la dégradation photocatalytique d'un pesticide en phase aqueuse, le boscalide, utilisé pour traiter notamment le raisin (Fig.5).

Les principaux objectifs étaient d'étudier la cinétique de la réaction de dégradation, d'identifier les intermédiaires tels que les acides carboxyliques et leur suivi cinétique. La concentration initiale en boscalide était de 3,5 mg/L. Après 2 heures d'irradiation UV, le boscalide est majoritairement converti en CO_2 et en H_2O . Cinq principaux acides ont été identifiés : les acides oxalique, acétique, malonique, formique et glyoxylique. Ils sont présents à des concentrations de 20 $\mu\text{mol/L}$ maximum. L'acide malonique est celui présent en plus grande quantité. Les analyses des acides ont été effectuées par LC, sur le principe d'exclusion ionique (colonne CarboSep Coregel 87H3). La détection est réalisée par UV à 210 nm.

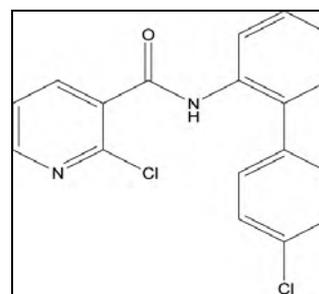


Fig.5 : Structure du boscalide [Lagunas, 2010]

B.2.2 Dégradation de l'iodosulfuron [Sleiman, 2007]

Cette étude concerne la dégradation du iodosulfuron méthyle ester (IOME) en phase aqueuse sous irradiation UV. L'IOME fait partie du groupe d'herbicide des sulfonylurées. Sa structure est donnée en Fig.6. Il est beaucoup utilisé en culture de céréales.

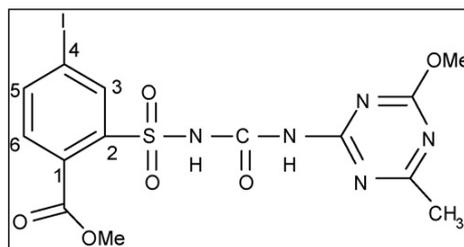


Fig.6 : Structure du IOME [Sleiman, 2007]

Les objectifs de cette étude sont les mêmes que ceux de la dégradation du boscalide. Les analyses des acides ont été effectuées dans les mêmes conditions. La concentration de départ en IOME était de 25 mg/L. De nombreux intermédiaires de réaction se forment. Cinq principaux acides ont été identifiés et quantifiés : les acides oxalique, formique, acétique, glycolique et glyoxylique. Leur suivi cinétique est présenté sur la Fig.7.

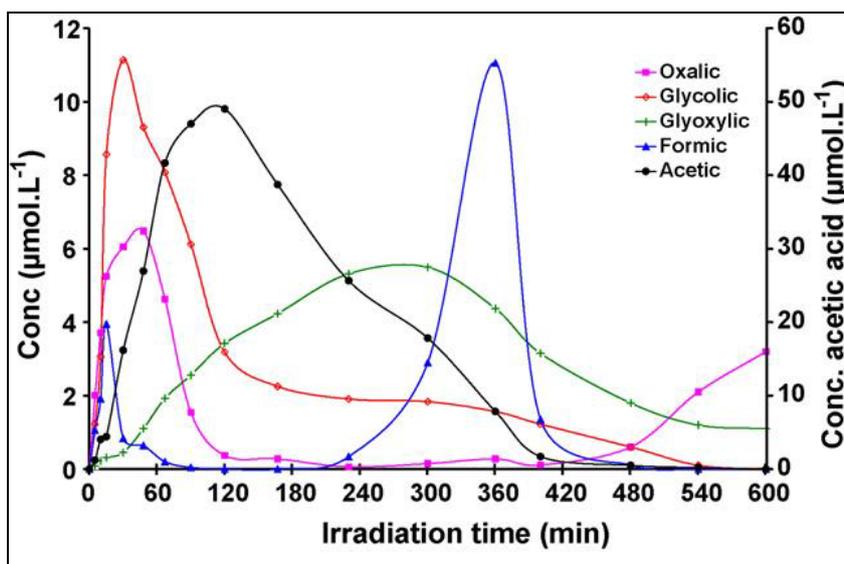


Fig.7 : Evolution des acides au cours de la dégradation photocatalytique de l'IOME [Sleiman, 2007]

On remarque que l'acide acétique atteint une concentration maximale aux alentours de 50 µmol/L au bout de 120 minutes. Les autres acides atteignent des concentrations maximales allant de 4 à 11 µmol/L à différents temps de réaction. Cet exemple montre également la différence de réactivité des différents acides pour leur minéralisation.

C. Analyses d'acides organiques en phase aqueuse

Un grand nombre de méthodes sont disponibles pour analyser les acides carboxyliques présents dans les effluents aqueux. Les propriétés physico-chimiques des acides, leurs concentrations, les matrices dans lesquelles ils se trouvent sont autant de facteurs qui permettent de choisir une technique pour un échantillon donné [Jurado, 2010].

Les échantillons peuvent être soit analysés directement sans prétraitement particulier, soit subir une étape d'extraction (préconcentration), soit subir une étape de dérivation afin de faciliter leur analyse. Différentes techniques d'analyse sont disponibles : la chromatographie en phase gazeuse (GC), la chromatographie en phase liquide (LC), la chromatographie ionique et l'électrophorèse capillaire (CE).

C.1. Préparations d'échantillons

La préparation d'échantillon est une étape très importante dans le processus analytique et a beaucoup évolué ces dernières années. Cette étape est nécessaire lorsque l'échantillon n'est pas analysable directement ou quand son analyse directe donne des résultats non exploitables. L'échantillon est alors modifié afin que sa composition ou sa structure soit plus appropriée à une technique d'analyse particulière.

Pour l'analyse des acides carboxyliques en phase aqueuse, la préparation peut être simple (filtration, centrifugation, acidification par exemple). On injecte alors l'échantillon directement dans l'appareil d'analyse mais des effets mémoires, des problèmes de contamination ou une maintenance plus régulière de l'appareil d'analyse peuvent intervenir. Une manière d'éviter ces désagréments est de procéder à une étape d'extraction des composés à analyser. Les techniques d'extraction prennent un peu plus de temps, peuvent entraîner une perte d'analytes (calcul de rendement). Elles améliorent cependant nettement les méthodes d'analyse, notamment en terme de sensibilité.

C.1.1. Extractions

C.1.1.1. Extraction liquide-liquide (LLE)

Les méthodes LLE permettent le transfert d'un soluté contenu dans une phase liquide vers une autre phase liquide non miscible. Elles sont employées afin de purifier et concentrer les échantillons avant une analyse chromatographique par exemple. La LLE est basée sur divers paramètres physico-chimiques propres aux solvants employés (miscibilité, constante

diélectrique, moment dipolaire, densité par exemple) et aux solutés à extraire (structure, constante d'acidité, nature et complexité de la matrice) [Abe, 2010].

C'est une méthode d'extraction simple à mettre en œuvre. Cependant, elle présente de nombreux inconvénients comme par exemple l'utilisation d'importants volumes de solvants organiques, l'entretien de la verrerie, le nombre d'étapes d'extraction entraînant des pertes et influant sur la reproductibilité des résultats. Le principe de la LLE est décrit dans l'annexe 1. Le caractère hydrophile des acides carboxyliques dans la matrice aqueuse rend difficile cette opération et entraîne une perte de solutés et une reproductibilité faible avec cette méthode [Wittmann, 2000]. Pour les acides organiques, les extractants couramment utilisés sont le tributyle phosphate ou l'oxyde trioctylphosphine et les diluants, l'hexane ou le dodécane.

C1.1.2 Technique headspace (HS) ou espace de tête

La technique headspace est un mode de préparation d'échantillon très utilisé dans de nombreux domaines industriels. Elle est basée sur la volatilité de l'analyte dans une matrice complexe non chromatographiable. Elle peut être soit statique, le prélèvement se fait dans l'espace de tête directement avec un volume constant, soit dynamique après piégeage de l'analyte sur un support que l'on désorbe par un choc thermique [Papet, 2010].

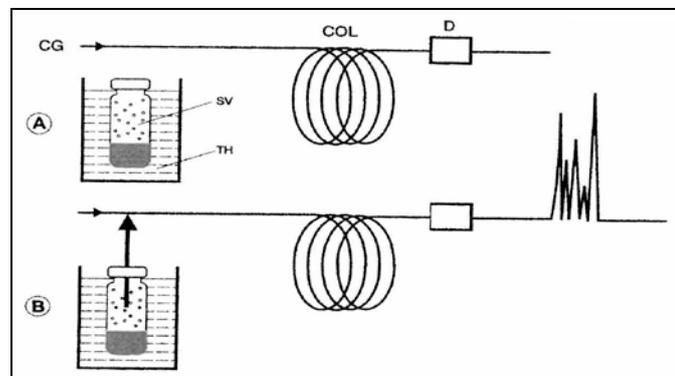


Fig.8 : Principe de l'HS-GC [Kolb, 2006]. (A) Equilibre entre les phases. (B) Transfert de l'échantillon. CG : gaz vecteur, SV : vial contenant l'échantillon, TH : thermostat, COL : colonne GC, D : détecteur

En mode statique, l'espace de tête permet des analyses rapides en n'utilisant pas de solvant et peut être automatisé. L'échantillon (liquide ou solide) est introduit dans un vial ou flacon fermé. Ce vial est chauffé à une température constante jusqu'à ce que l'équilibre entre les phases gaz et liquide soit atteint. Ensuite, une partie de la phase gaz du vial est injectée dans la chromatographie en phase gazeuse (Fig.8). La phase gaz peut être injectée manuellement à l'aide d'une seringue gas-tight ou automatiquement, en pressurant le vial. Nous verrons le mode dynamique dans le prochain paragraphe.

C.1.1.3. Extraction sur phase solide

Deux types d'extractions sur phase solide ont été développées, l'extraction SPE et la microextraction sur phase solide (SPME).

a. L'extraction SPE

L'extraction sur phase solide utilise un matériau solide pour retenir les solutés d'une solution afin de purifier et/ou concentrer l'échantillon. Elle s'est développée au début des années 1980.

Elle s'utilise généralement avec des cartouches en forme de seringue en polypropylène (PP) ou des cartouches possédant un embout Luer femelle à l'entrée permettant de s'adapter sur une seringue à usage unique. Une phase adsorbante solide, généralement de même nature que celle utilisée en LC, est introduite dans la cartouche et maintenue entre deux frittés de polyéthylène (PE) [Supelco, 1998].

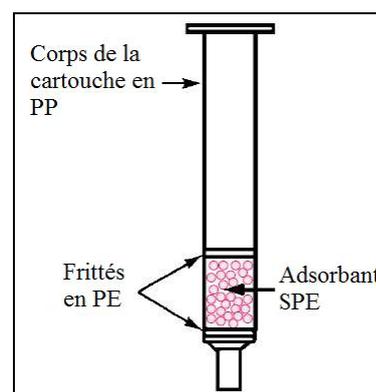


Fig.9 : Cartouche SPE [Supelco, 1998]

Un schéma d'une cartouche SPE est présenté Fig.9. Lorsque la solution est introduite dans cette cartouche, les solutés sont tout d'abord retenus sur la phase stationnaire solide et dans un deuxième temps élués en utilisant un solvant approprié. La SPE se déroule en 5 étapes présentées dans l'annexe 1. Ces solutés sont ensuite analysés. La SPE propose une grande variété d'adsorbants ayant des interactions polaires, hydrophobes et/ou ioniques avec le soluté alors que l'extraction liquide/liquide est limitée par les équilibres de partage dans la phase liquide. La procédure d'extraction dépend de la nature des composés à analyser, leur niveau de concentration, la matrice de l'échantillon et la technique analytique utilisée. Les différents types de phase et leurs applications sont présentés en annexe 2. La SPE présente plusieurs avantages : une faible consommation de solvant, un bon rendement, le fait de ne pas utiliser de verrerie pour les étapes de purification, un gain de temps, la possibilité d'automatisation et sa simplicité.

Des adsorbants à échange anionique tels que des amines aliphatiques quaternaires greffées sur une surface de silice [Ng, 2000], et des adsorbants polymériques [Jurado, 2010] ont été utilisés pour l'extraction d'acides carboxyliques dans des échantillons aqueux. Le pKa des amines quaternaires est très élevé (> 14) et les groupes fonctionnels restent chargés à tous les pH de la phase aqueuse.

b. La MicroExtraction sur Phase Solide (SPME)

La SPME s'est développée au début des années 1990 et est une évolution de la SPE. Elle est plus simple à mettre en œuvre que la SPE, ne nécessite pas de solvant ou d'appareillage spécifique pour la récupération des solutés extraits et est automatisable [Burgot, 2003]. Elle est utilisée sur un grand nombre de molécules organiques plus ou moins polaires, volatiles ou non à partir d'échantillons aqueux, solides ou gazeux, même en très faibles quantités.

Elle peut être utilisée soit en mode direct soit par couplage avec la technique dite à espace de tête.

En mode direct, les composés sont extraits par adsorption sur une fibre de silice fondue revêtue d'un polymère plongé dans l'échantillon (équilibre phase aqueuse/fibre), puis désorbés par voie thermique dans l'injecteur d'un GC ou par entraînement de la phase mobile en LC (Fig.10). La fibre peut être réutilisée une centaine de fois.



Fig.10 : Principe de la SPME [Varian, 1999]

La SPME est souvent couplée à la technique à espace de tête suivi d'une analyse par GC pour l'analyse d'acides dans des matrices aqueuses. Leur association permet d'augmenter la sensibilité des analytes recherchés et quantifiés.

Le but est d'isoler les solutés volatils à analyser de tous les composés formant la phase gaz du vial et pouvant venir interférer lors de l'analyse (Fig.11). Les composés volatils sont ainsi adsorbés sur la fibre (équilibre phase aqueuse/phase gazeuse/fibre) puis injectés en GC. Cette technique est appelée HS-SPME. Elle est automatisable et est proposée par de nombreux constructeurs de GC [Kolb, 2006].

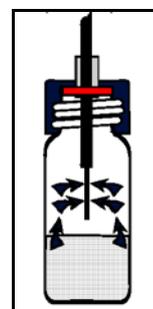


Fig.11 : Principe de la HS-SPME [Varian, 1999]

Il existe différents types de revêtement adsorbants et la plupart ont été testés pour l'extraction d'acides carboxyliques à chaînes courtes à partir de matrices aqueuses. A. Banel *et al.* (2011) ont utilisé des fibres en polyéthylène glycol (PEG) de 60µm et des fibres de polydiméthylsiloxane (PDMS) / carboxène (CAR) de 85 µm. M. Abalos *et al.* (2000) ont conclu, après avoir testé cinq fibres différentes pour ce type d'extraction, que la fibre en PDMS/CAR était la plus adaptée. Les particules de carboxène poreuses sont mélangées au polymère liquide.

C.1.2. Dérivation ou dérivatisation

Les deux termes, dérivation et dérivatisation, sont employés dans la littérature. Dans la suite de l'exposé, le mot dérivation sera utilisé.

La dérivation consiste à modifier chimiquement les produits à analyser en produits plus facilement analysables par une technique spécifique. Elle peut être couplée à une étape d'extraction.

C.1.2.1 La dérivation en chromatographie en phase gazeuse

La plupart des acides carboxyliques aliphatiques à chaînes courtes sont thermostables et suffisamment volatils pour une analyse en GC. Cependant, des diacides comme l'acide succinique ou oxalique ne peuvent être analysés directement en GC du fait de leur point d'ébullition élevé.

En GC, une dérivation des groupements fonctionnels polaires (généralement des atomes d'hydrogène labiles) par des réactifs appropriés permet de former des dérivés plus facilement analysables. Le but est de synthétiser ce dérivé de manière quantitative, rapide et reproductible. La dérivation permet d'augmenter ou de diminuer la volatilité de certaines substances, d'améliorer la séparation et de réduire la traînée des pics due à leur polarité sur des colonnes capillaires.

Mais, la présence d'une phase aqueuse dans les matrices environnementales rend difficile cette étape. L'eau peut souvent freiner la réaction ou hydrolyser l'agent dérivant, diminuant le rendement de dérivation. En effet, la plupart des procédures de dérivation utilisent des agents réactifs alkyles acides ou basiques comme catalyseurs. Ces réactions nécessitent de se placer dans un milieu organique [Pan, 1997]. Une étape d'extraction dans un solvant organique (hexane, méthanol) est donc souvent nécessaire en amont. Ces différentes étapes de préparation d'échantillon permettent d'augmenter la sensibilité mais ces différentes manipulations de l'échantillon peuvent aussi entraîner une perte de solutés. Des rendements de dérivation et d'extraction sont calculés.

Nous allons voir les deux modes de dérivation utilisés pour les acides organiques : l'alkylation et la silylation.

L'alkylation permet une diminution de la polarité de la molécule en remplaçant un hydrogène labile (-AH) par un groupement alkyle ou aromatique par une substitution nucléophile. Des réactifs contenant des halogénures fluorés de type fluorure de benzyle

peuvent être utilisés pour une détection à capture d'électrons (ECD). Son fonctionnement est expliqué en annexe 4. Les produits dérivés sont des esters qui sont des molécules stables. Les réactions peuvent être réalisées en milieu acide ou basique et les conditions sont généralement sévères. Quelques réactions peuvent avoir lieu en milieu aqueux [Registech, 2000].

Différents réactifs sont utilisés pour l'alkylation : le bromure de benzyle [Wittmann, 2000 ; Husek, 1998] ou le diazométhane [Wells, 1999]. L'estérification par des alcools en utilisant comme catalyseur acide le trifluorure de bore (BF₃) est également une procédure assez répandue pour l'analyse des acides organiques [Nollet, 2006 ; Tedetti, 2006]. Les acides sont dérivés en ester de butyle (Fig.12) puis extraits dans l'hexane.

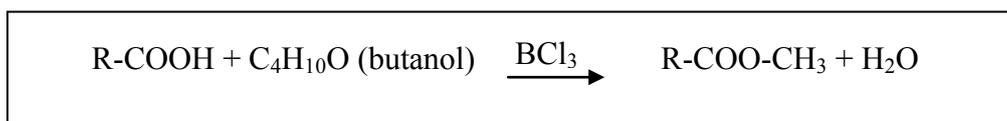


Fig.12 Réaction d'estérification d'un acide par un alcool

Une technique prometteuse, développée par Li Pan *et al.* (1997) et utilisée depuis par d'autres auteurs [Abalos, 2010 ; Banel, 2011], consiste à allier la dérivation et l'extraction par HS-SPME. Elle améliore l'efficacité de la SPME et de la méthode de détection. Li Pan *et al.* (1997) proposent deux méthodes. La première comporte deux étapes, une première de dérivation de l'échantillon et ensuite une extraction par HS-SPME, et la deuxième consiste à effectuer ces deux opérations en une seule en dopant la fibre de SPME par un agent dérivant, dans ce cas-là le pyrénildiazométhane (PDAM).

La silylation des acides produit des dérivés silylés qui sont plus volatils et plus stables thermiquement. Un hydrogène labile lié à un hétéroatome est remplacé par un groupement alkylsilyle tel le triméthylsilyle (Si-(CH₃)₃) ou le t-butylméthylsilyle par attaque nucléophile (SN2). Ainsi des liaisons hydrogènes sont éliminées formant un dérivé plus volatil et donnant un pic chromatographique plus symétrique. Un mécanisme général de réaction est présenté Fig.13 pour le triméthylsilyle.

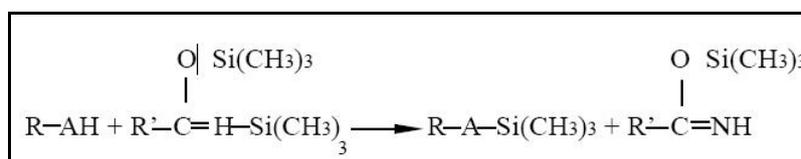


Fig.13 : Mécanisme réactionnel d'une silylation [Registech, 2000]

Les réactifs de silylation sont très sensibles à l'eau, les réactions de silylation se font donc toutes en milieu organique. La plupart des réactions sont simples et rapides en chauffant légèrement, et au maximum à 60°C pendant 10 à 15 minutes. La pyridine ou le

triméthylchlorosilane sont des solvants couramment utilisés pour ce type de réaction. N. Serpone *et al.* (2005) ont utilisé le *N,O*-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (BSTFA) avec 1% de triméthylchlorosilane (TMCS) comme catalyseur pour la dérivation de l'acide valérique. Les acides monocarboxyliques, au contraire des acides di-, tri- ou polycarboxyliques peuvent être dérivés en esters tertbutyldiméthylsilylés (TBDMS) en présence d'alcools acidifiés en utilisant comme réactif le *N*-(tert-butyldiméthylsilyl)-*N*-méthyltrifluoroacétamide (MTBSTFA) [Husek, 1998]. Dans certaines études, les étapes d'extraction et de dérivation sont réalisées simultanément. Ainsi, L.K. Ng *et al.* (2000) ont dérivé et extrait simultanément plusieurs mono-, di- et hydroxyacides en introduisant dans un vial des disques de SPE avec de l'acétonitrile et du *N*-méthyl-*N*-(triméthylsilyl)trifluoroacétamide (MSTFA). Le vial est ensuite fermé et chauffé à 80°C pendant 20 minutes puis transféré à l'injecteur automatique d'une GC couplée à un spectromètre de masse (GC-MS). Le principe du couplage d'une GC et d'un spectromètre de masse est donné en annexe 4. Les rendements pour l'acide glycolique étaient supérieurs à 80% et pour l'acide succinique de 40%.

C.1.2.2 La dérivation en chromatographie liquide

Les détecteurs en LC sont couramment l'UV ou la fluorescence. Les acides sont peu chromophores et une étape de dérivation peut être nécessaire en LC pour améliorer la limite de détection. Cependant, la dérivation en LC est moins utilisée qu'en GC. La synthèse de dérivés ayant un coefficient d'absorption dans l'UV supérieur ou de dérivés fluorescents permettant l'utilisation d'un détecteur par fluorimétrie par réaction de l'acide avec le 2-nitrophényl hydrazine (NPH) [Albert, 1997 ; Robert, 2009] peut être nécessaire. Des systèmes LC avec dérivation en pré ou post-colonne existent.

C.2 Techniques analytiques

Dans la bibliographie, la majorité des analyses d'acides carboxyliques sont réalisées par GC, LC ou chromatographie ionique. L'électrophorèse capillaire est utilisée mais moins largement. Le principe de chaque technique, un descriptif sommaire de l'appareillage et des conditions d'analyses et des informations plus spécifiques pour l'analyse des acides organiques en phase aqueuse seront présentées. Les limites de détection (LOD) et quantification (LOQ) observées pour chacune d'entre elles seront données. Ces limites ainsi que leurs calculs sont définis en annexe 6.

C.2.1. La chromatographie en phase gazeuse (GC)

Le principe général de toute séparation chromatographique repose sur la différence de distribution des analytes entre les deux phases stationnaire et mobile. La distribution s'effectue grâce aux forces moléculaires qu'il existe entre les molécules du soluté et celles des deux phases. Plus la force entre ces molécules et la phase stationnaire sera importante, plus le soluté sera retenu. Plus l'affinité entre la phase mobile et les molécules sera importante, plus le soluté sera entraîné. Les forces moléculaires peuvent être ioniques, polaires, de dispersion ou par liaison hydrogène. Elles sont décrites en annexe 3.

Dans le cas de la GC, la phase mobile est inerte. La GC est une méthode de séparation et de quantification de composés gazeux ou pouvant être vaporisés par chauffage sans décomposition. Le domaine essentiel est l'analyse des composés organiques. L'échantillon, à l'état gazeux, passe au travers de la colonne dans un flux de gaz inerte et ses différents constituants sont ensuite séparés par la colonne. L'échantillon, s'il est liquide, est donc vaporisé pour l'analyse. Cette chromatographie est réservée aux produits volatils et thermostables. La GC est une technique très répandue de part sa grande sensibilité, sa polyvalence et sa rapidité de mise au point de nouvelles analyses.

La méthode d'étalonnage interne est souvent utilisée pour les analyses (annexe 5). Les étalons rencontrés pour l'analyse des acides carboxyliques sont l'acide 2-éthylbutyrique, l'acide isocaproïque, le 2-t-butyl-4-méthylphenol, l'acide hexanoïque [Nollet, 2006]. Ces étalons ont une structure chimique et des points d'ébullition proches de ceux des acides étudiés.

Les échantillons sont souvent acidifiés [Abalos, 2010 ; Tedetti, 2006 ; Morin, 2007] avant injection directe ou avant extraction. Les acides carboxyliques sont alors sous leur forme moléculaire ($\text{pH} = \text{pKa} - 2$) et ils interagissent plus facilement avec la phase stationnaire polaire. Des pics plus symétriques et sans traînée sont alors obtenus. Dans le cas contraire, ils se trouvent sous forme ionique, ne sont pas volatils et restent sous forme de sels dans le port d'injection [Morin, 2007].

Dans la littérature, les colonnes les plus couramment utilisées pour ces échantillons contenant des acides sont composées de phases stationnaires fortement polaires [Banel, 2011 ; Cruwys, 2002 ; Jurado, 2010]. Des colonnes plus classiques et avec des phases moins polaires sont également utilisées [Pan, 1997 ; Wittmann, 2000].

Les colonnes fortement polaires sont composées de polyéthylène glycol (PEG) pour les colonnes dites Carbowax et de PEG modifié par traitement acide pour les colonnes dites FFAP (Free Fatty Acid Phase). La température maximum d'utilisation est de 250°C pour ces

deux types de colonne. Les colonnes moins polaires et plus classiques sont composées de polysiloxanes avec 100% de diméthylpolysiloxane (RTX-1, DB-1) ou 5% phényl- et 95% méthylpolysiloxane (DB-5, SPB-5) pour les plus répandues. Elles peuvent être utilisées jusqu'à des températures de 350°C.

Sur les colonnes de type FFAP, les échantillons ne sont généralement pas dérivés. Sur les colonnes de type Carbowax, les échantillons sont dérivés ou non. Sur les colonnes moins polaires, les échantillons sont dérivés avant analyse. Comme les agents dérivants vont dériver presque tous les hydrogènes labiles, ils ne doivent pas être injectés sur des colonnes avec des phases stationnaires contenant ces groupes fonctionnels. Ainsi, les réactions de silylation doivent être évitées avec les colonnes Carbowax et FFAP [Registech, 2000].

Une fois les analytes séparés, ils arrivent au détecteur. Leur but est de produire un signal à l'apparition d'un soluté. Ils permettent de réaliser une analyse qualitative et/ou quantitative. Ceux utilisés en GC sont principalement le détecteur à ionisation de flamme, FID [Cruwys, 2002 ; Pan, 1997 ; Serpone, 2005], la spectrométrie de masse [Abalos, 2000 ; Jurado, 2010 ; Ng, 2000] et le détecteur à capture d'électron, ECD [Pan, 1997]. Leur fonctionnement est donné en annexe 4.

Le FID est un détecteur non spécifique, il détecte les composés organiques alors que l'ECD est un détecteur très sensible pour les dérivés halogénés. Pour ce dernier, une étape de dérivation avec un composé halogéné est donc nécessaire pour l'analyse des acides carboxyliques. Pour ces deux détecteurs, les temps de rétention sont utilisés pour l'identification. Le spectromètre de masse est utilisé dans plusieurs études pour identifier des composés de réaction inconnus et également améliorer la sensibilité.

Les limites de détection (LOD) données dans le Tableau II sont pour des acides carboxyliques C₂ à C₅ en phase aqueuse. La colonne RTX-200 est une colonne moyennement polaire à base de trifluoropropylméthylpolysiloxane.

Tableau II : Limites de détection en GC

Auteur	Année	Préparation d'échantillon	Colonne	Détection	LOD
E. Morin <i>et al.</i>	2007	Acidification à pH = 2,5	RTX-200 (Restek)	FID	5 mg/L
B. Jurado-Sanchez <i>et al.</i>	2010	SPE	Innowax (Agilent)	FID MS	quelques µg/L 10 ng/L
Cruwys <i>et al.</i>	2002	Headspace	FFAP (Perkin-Elmer)	FID	quelques mg/L
M. Abalos <i>et al.</i>	2000	SPME/HS	TR-FFAP(Teknokroma)	FID MS	50 µg/L quelques µg/L
L. Pan <i>et al.</i>	1997	Dérivation et HS/SPME	SPB-5 (Supelco)	FID ECD	quelques µg/L 0,5 µg/L

C.2.2 La chromatographie liquide

La LC est une méthode physico-chimique de séparation basée sur des interactions liquide/solide. L'échantillon à analyser est en solution et est constitué de produits à séparer (les solutés). Ces derniers se répartissent suivant leur affinité entre la phase mobile liquide et la phase stationnaire. Cette phase stationnaire est le constituant principal de la colonne chromatographique qui est placée dans une enceinte thermostatée.

En chromatographie liquide de phase inversée (RP-LC), la phase stationnaire est apolaire alors que la phase mobile est un solvant polaire comme l'eau, le méthanol ou l'acétonitrile, seul ou en mélange. Quatre types d'interactions existent entre les molécules de solvant, la phase stationnaire et le soluté : ionique, de dispersion, diélectrique et par liaison hydrogène (annexe 3). Les colonnes sont composées de silice sur laquelle sont greffées des groupements alkyls allant de 8 à 18 atomes de carbone en général.

Pour l'analyse des acides carboxyliques, la séparation est suivie par UV, fluorescence après dérivation ou moins largement par MS.

Les acides en RP-LC peuvent être directement analysés. E. Destendreau *et al.* (2005) n'ont pas calculé les LOD pour l'analyse des acides carboxyliques dans leurs effluents industriels mais ont déterminé les concentrations minimales de quantification pour leurs analyses qui sont de 20 mg/L. Une étape d'extraction peut avoir lieu au préalable. S.F. Chen *et al.* (2006) ont utilisé la LLE pour extraire les acides en présence du méthyltertiobutyléther (MTBE). Ils obtiennent des LOD comprises entre 0,2 et 0,7 mg/L par UV pour les acides C₂ à C₅. J. Zhan *et al.* (2010) ont analysé l'acide glyoxylique dans une réaction d'oxydation sélective avec une étape d'extraction SPE sur des cartouches d'échange anionique (SAX, Strong Anion eXchange). Les acides glyoxylique, oxalique et formique ont été séparés sur une colonne C₁₈ en mode isocratique (composition constante de la phase mobile) avec un mélange eau/acétonitrile (95:5) tout au long de l'analyse puis une détection par UV (longueur d'onde 210 nm). Les LOD obtenues sont de l'ordre de 0,2 mg/L pour l'acide glyoxylique et formique et de 0,04 mg/L pour l'acide oxalique. Après dérivation, les limites de détection peuvent atteindre 0,1 µg/L.

C.2.3 La chromatographie ionique

La chromatographie ionique est une méthode de chromatographie liquide basée sur la rétention d'anions ou de cations en solution. Pour l'analyse des acides, nous allons nous intéresser à la chromatographie d'exclusion ionique (IEC) et la chromatographie d'échange

anionique. Dans la première méthode, les acides partiellement ionisés ou sous forme moléculaire sont séparés sur une phase stationnaire anionique, alors qu'en échange d'anions, les acides totalement ionisés sont séparés sur une phase stationnaire cationique.

C.2.3.1 La chromatographie d'exclusion ionique (IEC)

La chromatographie d'exclusion ionique est particulièrement adaptée pour l'analyse de petits acides organiques faibles dans une matrice à forte force ionique. Elle est très utilisée pour l'analyse des acides mono-, di- et tricarboxyliques [Fisher, 2002 ; MacGinnis, 2001 ; Ohta, 2003] et peut servir pour l'analyse des alcools, aldéhydes ou des acides aminés.

La séparation en IEC est un procédé complexe basé sur la force de répulsion coulombienne entre les ions. Elle permet la séparation d'espèces partiellement ionisées sur des résines fortement chargées.

Les colonnes sont remplies de copolymères sur lesquels sont greffés des groupements fonctionnels anioniques ionisables. Les plus répandues sont composées de copolymères divinylbenzène/polystyrène entièrement sulfonés (-SO₃H). L'acide sulfonique est un acide fort avec une forte capacité échangeuse de cation. Les acides sont donc ionisés quels que soit le pH de la solution avec laquelle ils sont mis en contact. La capacité d'échange d'ions correspond au nombre de groupements fonctionnels accessibles à l'échange d'ions par unité de masse (meq/g). Les phases stationnaires sont stables pour des pH de 0 à 14. La détection est le plus souvent réalisée par UV ou par conductimétrie. Des solutions aqueuses d'acides minéraux tels que l'acide sulfurique sont utilisées comme éluant pour une détection directe en UV et des éluants à base d'acide aliphatique sulfonique (acide méthanesulfonique ou octanesulfonique) sont utilisés pour une détection par conductivité. La concentration en acide de l'éluant permet d'optimiser la séparation et les acides organiques éluent suivant leur pKa.

L'identification des composés en IEC est réalisée par comparaison des temps de rétention avec ceux des produits purs. Les acides carboxyliques connus pour coéluer avec ce type de colonne sont les acides fumarique/acétique ou succinique/glycolique [Nollet, 2006]. Cette méthode souffre de limites de détection moyennes et d'une faible résolution des pics pouvant conduire à des ambiguïtés quant à l'identification. Mais elle est simple à mettre en place.

Les limites de détections obtenues sont comprises entre 0,5 et quelques mg/L suivant le volume d'injection et le type de colonne utilisés [Fisher, 2002].

C.2.3.2 La chromatographie d'échange anionique (AEC)

Cette technique est utilisée pour l'analyse des ions et des composés polaires ionisés. Les colonnes contiennent des phases stationnaires sur lesquelles sont greffés des sites ioniques et se comportent comme un échangeur d'ions. Ainsi, des interactions dipolaires permettent la séparation des solutés. Pour les acides organiques, les mécanismes décrits pour la RP-LC entrent également en jeu. Les acides organiques se dissocient au pH élevé de la phase mobile en anions carboxylates et peuvent être analysés par AEC. Dans la plupart des applications, les échantillons sont injectés directement sans prétraitement.

Les colonnes les plus répandues sont composées de copolymères divinylbenzène/polystyrène sur lesquels viennent se greffer des groupes ammoniums quaternaires. Elles possèdent une faible capacité échangeuse d'ions. Les éluants sont généralement des hydroxydes, carbonates, bicarbonates ou borates. La détection est réalisée par conductivité et moins largement par MS. Un suppresseur est utilisé pour supprimer la conductivité de la ligne de base et ainsi améliorer la sensibilité.

G.T. Chi *et al.* (2007) ont utilisé cette technique pour analyser les acides organiques pendant une oxydation de polluants organiques. Les LOD obtenues varient entre 0.02 et 0.1 mg/L suivant les acides analysés. Seul l'acide oxalique a une LOD élevée de 10 mg/L.

C.3 L'électrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire est une technique complémentaire de la chromatographie et permet la séparation de nombreuses molécules ioniques. L'électrophorèse est le transport d'ions dans la direction d'une électrode sous l'action d'un champ électrique, au sein d'un électrolyte. La vitesse de déplacement des ions est fonction de leurs caractéristiques (charges, volumes...). L'électrophorèse est une technique de séparation d'espèces chargées. Une variante de cette technique permet également de séparer des espèces neutres.

C'est une méthode qui possède de nombreux avantages : efficacité et résolution élevées, rapidité et automatisation des séparations, faible consommation d'échantillon (de l'ordre du nL) par exemple. Cette technique est moins utilisée que les autres décrites précédemment. La détection est réalisée par UV ou fluorescence.

F-H Chi *et al.* (2005) ont analysé l'acide propionique, butyrique et valérique par cette méthode à une concentration minimale de 50 mg/L. M. Kibler (1999) ont dérivé les acides avant injection en électrophorèse capillaire. Ils obtiennent des LOD allant de 5 µg/L pour l'acide valérique à 9 µg/L pour l'acide acétique.

Nous venons de faire un récapitulatif bibliographique des techniques couramment utilisées pour l'analyse des acides carboxyliques en phase aqueuse. Nous allons maintenant faire un choix quant aux acides à analyser pour ce mémoire.

D. Choix, propriétés et préparation des acides

D.1 Choix des acides étudiés

Dans le paragraphe « B. Etudes réalisées au laboratoire », nous avons pu voir deux types de réactions d'oxydation et quelques modèles de substrats utilisés dans notre laboratoire. Dans la majeure partie des études, on observe que l'acide acétique, l'acide oxalique, l'acide formique sont souvent formés. Il convient donc de les étudier.

L'étude portant sur les acides gras volatils par OVH est aussi intéressante et prometteuse, l'analyse des acides propionique, butyrique, iso-butyrique et valérique fera partie de ce rapport.

De plus, en OVHC, l'acide succinique est un intermédiaire de réaction très étudié, son analyse, si elle peut être améliorée, peut s'avérer utile.

Enfin, en photocatalyse, les acides glyoxylique et glycolique sont couramment rencontrés au cours des réactions, nous les étudierons donc dans ce rapport.

Ce rapport portera donc sur une étude approfondie de dix acides et diacides organiques à chaînes courtes récapitulés dans le Tableau III ci-dessous regroupant des données caractéristiques. Le log(P) définissant la polarité est expliqué dans le paragraphe suivant.

Tableau III : Liste des acides étudiés [Nollet, 2006 ; UAkron, 2010]

Nom	Formule	Structure	pKa1	pKa2	Masse molaire (g/mol)	Log(P)
Acides monocarboxyliques						
Acide formique	CH ₂ O ₂	HCOOH	3,75	-	46,03	-0,54
Acide acétique	C ₂ H ₄ O ₂	CH ₃ -COOH	4,75	-	60,05	-0,31
Acide propionique	C ₃ H ₆ O ₂	CH ₃ -CH ₂ -COOH	4,87	-	74,08	0,33
Acide butyrique	C ₄ H ₈ O ₂	CH ₃ -(CH ₂) ₂ -COOH	4,81	-	88,12	0,79
Acide iso-butyrique	C ₄ H ₈ O ₂	(CH ₃) ₂ -CH-COOH	4,77	-	88,12	0,88
Acide n-valérique	C ₅ H ₁₀ O ₂	CH ₃ -(CH ₂) ₃ -COOH	4,82	-	102,13	1,39
α-hydroxyacide						
Acide glycolique	C ₂ H ₄ O ₃	CH ₂ (OH)-COOH	3,83	-	76,05	-1,11
α-aldoacide						
Acide glyoxylique	C ₂ H ₂ O ₃	CHO-COOH	3,34	-	74,04	-0,93
Acides dicarboxyliques						
Acide oxalique	C ₂ H ₂ O ₄	HOOC-COOH	1,23	4,19	90,04	-0,7
Acide succinique	C ₄ H ₆ O ₄	HOOC-(CH ₂) ₂ -COOH	4,16	5,61	118,09	-0,59

Le caractère acide d'une molécule de formule Z-C-COOH dépend en partie des effets électroniques des substituants du C α . Plus le groupement Z est électroattracteur, plus l'acidité est accrue. Plus Z est électrorépulseur, plus l'acidité diminue [Arnaud, 1981]. Ainsi, pour les deux acides dicarboxyliques, le groupement Z de l'acide oxalique (-COOH) étant plus électroattracteur que le groupement CH₂ de succinique, son pKa sera plus faible.

Parmi ces dix acides, nous avons des acides monocarboxyliques, un α -hydroxyacide, un α -aldoacide et des acides dicarboxyliques. Cette liste n'est évidemment pas exhaustive, bien d'autres acides peuvent se former lors des réactions (acide acrylique, acide malonique, acide fumarique par exemple). Mais, comme un large éventail de ce type de molécule est représenté et chacun d'entre eux ayant des propriétés différentes sur la polarité, le pKa, la température d'ébullition, il suffira d'adapter les méthodes décrites dans ce rapport pour tout nouvel acide à analyser.

D.2 La polarité des solutés en LC [Caude, 1994]

En LC, la rétention peut être liée à des interactions hydrophobes. Ces interactions sont liées à la structure de l'eau. Les molécules d'eau ne sont pas libres mais associées par des liaisons hydrogènes. Ces complexes sont labiles, c'est-à-dire qu'ils se brisent et se reforment constamment. Les interactions hydrophobes augmentent avec la force ionique de la solution mais diminuent lorsqu'un solvant organique est ajouté à l'eau, par exemple le méthanol ou l'acétonitrile. Ces interactions dépendent de la nature des solutés. Il est important de pouvoir classer les solutés en fonction de leur affinité pour l'eau (hydrophilie) ou pour les chaînes alkyles des silices greffées par exemple (hydrophobie ou lipophilie).

Le coefficient de partage P d'un soluté X entre l'eau et le n-octanol représente une mesure valable de l'hydrophobie d'un soluté (plus P est grand, plus le soluté est hydrophobe). Ce coefficient de partage d'un soluté X est défini à partir de l'équilibre $X_{\text{eau}} \rightleftharpoons X_{\text{octanol}}$ par la relation (4) :

$$P = C_{\text{octanol}} / C_{\text{eau}} \quad (4)$$

(avec C_{octanol} et C_{eau} les concentrations du soluté à l'équilibre dans les deux phases).

L'interprétation de très nombreuses mesures expérimentales de P a conduit à proposer une méthode permettant de calculer a priori la lipophilie d'un soluté quelconque suivant sa structure. Les valeurs de log(P) pour les acides étudiés sont données dans le Tableau III.

D.3 Les solutions étalons

D.3.1 Norme NF XP T 90-210 [AFNOR, 1999]

Afin de travailler avec un protocole cadré pour la détermination des limites de détection et de quantification, nous allons nous appuyer sur l'évaluation des performances d'une méthode d'analyse décrite dans la norme NF XP T 90-210 sur la qualité de l'eau publiée par l'AFNOR ayant pour titre : « Protocole d'évaluation d'une méthode alternative d'analyse physico-chimique quantitative par rapport à une méthode de référence » et plus particulièrement le paragraphe 5.1.

Dans un premier temps, pour la réalisation de ce protocole, il convient de choisir le nombre de niveaux correspondant aux différentes concentrations de solution étalons (p) et le nombre de répétitions pour chaque niveau (n). Dans la norme, il est dit qu'il est préférable de préparer au minimum $p = 5$ niveaux de concentrations différentes et au moins $n = 5$ répétitions pour chaque niveau. Ainsi, dans cette étude nous allons préparer 6 niveaux d'étalonnage et chaque niveau sera répété 5 fois, soit un total de 30 analyses par acide pour déterminer les limites de détection et quantification pour chaque technique analytique.

Dans notre cas, l'analyse sera une analyse chromatographique, le résultat sera donc une aire de pics (valeur d'information) fonction d'une concentration en mg/L.

D.3.2 Gamme de calibration et méthode d'étalonnage

Nous avons pu remarquer que les concentrations d'acides sont très différentes suivant le procédé d'oxydation utilisé. En effet, pour la photocatalyse, des quantités d'acides de l'ordre de quelques mg/L sont produites alors qu'en OVHC, l'ordre de grandeur est de quelques centaines de mg/L à quelques g/L. Pour déterminer les LOD et LOQ, il convient de se placer à des concentrations proches des limites basses. Nous allons commencer cette étude avec la chromatographie liquide à exclusion d'ions (IEC) couramment utilisée au laboratoire pour l'analyse des acides organiques. La valeur de 1 à 2 mg/L comme valeur basse de la gamme de calibration est une concentration proche de la limite de quantification que nous déterminerons (avec un volume d'injection de 20 μ L). La valeur haute de 100 mg/L est une concentration intermédiaire entre les concentrations observées en photocatalyse et OVHC. Pour l'étude des LOD et LOQ, il convient également de ne pas trop étendre la gamme d'étalonnage.

Il s'agit dans cette étude de comparer les différentes techniques d'analyse entre elles. Si une technique paraît meilleure que celle actuellement utilisée, il conviendra de l'adapter aux

concentrations rencontrées. Ces limites pourront également évoluer suivant la sensibilité de la technique étudiée. Suivant la technique utilisée, un étalonnage externe ou interne sera utilisé. Ces deux types d'étalonnage sont décrits dans l'annexe 5.

D.3.3 Validation de la méthode d'analyse

Les caractéristiques utilisées dans cette étude pour valider la méthode d'analyse sont données et définies en annexe 6. Il s'agit de la sensibilité, du blanc, de la répétabilité, de la linéarité et des limites de détection et quantification.

D.3.4 Préparation des solutions mères en phase aqueuse

Une solution mère de chaque acide sera préparée à 500 mg/L à partir des produits purs. La concentration de 500 mg/L a été choisie pour une plus grande stabilité dans le temps par rapport à une concentration moindre. Ces solutions sont préparées tous les 6 mois et conservées au réfrigérateur.

Une fois préparée, la concentration réelle en acide est vérifiée par une analyse du carbone organique total (TOC) de chaque solution. Le TOC est un des paramètres les plus importants du point de vue de la caractérisation des eaux usées. Son principe est décrit en annexe 7. Prenons un exemple pour l'acide acétique. L'acide acétique possède 2 carbones. Une concentration de 500 mg/L d'acide acétique doit correspondre à une concentration en mg de carbone / L de :

$$\text{TOC} = (500 * 2 * 12) / 60 = 200 \text{ mg}_C / \text{L}$$

Le TOC mesuré nous donne une valeur de 202 mg_C / L.

Après préparation chaque concentration est vérifiée. L'injection régulière des solutions d'acides en chromatographie liquide permet de vérifier que les solutions ne se dégradent pas durant les 6 mois en comparant les réponses du détecteur obtenues.

Pour conclure sur cette partie, les techniques d'analyse disponibles au laboratoire et utilisées pour les travaux de ce rapport sont la chromatographie d'exclusion ionique, la chromatographie d'échange anionique, la chromatographie liquide de phase inversée et la chromatographie en phase gazeuse. Comme toutes ces techniques sont basées sur la chromatographie, nous allons brièvement décrire cette technique et présenter les différentes grandeurs la caractérisant.

Partie II :
Généralités sur la chromatographie

A. Théorie de la chromatographie [Caude, 1994]

En chromatographie, les séparations sont fondées sur la distribution des espèces entre deux phases non miscibles, l'une stationnaire et l'autre mobile. Cette distribution est définie par le coefficient de partage K :

$$K = C_s / C_m \quad (5)$$

(avec C_s et C_m les concentrations respectives du soluté à l'équilibre dans les phases stationnaire et mobile).

En chromatographie en phase liquide, la séparation dépend de la nature des phases stationnaire et mobile, du soluté et de la température. En chromatographie en phase gazeuse, la phase mobile étant inerte, la séparation dépend de la nature de la phase stationnaire, du soluté et de la température. Les interactions solutés-solvants comprennent les forces intermoléculaires de dispersion, d'induction (liaisons hydrogène et transfert de charges) et d'orientation (interactions électrostatiques entre les espèces ionisées en solution).

Chaque soluté injecté est entraîné par la phase mobile et dans le même temps, retenu par la phase stationnaire. Des pics symétriques gaussiens sont obtenus en sortie de détecteur. Une bonne séparation en chromatographie implique que les divers constituants du mélange soient retenus dans la colonne, que les différents pics soient bien séparés, les bandes de soluté se séparent entre elles (sélectivité) plus vite qu'elles ne s'évalent (efficacité), et que l'analyse soit la plus rapide possible.

B. Grandeurs de rétention [Caude, 1994]

B.1 Les temps et volume de rétention

Soit un pic chromatographique défini comme sur la Fig.14. Le temps de rétention, t_R en min, d'un soluté est le temps d'élution au sommet du pic, mesuré à partir de l'injection.

Le volume de rétention V_R en mL représente le volume de phase mobile nécessaire pour que le soluté traverse tout le système chromatographique, compte tenu de la rétention avec la phase stationnaire.

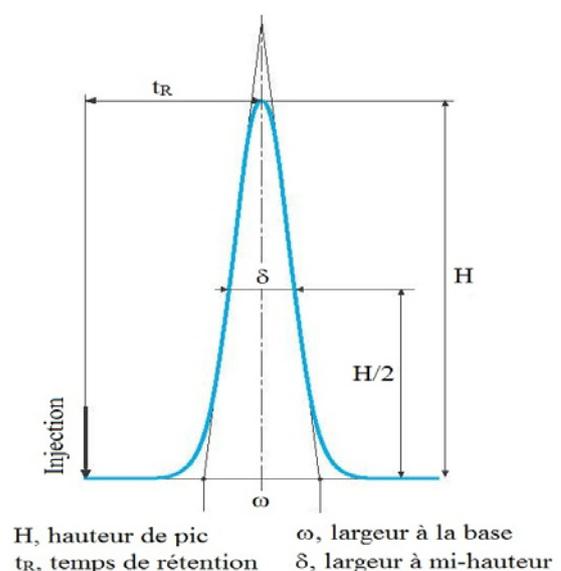


Fig.14 Caractéristiques d'un pic chromatographique [Caude, 1994]

Le volume de rétention est relié au temps de rétention par le débit de la phase mobile :

$$V_R = D \times t_R \quad (6) \quad (\text{avec } D, \text{ le débit en mL/min})$$

B.2 Le volume mort

Le volume mort, V_m , correspond au volume de phase mobile nécessaire pour traverser le système chromatographique pour une espèce n'ayant aucune affinité avec la phase stationnaire et donc non retenue. Le volume de rétention est directement relié au coefficient de partage K par la relation :

$$V_R = V_m + K \times V_S \quad (7) \quad (\text{avec } V_S, \text{ le volume de la phase stationnaire en mL})$$

B.3 Le facteur de capacité ou de rétention

Afin de s'affranchir des paramètres géométriques de la colonne, on utilise pour caractériser la rétention d'un composé, le facteur de rétention k , défini comme le rapport de la quantité de soluté dans la phase stationnaire à la quantité de soluté dans la phase mobile. Il est défini par la formule (8) et peut être calculé facilement par la relation (9).

$$k = K \times \left(\frac{V_S}{V_m} \right) \quad (8) \quad k = \frac{(t_R - t_m)}{t_m} \quad (9)$$

C. L'efficacité [Caude, 1994]

L'efficacité d'une colonne chromatographique dépend de l'étalement des pics et est mesurée pour chaque composé par le nombre de plateaux théoriques N de la colonne. Un plateau théorique est la portion de colonne nécessaire à l'établissement de l'équilibre du soluté entre la phase stationnaire et la phase mobile. Plus l'efficacité est importante, plus le pic sera fin. Cet étalement dépend de la dispersion des molécules par diffusion longitudinale, de l'existence de chemins multiples dus au remplissage et à la résistance au transfert de masse. On établit que le nombre de plateaux théoriques d'une colonne s'exprime, pour un soluté donné, par les relations (10) :

$$N = 16 \times \left(\frac{t_R}{\omega} \right)^2 = 5,54 \times \left(\frac{t_R}{\delta} \right)^2 \quad (10)$$

(avec ω , la largeur du pic à la base et δ , la largeur du pic à mi-hauteur).

Pour pouvoir comparer entre elles des colonnes chromatographiques, on définit la hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT ou H) selon la relation (11):

$$H = \frac{L}{N} \quad (11), \text{ (avec } L, \text{ la longueur de la colonne).}$$

D. Grandeurs de séparation [Caude, 1994]

Soit 2 pics consécutifs nommés 1 et 2 de temps de rétention respectifs t_{R1} et t_{R2} .

D.1 La sélectivité

La sélectivité, α , précise les positions relatives de deux pics adjacents. Elle permet de caractériser la distance entre les sommets de deux pics consécutifs 1 et 2. On la calcule suivant la relation (12) :

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (12)$$

La sélectivité doit être supérieure à 1 pour une bonne séparation. Cette valeur est une condition nécessaire mais pas suffisante pour une bonne résolution.

D.2 La résolution

Les pics 1 et 2 sont dits résolus si le premier pic retourne à la ligne de base avant que le second ne débute (Fig.15), correspondant à une résolution de 1,5. La résolution entre deux pics est défini par :

$$R_s = 2 \times \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(\omega_1 + \omega_2)} \quad (13)$$

(avec ω_1 et ω_2 , les largeurs à la base des pics)

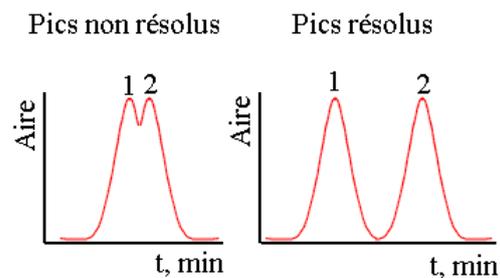


Fig.15 : Résolution entre 2 pics

La séparation entre deux pics est d'autant meilleure que la résolution est grande. On admet qu'une résolution supérieure à 1 est tolérable pour une quantification. Elle est également exprimée par la relation (14).

$$R_s = \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k_2}{k_2 + 1} \right) (N_2)^{1/2} \quad (14)$$

Il apparaît donc que la résolution est un paramètre essentiel pour qualifier une séparation puisqu'elle est reliée à la sélectivité, au facteur de capacité et à l'efficacité. Une séparation pourra être améliorée en jouant sur un de ses trois facteurs.

Après ce bref résumé du principe général de la chromatographie, chaque technique utilisée (la chromatographie ionique comprenant l'exclusion ionique, et l'échange anionique, la chromatographie liquide de phase inversée et la chromatographie en phase gazeuse) fera l'objet d'une partie dans laquelle l'appareillage et un descriptif des colonnes et des conditions d'analyse seront présentés. Les résultats obtenus pour la séparation (ordre d'élution, optimisation et validation de la méthode) seront ensuite discutés.

Partie III :

La chromatographie ionique

- La chromatographie d'exclusion ionique (IEC)**
 - La chromatographie d'échange anionique (AEC)**
-

La chromatographie d'exclusion ionique (IEC)

A. Appareillage

Les analyses sont effectuées sur une chaîne HPLC composée de :

- un dégazeur Phenomenex, DEGASSEX model DG-4400,
- deux pompes Shimadzu, LC-20AD avec un gradient haute-pression,
- un passeur automatique d'échantillon Shimadzu, SIL-20A,
- un four Shimadzu, CTO-10ASvp, thermostaté à 40°C,
- un détecteur UV Shimadzu, SPD-20A.

Le principe de fonctionnement du détecteur UV est donné en annexe 8. Il mesure l'absorbance d'un solvant et d'un soluté à une longueur d'onde définie. Les acides organiques sont analysés à 210 nm car au-delà, leur réponse est faible. Leurs spectres UV sont semblables et celui de l'acide valérique est présenté en annexe 8. Cependant, il n'est pas très sélectif puisqu'il est également sensible aux composés interférents de la matrice.

La colonne utilisée est de marque Transgenomic, ICSep, Coregel 107H (longueur 300mm et diamètre interne, ID, 7,8 mm). La phase mobile est une solution d'acide sulfurique diluée à des concentrations comprises entre 0,001 (pH = 3) et 0,05 N (pH = 1,6).

B. Principe de fonctionnement

La séparation en IEC dépend de trois phénomènes : l'exclusion ionique dite de Donnan, l'exclusion de taille et des phénomènes d'adsorption. La phase stationnaire, aussi appelée résine, est composée, dans notre cas, de particules de 9 µm de diamètre d'un mélange de copolymère de polystyrène et de divinylbenzène (PS/DVB) greffé avec des groupements sulfoniques (SO_3^-). Ces résines sont caractérisées principalement par leur degré de réticulation (quantité de divinylbenzène présent dans le copolymère, dans notre cas, 10%), la taille des particules, leur capacité d'échange d'ions.

Le greffage permet à la phase de stationnaire de se comporter comme si elle était chargée négativement. L'eau provenant de la phase mobile et passant au travers de la colonne forme une enveloppe hydratée autour des groupements sulfonés (Fig.16).

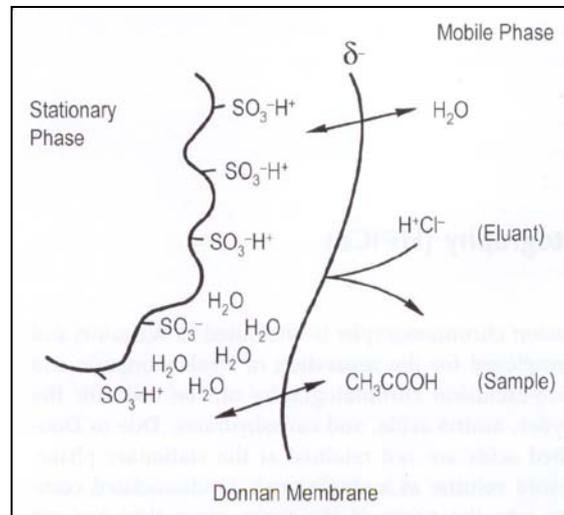


Fig.16 : Principe de l'exclusion ionique [Weiss, 2004]

Dans ce modèle de rétention, une barrière chargée négativement et comparable à une membrane de Donnan caractérise l'interface entre la phase mobile et l'enveloppe hydratée. L'équilibre de Donnan décrit l'équilibre qu'il existe entre deux solutions ioniques séparées par une membrane. La membrane se forme de telle sorte qu'elle permet le passage de certains ions en solution. Elle ne permet pas le passage de tous les ions la rendant semi-perméable. Un potentiel électrique des deux côtés de la membrane se forme favorisant le passage de certains ions. Dans notre cas, et par analogie à la membrane de Donnan, cette interface est seulement perméable aux composés non dissociés et aux molécules d'eau. Les acides totalement dissociés tels que l'acide chlorhydrique (HCl) ou l'acide sulfurique (H₂SO₄) jouent le rôle d'éluant et ne peuvent pas pénétrer au travers de cette barrière à cause de la répulsion électrostatique. Ils sont exclus de la phase stationnaire. Leur volume de rétention est appelé volume d'exclusion, proche du volume mort du système. Les molécules d'eau neutre peuvent diffuser dans les pores de la résine et revenir dans la phase mobile. Selon le pH de l'éluant, un acide organique faible (acide acétique par exemple) présent sous forme partiellement dissociée ne sera pas repoussé par la membrane de Donnan [Weiss, 2004]. La rétention et donc le temps de résidence dans les pores de la phase stationnaire dépendent du pourcentage de dissociation de l'acide et éluant suivant le pKa lorsque seules les interactions d'exclusion ionique sont présentes. Nous verrons dans la partie résultats que l'ordre d'éluant peut être modifié selon la structure de la molécule.

Pour la séparation des acides organiques, une grande capacité d'échange d'ions est nécessaire. Des colonnes de longueurs importantes (longueur (L) = 300mm, diamètre interne (ID) = 7.8mm) sont ainsi utilisées permettant de maximiser la dissociation et la concentration des groupements sulfonés sur le support. Le rôle d'un acide fort tel que l'acide sulfurique ou l'acide chlorhydrique comme phase mobile est de permettre aux acides organiques de se trouver sous leur forme moléculaire mais également de donner des pics plus symétriques qu'avec un éluant composé seulement d'eau. En effet, lorsque de l'eau ou une solution d'acide fort très diluée est utilisée comme éluant, des traînées de pics sont observées. Ces traînées sont dues à la variation du degré d'ionisation des solutés tout au long du pic chromatographique. Afin d'obtenir un degré de dissociation constant tout au long du pic, une solution concentrée d'acide fort est utilisée comme éluant [Glod, 1997].

C. Résultats et discussion

C.1 Optimisation de la séparation

Le but est de connaître les temps de rétention de chaque acide, leur réponse en UV et vérifier la qualité de séparation. Le pH de la phase mobile a été modifié en préparant des solutions à des concentrations différentes en acide sulfurique. Le débit de travail était de 0,5 mL/min et 20µL d'échantillon ont été injectés. La séparation des acides a tout d'abord été testée à une concentration de 100 mg/L avec une phase mobile peu concentrée en acide sulfurique.

C1.1 Séparation avec une phase mobile à 0,005 N d'H₂SO₄

Les réponses à 210 nm pour les acides étudiés ont des intensités comparables sauf pour l'acide oxalique. En effet, sa réponse à 210 nm est beaucoup plus élevée que celle correspondant à tous les autres acides (4 à 5 fois) pour une même concentration. Pour les acides, les groupements chromophores sont les liaisons C=O de la liaison carboxyle. Dans la structure de l'acide oxalique, il y a deux liaisons C=O conjuguées. Des liaisons conjuguées en UV augmentent le coefficient d'extinction molaire de la molécule et donc l'absorbance. Nous diluons la solution d'acide oxalique 4 fois dans la suite de l'étude afin de pouvoir calculer correctement les limites de détection et quantification, soit une concentration de 25 mg/L. Nous préparons une solution d'acide sulfurique à 0.005 N à partir d'une solution d'acide sulfurique concentré à 96%. Le pH de cette solution est de 2,7.

Ordre d'éluéon

Deux chromatogrammes des acides étudiés sont donnés sur les Fig.17 et Fig.18.

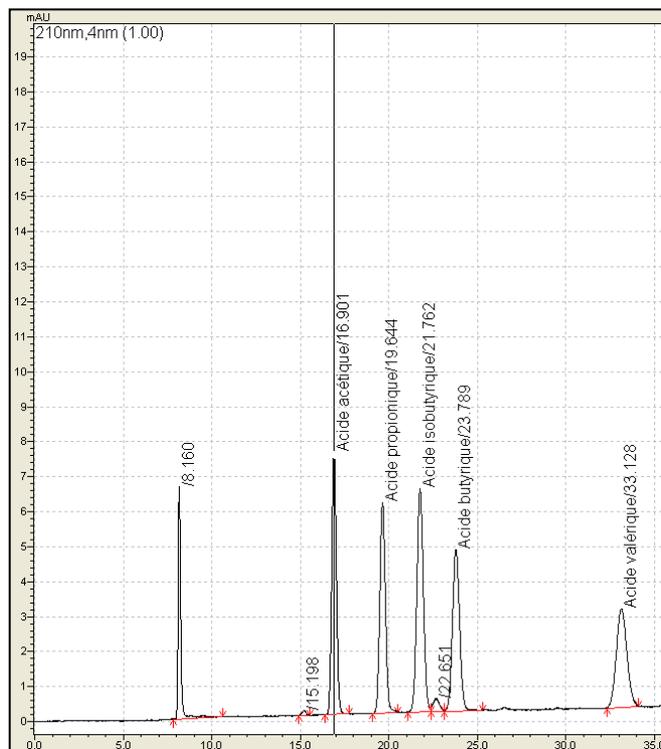


Fig.17 : IEC, pH = 2,7, Chromatogramme des acides gras volatiles

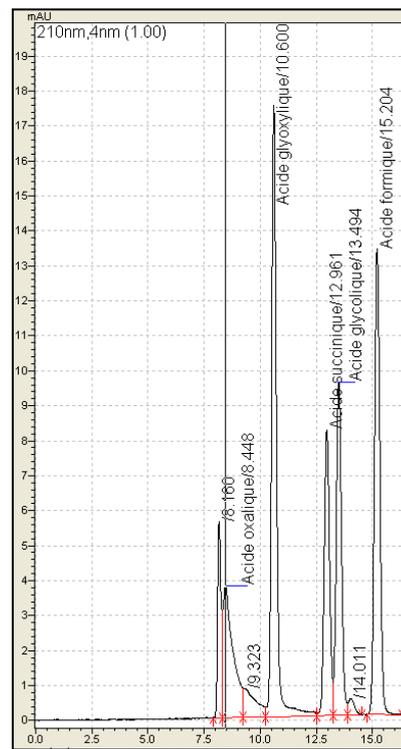


Fig.18 : IEC, pH = 2,7, Chromatogramme des autres acides

Le volume mort de la colonne, V_m , est considéré égal au volume d'éluéon des acides forts tels que l'acide sulfurique ou nitrique et représente la limite d'exclusion. Les petites molécules ne portant aucune charge éluéon à un volume de rétention égal à $V_m + V_i$. Le volume interne, V_i , est mesuré avec l'injection d'une molécule de petite taille neutre telle que le méthanol. Il représente la limite de perméation totale. On a $V_m = 4,1$ mL et $V_i = 7$ mL.

Les petits acides faibles ont une rétention comprise entre V_m et $V_m + V_i$. Les temps de rétention (t_R) et les facteurs de rétention (k) sont regroupés dans le Tableau IV.

Tableau IV : IEC, pH = 2,7, Données chromatographiques

Ordre d'éluéon	Acides organiques	Formule	M (g/mol)	pKa1	pKa2	t_R , min	k
1	acide oxalique	COOH-COOH	90	1,23	4,19	8,4	0,04
2	acide glyoxylique	O=CH-COOH	74	3,3	-	10,6	0,3
3	acide succinique	COOH-CH ₂ -CH ₂ -COOH	76	4,16	5,61	13	0,6
4	acide glycolique	HO-CH ₂ -COOH	118	3,83	-	13,5	0,7
5	acide formique	HCOOH	46	3,77	-	15,2	0,9
6	acide acétique	CH ₃ -COOH	60	4,76	-	16,9	1,1
7	acide propionique	CH ₃ -CH ₂ -COOH	74	4,87	-	19,6	1,4
8	acide isobutyrique	(CH ₃) ₂ -CH-COOH	88	4,84	-	21,8	1,7
9	acide butyrique	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -COOH	88	4,83	-	23,8	1,9
10	acide valérique	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -COOH	102	4,84	-	33,1	3,1

Dans un premier temps, nous allons nous intéresser à l'ordre d'éluion des acides en nous aidant de la courbe du premier pKa en fonction du facteur de rétention (Fig.19). Au pH de la phase mobile, seuls les acides gras volatils sont essentiellement sous leur forme moléculaire. Les autres sont partiellement ionisés.

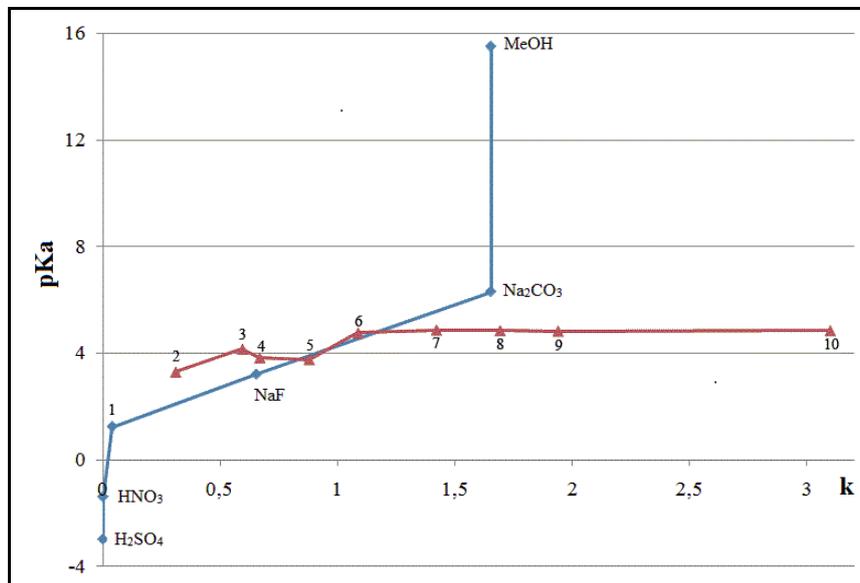


Fig.19 : IEC, Courbe pKa = f(k)

D'après Tanaka *et al.* (1979), une ligne droite peut être tracée entre l'acide oxalique, le fluorure de sodium et le carbonate de sodium permettant de prévoir le facteur de rétention en fonction du pKa si les espèces sont seulement soumises à une exclusion ionique. Plus ils s'en éloignent, plus ils sont soumis à d'autres interactions. Les acides formique (5) et acétique (6) sortent proches de cette ligne et donc en regard de leur pKa.

Les acides propionique, isobutyrique, butyrique et valérique (de 7 à 10) n'éluent pas en même temps alors que leurs pKa sont très proches. La longueur de la chaîne alkyle a donc un effet sur la rétention. Plus elle est importante, plus la rétention sera grande. La phase de greffage n'a pas un rendement de 100% et la résine possède un taux de greffage avec des groupements sulfoniques de 80% [Glod, 1997]. Les solutés possédant une longue chaîne aliphatique ont donc probablement des interactions hydrophobes avec les noyaux aromatiques non greffés de la résine et sont plus retenus. L'acide isobutyrique (8) élue plus rapidement que l'acide butyrique (9) en raison de sa chaîne aliphatique ramifiée. B. K. Glod (1997) explique que la rétention est proportionnellement liée à la surface moléculaire.

Les acides formique (5) et glycolique (4) qui possèdent un pKa identique devraient éluer au même moment. Or, l'acide glycolique élue avant l'acide formique. Selon le log(P), constante définissant la polarité d'une molécule, l'acide glycolique est plus polaire que l'acide formique.

La polarité de la molécule a également un effet sur la rétention, c'est pourquoi l'ordre est modifié [Fisher, 1995].

L'acide glyoxylique (2) a le pKa le moins élevé après celui de l'acide oxalique, il élué donc juste après celui-ci. Sa polarité est sans doute l'explication de son éloignement de la ligne que propose Tanaka *et al.* (1979).

L'ordre d'élution des diacides n'est également pas seulement fonction du pKa. Avec le seul effet de l'exclusion ionique, l'acide succinique (3) devrait éluer entre l'acide formique (5) et l'acide acétique (6). Or, son facteur de rétention est plus petit. Suivant le degré de dissociation du deuxième groupement carboxylique, le soluté sera plus ou moins retenu. La masse molaire de ces diacides est également plus importante que leur homologue avec un même nombre de carbone (succinique / butyrique, oxalique / acétique). La séparation est également affectée dans ce cas-là par une exclusion stérique, les diacides ont plus de mal à entrer dans les pores de la résine et à être retenus.

L'acide oxalique (1) est peu retenu par la colonne à cause de ses 2 pKa. Le pH de la phase mobile (pH = 2,7) affecte son degré d'ionisation et donc sa rétention. Son facteur de rétention est donc très proche de 0. Il sera donc très sensible à la variation de pH de la phase mobile. C'est également un diacide et une molécule polaire donc l'acide oxalique est affecté par une exclusion ionique, une exclusion stérique et des interactions hydrophobes.

Qualité de la séparation : la résolution

Les facteurs de rétention sont compris entre 0,04 pour l'acide oxalique et 3,1 pour l'acide valérique. Nous avons vu que l'acide oxalique n'était pas résolu de part son facteur de rétention proche de 0. Sa quantification est impossible avec cette phase mobile.

Pour calculer la résolution, nous avons besoin des temps de rétention et de la largeur à la base des pics chromatographiques. Ces données sont regroupées dans le Tableau V.

Tableau V : IEC, pH = 2,7, Résolutions entre les pics

Acide organique	t _R , min	Largeur à la base, min	Résolution
acide oxalique	8,4	-	-
acide glyoxylique	10,6	0,37	5,8
acide succinique	13	0,43	1,4
acide glycolique	13,5	0,42	4,0
acide formique	15,2	0,44	3,7
acide acétique	16,9	0,49	5,0
acide propionique	19,6	0,58	3,5
acide isobutyrique	21,8	0,69	2,8
acide butyrique	23,8	0,74	10,1
acide valérique	33,1	1,12	

La résolution minimale est celle entre l'acide succinique et l'acide glycolique. Elle est de 1,4. Elle est très proche d'une résolution complète des deux pics ($R_s = 1,5$).

La séparation est donc bonne pour tous les acides sauf pour l'acide oxalique. D'après la bibliographie, il va être difficile d'augmenter significativement la rétention de l'acide oxalique à cause de son premier pKa peu élevé et par conséquent de le quantifier dans ces conditions.

C.1.2 Effet du pH sur la rétention

Nous allons préparer deux phases mobiles, une à 0,01 N soit un pH de 2,2, et une autre à la concentration maximum d' H_2SO_4 soit 0,05 N (pH de 1,6). La courbe du $\log(k)$ en fonction du pH est tracée (Fig.20).

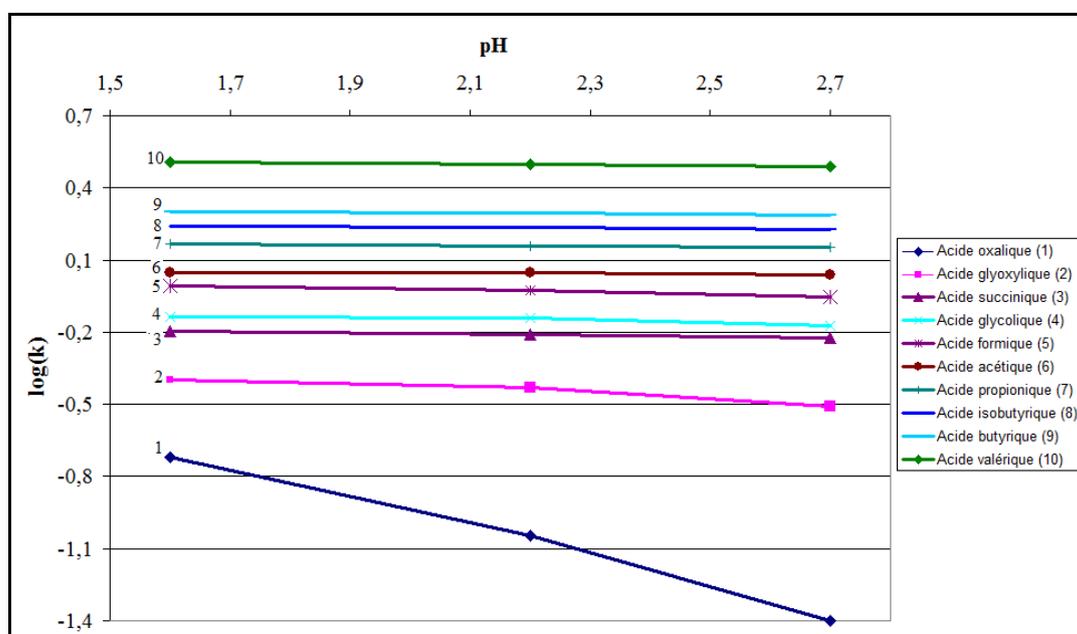


Fig.20 : IEC, Effet du pH sur la rétention

L'ordre d'élution ne varie pas avec le changement de phase mobile. A un pH de 1,6, les acides oxalique (1) et glyoxylique (2) ne sont pas encore entièrement sous leur forme moléculaire et sont bien évidemment les plus affectés par la variation de pH. L'acide oxalique (1) possède un facteur de rétention de 0,2 et une résolution supérieure à 1 par rapport à l'acide glyoxylique (2). Il est bien séparé du temps mort du système et son analyse peut ainsi être correctement effectuée.

Les autres acides sont peu affectés par la variation de pH de la phase mobile, leur pKa étant plus élevé.

La largeur des pics n'est pas affectée par le changement de concentration en H₂SO₄. La résolution et la sélectivité sont bonnes pour tous les composés. Nous allons donc travailler avec une phase mobile à 0.05 N en H₂SO₄ pour la validation de la méthode.

C.2 Validation de la méthode

Les principales caractéristiques de validation d'une méthode d'analyse sont données et définies dans l'annexe 6. Nous nous intéresserons à la répétabilité, à la linéarité, aux limites de détection et quantification.

Pour cela, deux solutions que l'on nommera standard 1 et standard 2, contenant chacune 5 acides, ont été préparées. La solution standard 1 est obtenue en mélangeant la même quantité de 5 solutions mères d'acides (acides acétique, propionique, butyrique, isobutyrique et valérique) à 500 mg/L. La solution standard 2 est obtenue de la même façon mais avec les autres acides (acides oxalique, glyoxylique, succinique, glycolique et formique). Chaque acide se retrouve donc dans ces solutions standard 1 et standard 2 à 100 mg/L. Une dilution de ces dernières permet d'obtenir les concentrations de 50 mg/L, 25 mg/L, 10 mg/L, 5 mg/L et 2 mg/L.

On réalisera un étalonnage externe, en répétant chaque mesure 5 fois comme décrit dans la norme AFNOR (1999). Les données statistiques souhaitées (pente, ordonnée à l'origine, coefficient de corrélation et l'écart-type du blanc) sont déterminées par régression linéaire. Ces valeurs ont été calculées à partir d'EXCEL (fonction Droitereg). Ces valeurs ont également été déterminées à partir des équations données dans la norme afin de voir si les données obtenues sous EXCEL étaient directement utilisables. Les deux modes de calcul se sont avérés identiques. Par la suite, nous prendrons donc les résultats donnés par EXCEL.

La répétabilité est réalisée au travers d'un écart-type de répétabilité dépendant du domaine d'application de la méthode étudiée. On utilise pour cela le test de Cochran par comparaison des variances à chaque niveau de calibration, comme indiqué en annexe 6. Si ce test donne un résultat acceptable, la répétabilité peut alors être déterminée en calculant le coefficient de variation CV. Les résultats sont présentés dans le Tableau VI.

La linéarité de la méthode est déterminée par le calcul du coefficient de régression linéaire r^2 , et par un test d'hypothèse sur le coefficient de régression de la pente b_1 . Ce test est décrit en annexe 6. Ce test permet de décider avec une faible marge d'erreur s'il y a une relation linéaire entre les variables dans le domaine choisi. Une statistique t_{calc} est pour cela calculée

(annexe 6) et comparée à la valeur de la table de Student avec un risque de 1%. Ces données sont regroupées dans le Tableau VI.

Tableau VI : IEC, Données statistiques pour la validation de la méthode

	Répétabilité		Linéarité		
	CV en %	Coefficient de corrélation, r^2	t_{calc}	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
acide oxalique	5,25	0,9955	79	0,09	0,3
acide glyoxylique	1,01	0,9992	187	0,8	2,5
acide succinique	1,31	0,9997	294	0,5	1,6
acide glycolique	0,76	0,9997	314	0,5	1,5
acide formique	0,59	0,9999	642	0,2	0,7
acide acétique	0,56	0,9998	359	0,4	1,3
acide propionique	1,13	0,9999	497	0,3	0,9
acide isobutyrique	1,07	0,9998	382	0,4	1,3
acide butyrique	0,85	0,9996	422	0,3	1,1
acide valérique	1,31	0,9995	241	0,6	1,9

Pour tous les acides, le test de Cochran indique que les variances sont homogènes sur le domaine étudié et donc que la répétabilité peut être déterminée. Les CV observés sont inférieurs à 2% sauf pour l'acide oxalique. Nous avons vu qu'il était élué proche du volume mort et que sa quantification restait difficile.

Les coefficients de corrélation sont bons, supérieur à 0,995 pour l'acide oxalique et à 0,999 pour les autres acides. L'acide oxalique peut tout de même être quantifié dans ce domaine, le coefficient étant acceptable ($> 0,99$).

Pour tous les acides, la statistique t_{calc} est supérieure à la valeur de la table au risque de 1% ($t_{\text{table}} = 2,76$). Il y a donc une relation linéaire entre les variables dans le domaine d'étalonnage choisi.

Les limites de détection et quantification sont données dans le Tableau VI. Elles sont calculées comme indiqué dans l'annexe 6, à partir du rapport entre la sensibilité et son écart-type. Les limites de quantification sont assez proches les unes des autres, elles sont comprises entre 0,7 et 2,5 ppm pour une injection de 20 μ L. Les réponses en UV des acides étant similaires, ce résultat est logique. L'acide oxalique qui possède une réponse en UV beaucoup plus élevée peut donc être quantifié en plus petite quantité soit à hauteur de 0,3 ppm.

D. Conclusion sur la chromatographie d'exclusion ionique

Pour conclure sur la chromatographie d'exclusion ionique, la séparation pour tous les acides est obtenue avec une bonne résolution entre les pics avec une phase mobile composée d'acide sulfurique à 0,05 N (pH = 1,6). Le principal mode de séparation est l'exclusion ionique mais nous avons vu qu'il n'était pas le seul et que dans de nombreux cas, d'autres interactions viennent s'ajouter comme des interactions hydrophobes avec la résine.

La rétention de l'acide oxalique et dans une moindre mesure, celle de l'acide glyoxylique ont été augmentées en abaissant le pH de la phase mobile. L'acide oxalique élue proche du volume mort et sa quantification reste difficile. Elle est cependant possible compte tenu des résultats obtenus par la validation de la méthode.

La rétention des autres acides est peu affectée par la modification du pH de la phase mobile.

Un deuxième type de chromatographie ionique permet la séparation des acides organiques, il s'agit de la chromatographie d'échange anionique. Cette technique est décrite dans la suite de l'exposé et les résultats sont discutés.

La chromatographie d'échange anionique (AEC)

Cette technique permet la séparation des ions et des composés polaires ionisés.

A. Appareillage

L'appareil utilisé est de marque Metrohm. Il est composé d'un passeur d'échantillon, 863 Compact Autosampler, d'un préparateur d'éluant, d'un dégazeur, d'une pompe, d'une précolonne, d'une colonne, d'un supprimeur chimique et d'un conductimètre.

Les modules utilisés sont similaires à ceux de la RP-LC, mise à part pour la détection conductimétrique. C'est un principe de détection non sélectif. Comme la chromatographie ionique met en application des phases mobiles sous forme d'électrolyte aqueux, le détecteur doit être en mesure de pouvoir réagir à un changement de conductivité total provoqué par une quantité d'ions analytes relativement faibles. Grâce à l'utilisation de techniques de suppression, il est possible de réduire la conductivité propre de certains éluants ce qui permet une augmentation de la sensibilité. Les principes de la détection par conductivité et de la suppression chimique sont donnés en annexe 9. D'une manière générale, la conductance d'un électrolyte est reliée à sa concentration et est mesurée en sortie de colonne.

Les concentrations des composés analysés sur cette chromatographie ionique ne doivent pas dépasser 10 mg/L.

B. Les phases stationnaire et mobile

La principale différence entre les colonnes d'exclusion ionique et les colonnes d'échange anionique est leur capacité en échange d'ions. Des échangeurs d'ions à faible capacité sont généralement utilisés en AEC (10 à 100 $\mu\text{equiv/g}$) à cause de la détection par conductivité. En effet, la détection des analytes demande à ce que la phase mobile ait une conductivité la plus faible possible. La capacité est déterminée par le nombre de groupements fonctionnels greffés par unité de poids de résine [Weiss, 2004]. Si les solutés sont des anions, on utilise une phase stationnaire obtenue par exemple à partir d'un polymère comportant des groupements ammonium. La phase stationnaire utilisée pour les analyses dans cette étude est une résine polymérique composée de particules sphériques de polyvinyl alcool sur lesquelles sont fixés des groupements ammonium quaternaires ($-\text{NR}_3^+$). Elles possèdent une bonne efficacité chromatographique due à de petites tailles de particules de 5 μm [Weiss, 2004]

L'éluant utilisé en AEC est généralement une solution aqueuse dans laquelle un sel ou un mélange de sel est ajouté. Lorsqu'un mélange de bicarbonate et de carbonate est utilisé, la phase mobile est tamponnée et possède une force d'éluion qui peut être facilement modifiée en faisant varier la concentration de ces deux anions. Au pH de la phase mobile utilisée (8 à 11), les acides carboxyliques sont sous leur forme ionisée ($\text{pH} > \text{pK}_a + 2$).

Avec la phase mobile utilisée, tous les sites cationiques de la phase stationnaire se trouvent appariés avec les anions de la phase mobile (HCO_3^- et CO_3^{2-}). Si un anion A^- est injecté dans le système, les anions sont échangés avec les ions bicarbonates de la phase mobile, par exemple, suivant l'équilibre réversible présenté dans la Fig.21.

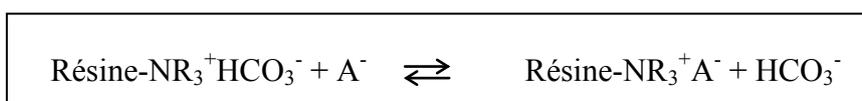


Fig.21 : AEC, Mécanisme d'échange

Un maximum de sensibilité sera obtenu tant qu'une grande différence de conductance entre les solutés et les ions de la phase mobile sera observée.

Pour les acides organiques présents dans des échantillons réels, des interférences peuvent être observées avec des ions inorganiques (fluorure et acide formique, acétique, glycolique ou lactique et proche du volume mort) [Weiss, 2004]. Les conditions d'analyse sont récapitulées dans le Tableau VII.

Tableau VII : AEC, Conditions analytiques

Phase mobile	3,2 mmol/L Na_2CO_3 / 1 mmol/L NaHCO_3
Volume d'injection	20 μL
Débit	0,7 mL/min
Précolonne	Metrosep A Supp 4/5 Guard
Colonne	Metrosep A SUPP 5, L = 150mm, ID = 4mm

C. Résultats et discussion

C.1 Ordre d'élution

Afin de connaître l'ordre d'élution, nous allons injecter des solutions d'acides organiques à 10 mg/L. Les données chromatographiques sont répertoriées dans le Tableau VIII. Le temps mort est de 2,8 min.

Tableau VIII : AEC, Données chromatographiques

	Formule	t _R (min)	k	Résolution
acide glycolique	HO-CH ₂ -COOH	5,45	0,95	0,6
acide acétique	CH ₃ -COOH	5,65	1,02	0,3
acide propionique	CH ₃ -CH ₂ -COOH	5,78	1,06	0,1
acide isobutyrique	(CH ₃) ₂ -CH-COOH	5,84	1,09	0,4
acide butyrique	CH ₃ -(CH ₂) ₂ -COOH	6,06	1,16	0,3
acide formique	H-COOH	6,17	1,20	-
acide valérique	CH ₃ -(CH ₂) ₃ -COOH	6,88	1,46	-
acide succinique	COOH-(CH ₂) ₂ -COOH	32,3	10,54	3,4
acide oxalique	COOH-COOH	36,6	12,07	-
acide glyoxylique	O=CH-COOH	n.d.*	n.d.*	-

* n.d. : non déterminé

La majorité des acides monocarboxyliques éluent en moins d'une minute et la résolution entre les pics est très mauvaise. Aucun retour à la ligne de base n'est possible dans ces conditions d'analyse et l'intégration des pics est donc impossible.

Selon M. C. Buzzoniti *et al.* (1997), les temps de rétention des acides dépendent de paramètres tels que les dimensions moléculaires, les constantes d'acidité et l'adsorption des molécules organiques sur la résine organique comme nous l'avons vu en chromatographie d'exclusion ionique. La rétention dépend également du pH de la phase mobile et de sa composition (concentrations en carbonate et hydrogénocarbonates).

Les acides gras volatiles éluent suivant la longueur de leur chaîne aliphatique en raison des interactions hydrophobes entre la chaîne alkyle et la résine de la phase stationnaire. Il n'a pas été possible de mesurer la largeur à la base du pic de l'acide valérique car celui-ci coélue avec un ion, probablement inorganique, présent dans l'échantillon. Comme en chromatographie d'exclusion ionique, l'acide isobutyrique élue avant l'acide butyrique.

L'acide glycolique a un temps de rétention plus faible que l'acide formique alors qu'ils ont des pKa identiques. De plus, la molécule d'acide formique est plus petite que l'acide glycolique. Il existe donc sûrement d'autres interactions entre l'éluant, les analytes et la phase stationnaire. M. C. Bruzzoniti *et al.* (1997) ajoute qu'un examen des chromatogrammes,

malheureusement, ne permet pas de corréliser le temps de rétention et les paramètres moléculaires.

Les diacides, qui portent deux charges, sont plus retenus par la phase stationnaire et leur rétention est supérieure à celle des acides monocarboxyliques. Nous avons analysé seulement deux diacides donc il est difficile d'expliquer l'ordre. Selon J. Weiss (2004), la rétention des acides dicarboxyliques augmente lorsque le pKa diminue. C'est bien ce que nous observons puisque l'acide oxalique ($pK_{a1} = 1,2$) élue après l'acide succinique ($pK_{a1} = 4,2$). Dans ce cas là, les interactions entre la phase stationnaire et le plus petit et plus polaire des analytes sont préférées.

Cet appareil étant utilisé par plusieurs personnes et en routine dans l'équipe, la séparation n'a pas pu être optimisée en essayant d'agir sur la composition de la phase mobile. De plus, la colonne est courte (150 mm) pour l'analyse de nombreux acides organiques. Elle est adaptée pour les analyses de nitrate et nitrite dans nos applications.

Une colonne de 250 mm avec des particules de même taille pourrait être plus adéquate pour la séparation des acides organiques. En effet, plus la colonne est longue, plus l'efficacité augmente et plus la résolution augmente. D'après la formule (14), la résolution varie en fonction de la racine carrée de l'efficacité N . L'efficacité théorique peut être déterminée à partir de la longueur de la colonne (L) et de la taille des particules (dp) par la formule (15).

$$N = \frac{L}{3 \times dp} \quad (15)$$

Le gain en passant d'une colonne de 150 mm à 250 mm en gardant la même taille de particules peut alors être calculé. La résolution est ainsi améliorée par un facteur de 1,3 mais reste toujours insuffisante pour la majorité des acides.

Une autre manière de les analyser est d'utiliser le principe de l'exclusion ionique avec une colonne comportant des greffons sulfoniques, un éluant acide et une détection par conductimétrie.

La méthode ne donne pas des résultats satisfaisants concernant la séparation. Il est néanmoins intéressant de réaliser une étude statistique sur un ou deux acides afin de connaître la répétabilité, la linéarité et les limites de détection et quantification. Nous allons donc procéder à cette étude avec l'acide formique et glycolique.

C.2. Validation de la méthode

Les analyses ont été effectuées pour 6 points de calibration compris entre 0,1 mg/L et 2 mg/L pour l'acide formique et l'acide glycolique. Les données statistiques sont répertoriées dans le Tableau IX.

Tableau IX : AEC, Données statistiques pour la validation de la méthode

	CV (%)	r^2	t_{calc}	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
Acide formique	1	0,9996	270	0,01	0,04
Acide glycolique	1	0,9991	140	0,03	0,08

Les variances de répétabilité sur le domaine étudié sont homogènes et la répétabilité peut donc être déterminée par le coefficient de variation. Il est inférieur à 2 % pour les deux acides, les données sont donc répétables.

Les coefficients de régression linéaire r^2 sont supérieurs à 0,999 et sont donc bons. Les statistiques t_{calc} sont supérieures aux valeurs de la table avec un risque de 1%. La méthode est donc linéaire sur le domaine étudié.

Enfin, les valeurs obtenues pour les LOD et les LOQ sont à affiner car elles se situent toutes en dessous de la plus basse concentration analysée à savoir 0,1 mg/L. Une solution étalon proche de ces limites doit être injectée pour cela. D'une manière générale, on peut dire que ces limites sont inférieures à 0,1 mg/L et sont bien inférieures à celles obtenues en chromatographie d'exclusion ionique.

D. Conclusion sur la chromatographie d'échange anionique

Sur la colonne chromatographique utilisée, la séparation n'a pas été réalisable pour de nombreux acides, les résolutions obtenues étant très mauvaises. L'appareil étant utilisé en routine, aucune optimisation de la méthode (modification de la composition de la phase mobile par exemple) n'a été réalisée. Compte tenu des faibles limites de détection et quantification obtenues par conductimétrie, cette technique semble adapter aux études en photocatalyse. Cependant, il reste à optimiser la séparation avec un autre type de phase stationnaire ou une autre phase mobile par exemple.

Après avoir étudié la séparation des acides en chromatographie ionique, nous allons nous intéresser maintenant à la séparation par chromatographie liquide de phase inversée (RP-LC).

Partie IV :
La chromatographie de phase inversée (RP-LC)

A. Appareillage

Les analyses sont effectuées sur le même appareillage que pour l'IEC. Le volume d'injection doit correspondre au maximum à $1/100^{\text{ème}}$ du volume mort de la colonne pour limiter la dispersion externe liée à l'injection. Les caractéristiques des deux colonnes utilisées dans cette étude sont présentées dans le Tableau X.

Tableau X : Caractéristiques des colonnes RP-LC

Type	C18	C18
Fournisseur	Macherey-Nagel	Interchim
Nom	Pyramid	HDO
Dimensions : L * ID en mm	250 * 4,6 mm	150 * 3 mm
Diamètre de particules	5 μm	3 μm
pH d'utilisation	1 à 9	1,5 à 7
Spécification	End-capping polaire	Pas de end-capping polaire
Débit optimal en mL/min	0,7	0,5
Nombre de plateaux théorique	16 700	16 700

Ces deux colonnes peuvent être utilisées avec des phases mobiles 100% aqueuses. Les calculs pour déterminer les débits de travail et le nombre de plateaux sont donnés en annexe 10.

B. Les colonnes

Les colonnes se présentent comme un tube, souvent en acier, rempli de phase stationnaire. Leur géométrie est très variable, les plus utilisées ont une longueur allant de 50 à 250 mm et des diamètres internes de 2 à 4,6 mm. Pour effectuer une séparation, la RP-LC s'appuie sur les propriétés physiques de la phase stationnaire qui déterminent les capacités de séparation de la colonne et ses propriétés chimiques, qui déterminent les interactions avec l'analyte. La phase stationnaire est apolaire alors que la phase mobile est polaire.

B.1 Propriétés physiques

La phase stationnaire est constituée de microparticules sphériques ou de solide poreux. Ces microparticules ont des tailles de 2 à 5 μm pour la chromatographie analytique. La plupart des particules utilisées sont entièrement poreuses. Leur surface spécifique au contact de la phase mobile atteint quelques centaines de m^2 par gramme, favorisant ainsi les mécanismes de partition avec les différents solutés. De plus, une silice de grande pureté permet d'obtenir une résolution et une symétrie de pic optimale.

B.2 Propriétés chimiques

B.2.1 Obtention d'une phase greffée

Les phases typiques sont composées d'un gel de silice sur lequel une chaîne alkyle est greffée. Dans cette étude, nous utiliserons des colonnes dites C₁₈, comportant des greffons à 18 carbones. La surface d'une silice est composée de silanols, Si-OH, et de ponts siloxanes, Si-O-Si. Les phases stationnaires greffées sont obtenues par réaction d'un chlorosilane, R(CH₃)₂-Si-Cl, en milieu basique sur les silanols de surface, R pouvant être aliphatique, aromatique par exemple [Scott, 1992].

Les phases greffées par des monochlorosilanes ont une structure en forme de brosse (Fig.22).

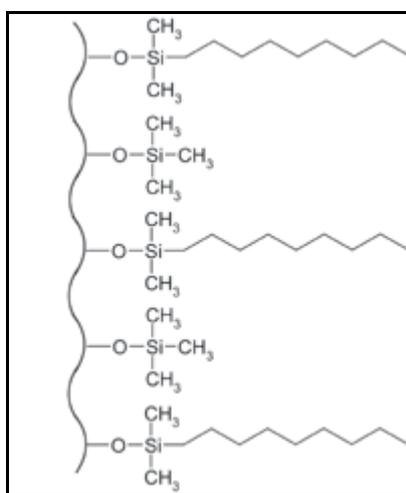


Fig.22 : RP-LC, structure en brosse d'une phase greffée [Interchim, 2005]

Une partie des silanols demeure cependant intact pouvant provoquer des interactions polaires gênantes et une traînée de pics pour les composés polaires ou basiques. Ils sont appelés silanols résiduels ou accessibles.

B.2.2 Phase greffée pour des composés très polaires

Les composés très polaires comme les acides glyoxylique ou glycolique nécessitent pour leur rétention des phases mobiles fortement aqueuses. Les colonnes de phase inverse conventionnelles n'acceptent pas de phase mobile contenant plus de 95% d'eau. En effet, une détérioration des performances de la colonne apparaît après un certain temps d'utilisation.

La chaîne alkyle apolaire s'effondre et perd sa structure en forme de brosse qui maintenait les interactions hydrophobes entre la phase stationnaire et les analytes. On parle alors de *collapse* (Fig.23) [Macherey2, 2007].

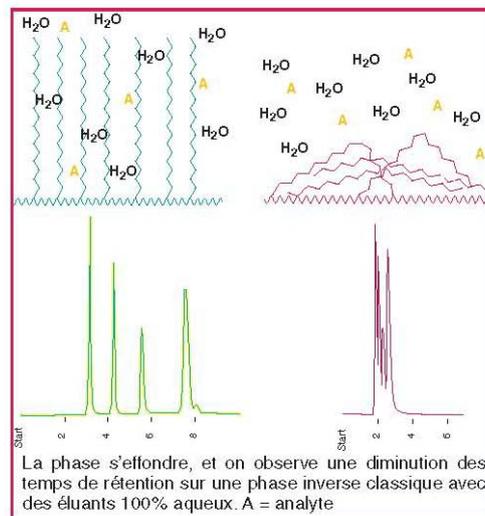


Fig.23 : RP-LC, *collapse* des chaînes alkyles [Macherey2, 2007]

Les temps de rétention sont diminués et la résolution devient très mauvaise. La mouillabilité de la silice greffée à des phases mobiles 100% aqueuses est améliorée de différentes manières. La présence d'un « *end-capping* » polaire permet aux greffons C_{18} de ne pas s'effondrer en se regroupant sur eux-mêmes. Le groupe fonctionnel polaire utilisé pour le « *end-capping* » de la phase stationnaire fournit un mécanisme d'interaction supplémentaire par lequel les composés polaires peuvent être retenus et résolus. La nature de ces groupements est en général propriétaire et peut être des fonctions diols, CN, NH_2 par exemple (les silanols libres $Si-OH$ réagissent avec R_3Si-Cl , R_3 comportant des fonctions polaires). Sur la Fig.24, le groupement polaire est un alcool.

Une deuxième possibilité est l'insertion de groupements polaires intercalés permettant également d'éviter cet effondrement de phase en condition 100% aqueuse (Fig.25). Le composé polaire dans la chaîne alkyle ajoute des interactions polaires avec l'analyte (liaisons hydrogènes et forces dipôles-dipôles).

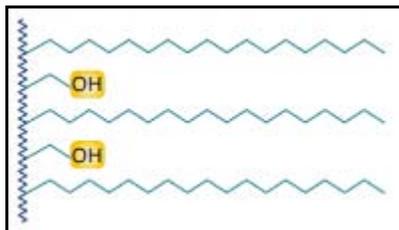


Fig.24 : *End-capping* polaire avec un alcool [Macherey, 2009]

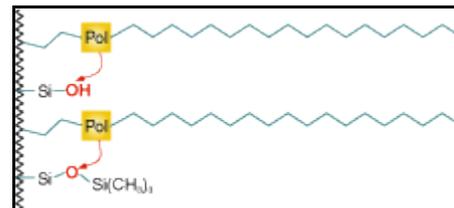


Fig.25 : Insertion d'un groupe polaire [Macherey, 2009]

Pour les deux colonnes que nous allons utiliser, la colonne C₁₈ Pyramid possède un « end-capping » formé à partir d'un alcool comme sur la Fig.24. La structure de la colonne C₁₈ HDO n'a pas été fournie par le fabricant Interchim.

C. La phase mobile

La composition de la phase mobile est très importante pour l'optimisation d'une analyse. Elle permet de développer des interactions entre la phase stationnaire et le soluté. La polarité de la phase mobile (mélange de solvant organique polaire et d'eau ou entièrement aqueux), le pH de celle-ci, l'ajout d'un tampon ou d'un contre-ion permettent de modifier ces interactions. En RP-LC, les molécules neutres, qui sont hydrophobes, interagissent avec la phase stationnaire alors que les solutés sous forme ionisés, qui sont hydrophiles, ont une très faible rétention. Pour l'analyse des acides carboxyliques à chaînes courtes et très polaires (acides oxalique, glycolique, glyoxylique, acétique, formique) une phase mobile entièrement aqueuse, donc très polaire, est utilisée. L'ajout de méthanol ou d'acétonitrile diminue la polarité. Dans notre cas, l'éluant peut être composé d'un ou deux solvants de composition fixe (mode isocratique) ou de composition variable (mode par gradient). Le gradient peut servir pour l'analyse dans un même échantillon de composés plus ou moins polaires en modifiant la polarité de l'éluant.

D. Résultats et discussion

Dans un premier temps, l'analyse par recul d'ionisation va être étudiée.

D.1 Acidification ou recul d'ionisation

L'équilibre chimique secondaire mis en jeu dans la phase mobile est un équilibre d'ionisation (pour rappel : $AH + H_2O \rightleftharpoons A^- + H_3O^+$). Le principe de cette technique consiste à faire en sorte que l'espèce chromatographiée soit unique et sous sa forme moléculaire plus hydrophobe que sa forme ionique pour les acides. Ainsi leur rétention et leur sélectivité sont augmentées. Le pH de la phase mobile permettra de « reculer » l'ionisation. Pour supprimer l'ionisation d'un acide, il faut avoir un $pH = pK_a - 2$. Dans notre cas, l'acide phosphorique (H₃PO₄) sera utilisé pour effectuer ce recul d'ionisation et des phases mobiles à différents pH seront testées (de 1,7 à 3) pour voir l'effet sur la rétention. Les masses en acide

phosphorique concentré à 85% v/v pour obtenir différentes valeurs de pH ont été calculées. Le détail des calculs est donné en annexe 11 et les valeurs sont données en annexe 12.

D.1.1 Analyses sur la colonne Pyramid

D.1.1.1 Optimisation de la séparation

Une phase mobile 100% aqueuse à un pH de 2 sera tout d'abord testée, et l'ordre d'élution et les résolutions seront discutées. Le pH de la phase mobile sera modifié si les résultats ne sont pas concluants.

Phase mobile à un pH de 2 en H₃PO₄

Les temps et facteurs de rétention des différents acides sont donnés dans le Tableau XI. Le temps mort est égal à 3,7 min.

Tableau XI : RP-LC, Colonne Pyramid, pH = 2,
Données chromatographiques

	Acides organiques	pKa	Log(P)	t_R, min	k
2	acide glyoxylique	3,3	-0,93	4	0,08
4	acide glycolique	3,8	-1,11	4,5	0,22
5	acide formique	3,75	-0,54	4,7	0,27
1	acide oxalique	1,23	-0,7	4,8	0,29
6	acide acétique	4,75	-0,31	6,5	0,76
3	acide succinique	4,2	-0,59	9,4	1,5
7	acide propionique	4,87	0,33	13,5	2,7
8	acide butyrique	4,81	0,79	63,9	16,3
9	acide isobutyrique	4,77	0,88	66,5	17
10	acide valérique	4,82	1,39	>120	>31

Comme nous avons vu que l'ordre d'élution dépendait de la polarité de la molécule ($\log(P)$), nous allons nous aider de la courbe de la polarité en fonction du logarithme du facteur de rétention sur la Fig.26.

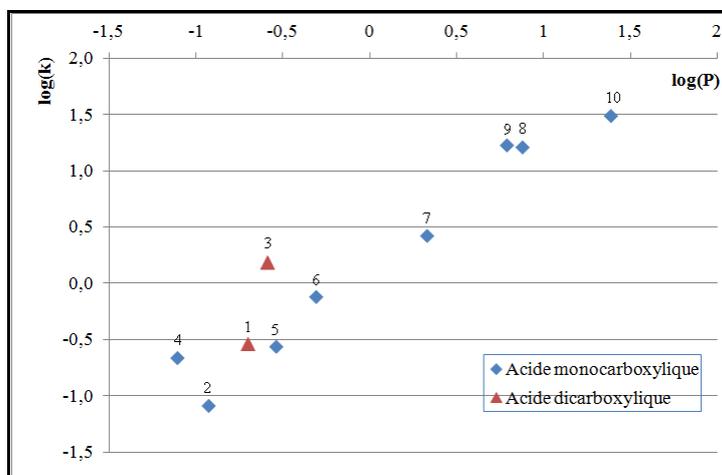


Fig.26 : RP-LC, Colonne Pyramid, pH = 2, $\log(k) = f(\log(P))$

On observe une relation linéaire entre le $\log(k)$ et le $\log(P)$ pour les acides monocarboxyliques, excepté pour les trois premiers acides. Les acides glycolique (4), formique (5) et plus particulièrement l'acide glyoxylique (2) ne sont pas entièrement sous leur forme moléculaire à un pH de 2 et sont donc un peu plus hydrophiles. Ils sont donc moins retenus par la phase stationnaire et n'éluent pas suivant la polarité. En abaissant le pH, l'ordre devrait être rétabli.

Les acides formique (5) et oxalique (1) coéluent à un tel pH. De plus, l'acide formique est le seul acide à présenter une traînée de pic provenant sans doute de sa structure chimique. Afin de l'intégrer correctement, il faudra attendre son retour à la ligne de base.

L'acide oxalique (1) est partiellement ionisé à un tel pH et son facteur de rétention n'est donc pas représentatif. Il peut varier en fonction de l'acidité de la phase mobile.

Les acides butyrique (8) et isobutyrique (9) possèdent un facteur de rétention supérieur à 15 et une résolution de 1,4. Ils éluent à un temps proche de 65 min, plus long qu'en exclusion ionique (22 min). Nous allons essayer un gradient par la suite pour diminuer la rétention. L'acide valérique (10) est fortement retenu.

L'acide succinique (3) est essentiellement sous sa forme moléculaire. Il élue entre l'acide acétique (6) et propionique (7). Sa polarité est bien inférieure à celle des acides aliphatiques en C_4 , son élution est donc plus rapide.

Effet du pH sur la rétention

La rétention pour les acides les plus polaires va tout d'abord être étudiée (acide glyoxylique, glycolique, formique, oxalique, acétique et succinique) et dans un deuxième temps, l'élution des autres acides sera analysée (acides propionique, butyrique, isobutyrique et valérique). Pour étudier l'effet du pH sur la rétention, nous allons nous aider de la Fig.27 représentant le logarithme du facteur de rétention en fonction du pH de la phase mobile.

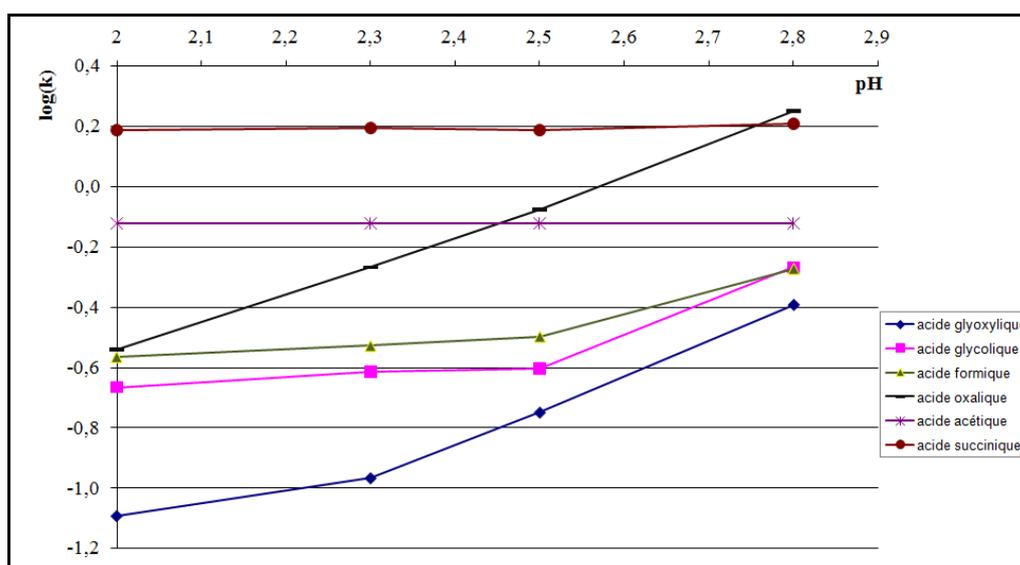


Fig.27 : RP-LC, Colonne Pyramid, $\log(k) = f(\text{pH})$

Dans la gamme de pH étudié, plus le pH augmente, plus la rétention augmente, excepté pour les acides acétique et succinique. Ce résultat nous montre que la séparation ne dépend pas seulement d'interactions hydrophobes entre l'analyte et la phase stationnaire mais qu'un autre type d'interaction intervient pour cette séparation. Sur cette phase stationnaire, le groupe fonctionnel utilisé pour le « end-capping » polaire est un hydroxyle provenant d'un alcool. Du fait de la polarisation, ces groupements -OH vont interagir avec d'autres molécules polarisées ou avec des ions. Selon le degré d'ionisation des acides carboxyliques aux pH étudiés, les groupements carboxyliques vont interagir avec le groupement -OH et modifier la rétention [Arnaud, 1993].

A un pH de 2,8, les pics des acides ne sont pas symétriques mais les composés sont bien retenus par la phase stationnaire. Les pics présentent une traînée en début de pic, et à des pH supérieurs, le pic n'est plus gaussien et s'étale sur plusieurs minutes, excepté pour les acides acétique et succinique qui ont des pKa plus élevés. Cela peut être expliqué par le fait que les interactions électrostatiques expliquées ci-dessus sont fortes et la concentration en A^- devient plus importante à ces pH. A des pH inférieurs, les pics sont symétriques. Le facteur de rétention varie plus pour la plupart des acides entre un pH de 2,5 et 2,8 qu'entre 2,0 et 2,5.

Les deux acides possédant les pKa les moins élevés (oxalique et glyoxylique) ont leur facteur de rétention qui varie le plus avec la variation de pH. Les interactions ion-dipôle expliquées ci-dessus modifient la rétention.

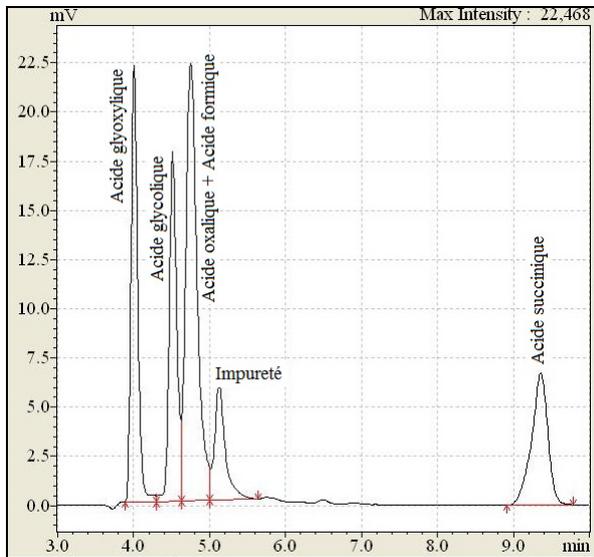


Fig.28 : RP-LC, Colonne Pyramid, pH = 2, Chromatogramme des acides les plus polaires

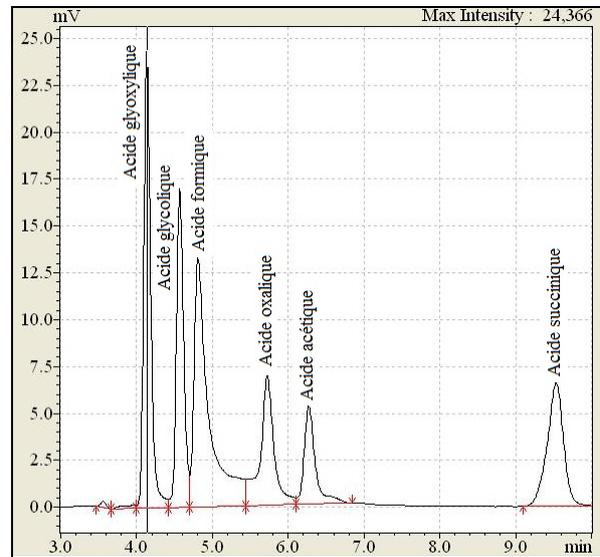


Fig.29 : RP-LC, Colonne Pyramid, pH = 2,3, Chromatogramme des acides les plus polaires

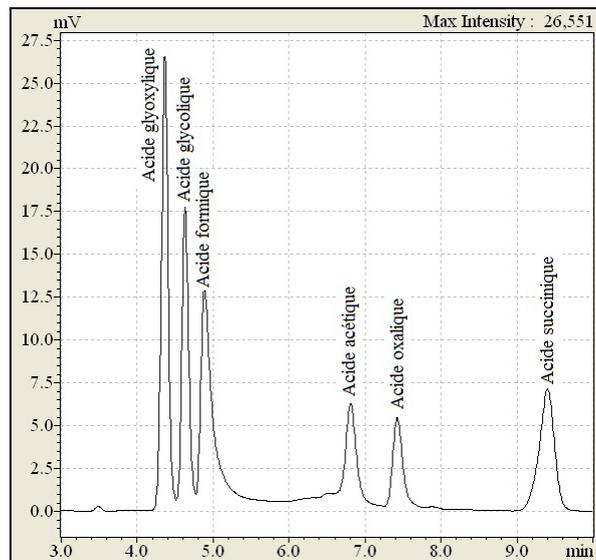


Fig.30 : RP-LC, Colonne Pyramid, pH = 2,5, Chromatogramme des acides les plus polaires Chromatogramme

Nous avons vu qu'à un pH de 2, les acides oxalique et formique coéluant. Le chromatogramme est présenté sur la Fig.28. A un pH de 2,3 (Fig.29), l'acide oxalique élué à plus d'une minute de l'acide formique mais comme le pic de ce dernier traîne, l'acide oxalique élué dans cette traînée. L'intégration des deux pics est alors difficile, voire impossible. A un pH de 2,5 (Fig.30), l'acide oxalique élué beaucoup plus tard et après l'acide acétique. L'ordre d'élué est modifié. Le pic asymétrique de l'acide formique a le temps de

retourner à la ligne de base avant l'intégration du pic suivant. Les pics chromatographiques sont bien résolus à un pH de 2,5.

L'acide glyoxylique se trouve un peu plus éloigné du temps mort de la colonne à un pH de 2,5 ($k=0,18$). Son intégration sera donc plus facile.

Les acides glycolique et formique, qui possèdent des pK_a équivalents, ont leurs rétentions modifiées de la même manière par la variation de pH.

Une phase mobile à un pH de 2,5 semble donc satisfaisante pour la séparation de ces acides. Cette phase mobile va maintenant être testée les acides propionique, butyrique, isobutyrique et valérique. Leur rétention est peu affectée par la modification de pH sans doute parce qu'ils sont principalement sous leur forme moléculaire. Ils ont donc les mêmes facteurs de rétention qu'à un pH de 2. Afin d'éluer les acides butyrique, isobutyrique et valérique plus tôt, nous allons augmenter le débit à 1 mL/min. D'après les courbes de Van Deemter (annexe 10), une faible perte de plateaux est observée avec une telle modification. De plus, ce débit est couramment utilisé pour des colonnes de telles géométries car c'est un bon compromis entre vitesse d'analyse et efficacité. A un tel débit, la séparation des acides très polaires est toujours bonne. Le chromatogramme et les résolutions pour ces acides sont donnés dans le Tableau XII et la Fig.31.

Tableau XII : RP-LC, Colonne Pyramid, pH = 2,5, D = 1 mL/min, Résolutions

Acides organiques	Résolution
acide glyoxylique	1,4
acide glycolique	1,3
acide formique	3,9
acide acétique	4,3
acide oxalique	4,3
acide succinique	6,6
Acide propionique	6,7
Acide butyrique	1,2
Acide isobutyrique	

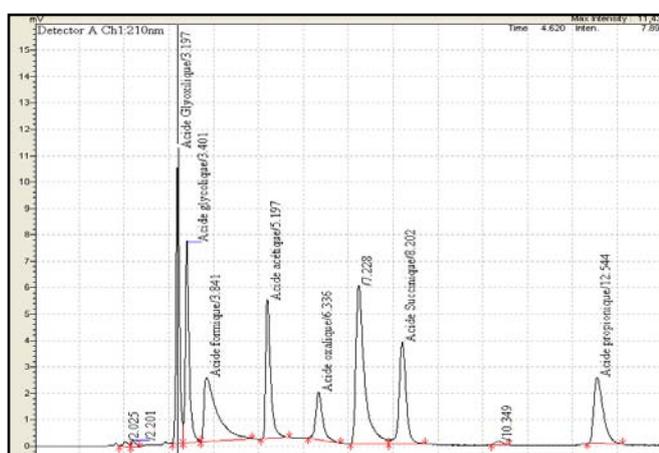


Fig.31 : Colonne Pyramid, pH = 2,5, D=1mL/min, Chromatogramme

Sur le chromatogramme, le pic à 7,23 min est une impureté. Les acides butyrique et isobutyrique ont des facteurs de rétention pour un débit de 1 mL/min de 10,2 et 10,6. Même avec un tel débit, l'acide valérique a un facteur de rétention supérieur à 20. La résolution entre l'acide propionique et butyrique étant élevée ($R_s = 6,7$), un gradient a été testé pour éluer l'acide butyrique, isobutyrique et valérique plus tôt. Dès lors que l'on ajoute un solvant organique (méthanol ou acétonitrile) dans la phase mobile même en faible quantité (5%), les

acides isobutyrique et butyrique ne sont plus résolus correctement. Avec 1% d'acétonitrile, la résolution entre l'acide butyrique et isobutyrique est de 1 et est donc acceptable. Le gradient utilisé est décrit dans le Tableau XIII.

Tableau XIII : RP-LC, Colonne Pyramid, pH = 2,5, Programme du gradient

	Solvant A	Solvant B
	H3PO4 / pH = 2,5	Acétonitrile
0	100%	0%
10	100%	0%
10,2	99%	1%
40	99%	1%
40,1	ARRET	

Les temps de rétention pour les acides butyrique et isobutyrique avec une phase mobile contenant 1 % d'acétonitrile sont de 22,1 min et 22,7 min. Après l'élution de ces deux acides, la concentration en acétonitrile peut être augmentée pour éluer l'acide valérique plus rapidement. Cependant, le temps d'analyse est un facteur important dans le développement d'une méthode chromatographique et en chromatographie d'exclusion ionique, le temps d'analyse est de 33 minutes pour l'acide valérique. Aucune amélioration nette sur le temps d'analyse ne pourra donc être apportée puisque les temps de rétention de l'acide valérique seront voisins par les deux méthodes. L'élution de l'acide valérique n'a donc pas été testée.

Efficacité de la colonne

Le logiciel LC Solution nous donne pour les composés analysés un nombre de plateaux réel de 11 000 à un débit de 0,7 mL/min et de 10 000 à un débit de 1 mL/min. Cette valeur est sensiblement la même que celle calculée à partir de la formule (10). Nous prendrons par la suite les valeurs données par le logiciel. La différence entre la valeur théorique et la valeur réelle peut provenir d'un vieillissement de la colonne ou de dispersions externes à la colonne. Ces dispersions provoquent un élargissement des pics et donc une diminution de N.

Conclusion sur la colonne Pyramid

Il est difficile d'étudier tous les acides choisis avec cette colonne dans un temps d'analyse plus courts qu'en chromatographie d'exclusion ionique du fait de leur polarité différente. Soit les composés ne sont pas résolus, soit le temps d'analyse est similaire à celui obtenu en chromatographie d'exclusion ionique. Une autre solution pourrait être de choisir

une colonne plus petite en géométrie et en taille de particules afin de garder un nombre de plateaux équivalents. Les temps seraient ainsi raccourcis mais les acides très polaires pourraient perdre en résolution. Cette colonne est donc adéquate pour l'analyse des acides très polaires (jusqu'à l'acide propionique) puisque la méthode est plus rapide qu'en IEC. En effet, en IEC, le temps de rétention de l'acide propionique est de 19,6 min et avec cette colonne, il est de 12,5 min. L'étape suivante est alors la validation de la méthode d'analyse pour ces acides.

D.1.1.2 Validation de la méthode pour les acides les plus polaires

Dans un premier temps, la répétabilité et la linéarité de la méthode sera testée et ensuite les limites de détection et de quantification seront calculées.

Répétabilité et linéarité

Comme pour la chromatographie d'exclusion ionique, nous calculons les CV, les coefficients de corrélation et la statistique t_{calc} . Ces valeurs sont répertoriées dans le Tableau XIV.

Tableau XIV : RP-LC, Colonne Pyramid, Répétabilité et linéarité

	Répétabilité	Linéarité	
	CV en %	r^2	t_{calc}
Acide glyoxylique	1	0,9998	490
Acide glycolique	1,8	0,9997	490
Acide formique	1,9	0,997	96
Acide acétique	1	0,9998	426
Acide oxalique	0,7	0,9998	394
Acide succinique	2	0,9992	197
Acide propionique	1,8	0,9996	218

La répétabilité peut être déterminée par le coefficient de variation CV car le test de Cochran indique que les variances sont homogènes sur le domaine étudié. Les CV calculés sont inférieurs ou égaux à 2%.

Les coefficients de corrélation sont bons, égal à 0,997 pour l'acide formique et supérieur à 0,999 pour les autres.

La statistique t_{calc} est supérieure à la valeur de la table au risque de 1% ($t_{\text{table}} = 2,76$). Il y a donc une relation linéaire entre les variables dans le domaine d'étalonnage choisi. L'acide formique est le seul acide à présenter une traînée de pic et son intégration reste difficile notamment la détermination de la fin du pic. La statistique t_{calc} est la plus faible de toutes mais reste supérieure à la valeur de la table. Le coefficient de corrélation est également acceptable, l'acide formique peut être analysé par cette méthode.

Limites de détection et quantification

Ces limites sont calculées comme dans l'annexe 6 et sont répertoriées dans le Tableau XV.

Tableau XV : RP-LC, Colonne Pyramid, Limites de détection et quantification

	RP-LC		IEC (rappel)	
	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
Acide glyoxylique	0,5	1,6	0,8	2,5
Acide glycolique	0,3	1	0,5	1,5
Acide formique	1,5	5	0,2	0,7
Acide acétique	0,3	1,1	0,4	1,3
Acide oxalique	0,07	0,2	0,09	0,3
Acide succinique	0,7	2,4	0,5	1,6
Acide propionique	0,5	1,6	0,3	0,9

Ces limites sont sensiblement les mêmes que pour la chromatographie d'exclusion ionique. Seul l'acide formique, toujours à cause de cette traînée de pic possède des limites plus élevées.

Une deuxième colonne de RP-LC va être testée afin de voir les différences et les améliorations qu'elle peut apporter. Cette colonne est une colonne HDO, Interchim.

D.1.2 Analyses sur la colonne HDO

Une deuxième colonne a été testée de la même manière et les résultats comparés. Cette colonne est plus petite mais possède le même nombre de plateaux théoriques que la Pyramid.

Phase mobile à un pH de 2 en H_3PO_4

Les grandeurs de rétention et une représentation graphique de l'élution sont données dans le Tableau XVI et la Fig.32. Le temps mort est 1,7 min.

Tableau XVI : RP-LC, Colonne HDO, pH = 2, Données chromatographiques

	Acides organiques	pKa	Log(P)	t_R , min	k
2	acide glyoxylique	3,3	-0,93	1,83	0,08
1	acide oxalique	1,2	-0,7	1,92	0,13
4	acide glycolique	3,8	-1,11	1,95	0,15
5	acide formique	3,75	-0,54	1,99	0,17
6	acide acétique	4,75	-0,31	2,4	0,38
3	acide succinique	4,2	-0,59	2,8	0,66
7	acide propionique	4,87	0,33	3,6	1,12
9	acide butyrique	4,81	0,79	7,24	3,26
8	acide isobutyrique	4,77	0,88	7,26	3,27
10	acide valérique	4,82	1,39	20,2	10,9

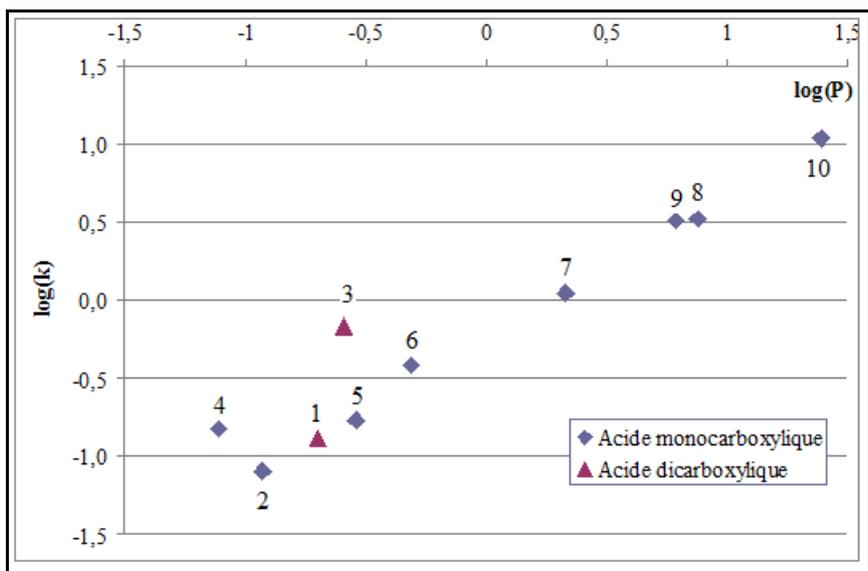


Fig.32 : RP-LC, Colonne HDO, pH = 2, $\log(k) = f(\log(P))$

Une relation linéaire entre le $\log(k)$ et le $\log(P)$ est observée, de la même manière que sur la C₁₈ Pyramid. L'ordre d'élution est sensiblement le même sauf que l'acide oxalique (1) élue entre les acides glyoxylique (2) et glycolique (4). Il est partiellement dissocié, les interactions avec la phase stationnaire doivent être légèrement moins fortes que sur la colonne Pyramid et par conséquent, il est moins retenu. Les composés très polaires sont moins bien retenus que sur la colonne Pyramid et leurs pics ne sont pas résolus (R_S de 0,2 à 0,5). La structure de la colonne HDO n'étant pas connue, il est difficile d'émettre des hypothèses sur l'ordre d'élution et la comparaison avec la colonne Pyramid.

Les acides acétique (6), succinique (3) et propionique (7) sont bien séparés avec cette colonne, alors que les acides butyrique (9) et isobutyrique (8) coéluent.

L'acide valérique élue avec un facteur de rétention de 10, un gradient n'est pas nécessaire pour son analyse.

La séparation reste très mauvaise pour la majorité des acides, l'impact de la modification du pH de la phase mobile va être étudié.

Effet du pH sur la rétention

Afin d'améliorer la séparation et voir l'évolution de la rétention des différentes acides, des phases mobiles à différents pH ont été préparées de la même manière que pour la colonne Pyramid et à partir d'acide phosphorique concentré à 85% v/v.

Trois différents pH de phase mobile ont été testés et les résultats sont présentés dans la Fig.33.

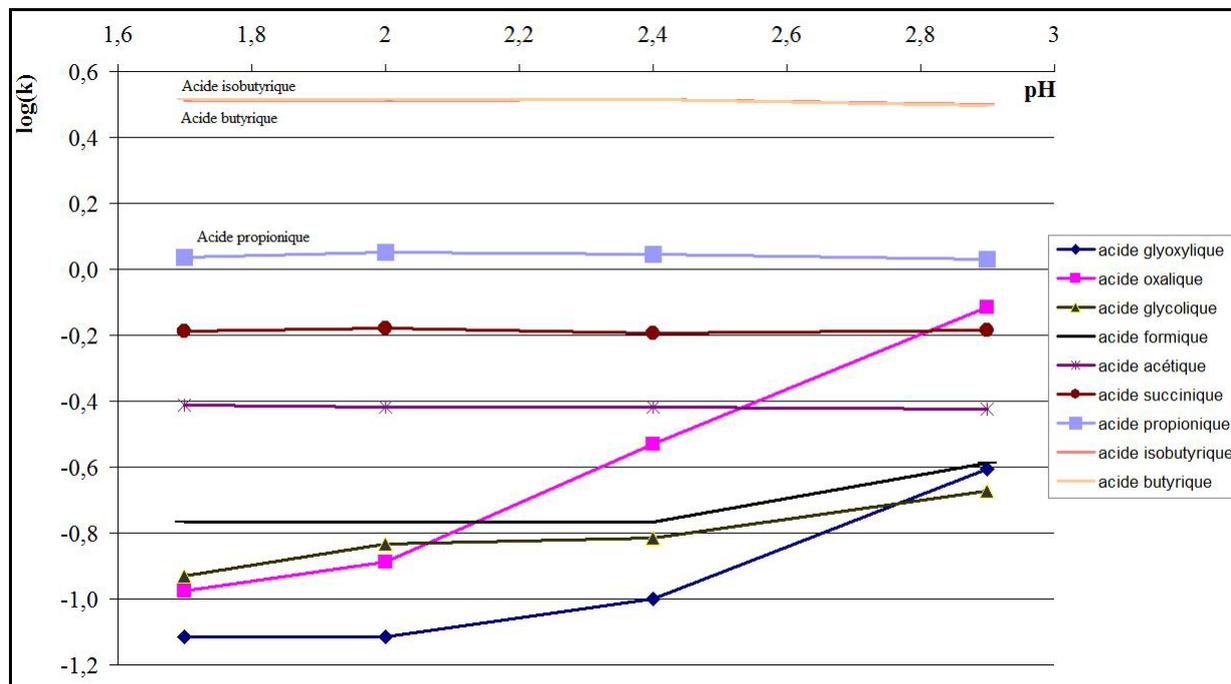


Fig.33 : Colonne HDO, $\log(k) = f(\text{pH})$

Sur la gamme de pH étudié (1,7 à 2,9), nous n'observons aucune amélioration quant à la résolution des 4 premiers composés.

Nous observons la même tendance que sur la colonne Pyramid à un pH de 2,9 pour les acides glyoxylique, oxalique, glycolique et formique à savoir une augmentation nette du facteur de rétention et une traînée en début de pic.

L'acide oxalique, et dans une moindre mesure, les acides glyoxylique et glycolique, sont les plus sensibles à la variation de pH, leurs pKa étant les plus petits. Cette variation est légèrement moins importante que sur la colonne Pyramid.

Tous les autres acides ont leur facteur de rétention stable entre 1,7 et 2,4.

La séparation n'est toujours pas satisfaisante. Des tests ont été réalisés sur une colonne HDO de même géométrie que la Pyramid pour augmenter les interactions entre la phase stationnaire et les solutés, la colonne étant plus grande ($L = 250\text{mm}$, $ID = 4,6\text{ mm}$). Ces tests se sont avérés non concluants pour la séparation des acides les plus polaires ainsi que pour la séparation de l'acide butyrique et isobutyrique. Cette colonne n'est donc pas adaptée à la majeure partie de nos applications.

Compte tenu de cette conclusion, aucune étude statistique n'a été réalisée sur cette colonne. Cette colonne va être utilisée par la suite pour la chromatographie d'appariement d'ions (paragraphe D.3).

D.2 Ajout d'un tampon phosphate

Un tampon permet de stabiliser le pH d'une solution. En effet, une variation de température peut provoquer une variation de pH si le milieu n'est pas tamponné. Or, une petite variation de pH peut provoquer de grandes variations de rétention. Lorsque le composé est ionisable, il est nécessaire de tamponner les solutions afin de fixer les proportions de chacune des formes en équilibre (forme neutre/forme ionisée). Le tampon fixe le pH de la solution mais également fixe la force ionique de celle-ci. L'effet et le pouvoir tampon sont décrits en détail en annexe 13. D'après la définition donnée en annexe 13, le terme milieu tamponné n'est pas tout à fait exact dans ce cas-là puisque le pH varie en fonction de la concentration initiale d'acide. Cependant, par abus de langage, on admet cette dénomination.

L'acide phosphorique seul étant un acide faible, il n'est pas considéré comme un tampon. Pour préparer une solution tampon à un pH proche de nos pH de travail (entre 1,8 et 2,5), un acide possédant un pKa proche de ces pH doit être choisi auquel un sel de la base conjuguée est ajouté. L'acide phosphorique est un acide faible possédant 3 pKa dont le premier à 2,2. Les couples acide/base pour l'acide phosphorique ainsi que leur pKa sont donnés dans la Fig.34.

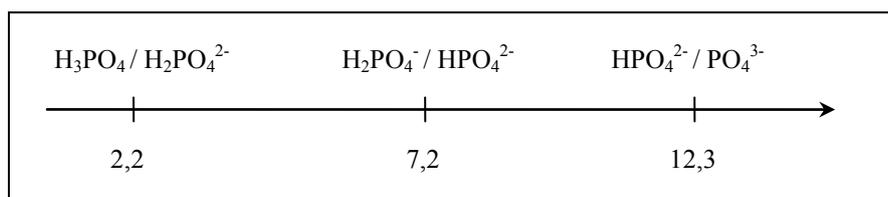


Fig.34 : Couples acide/base et leurs pKa pour l'acide phosphorique

Un sel correspondant à la base conjuguée a donc été choisi pour le pKa de 2,2, le sodium phosphate monobasique NaH₂PO₄. Le potassium phosphate monobasique aurait également pu être utilisé.

La séparation des acides avec différentes concentrations en tampon phosphate (25 mmol/L, 50 mmol/L et 100 mmol/L) et à des pH différents (1,9, 2,4 et 3) a été testée sur les deux colonnes. Pour de telles concentrations en tampon phosphate et pour obtenir différents pH

compris entre 1,8 et 2,5, la masse en acide phosphorique concentré à 85% v/v, à ajouter a été calculée. Le détail des calculs est donné en annexe 14 et les valeurs sont données en annexe 12.

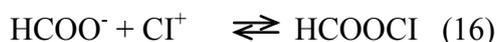
Sur la colonne Pyramid, les facteurs de rétention ne sont pas beaucoup modifiés mais assez pour diminuer la résolution entre certains pics et ainsi dégrader la séparation des composés très polaires.

Aucune amélioration n'a été apportée avec un tampon pour la séparation de ces acides sur la colonne HDO.

D.3 Appariement d'ions

La séparation avec la colonne HDO pour les acides glyoxylique, oxalique, glycolique et formique des acides reste impossible. Sur cette colonne, les acides butyrique et isobutyrique coéluent. La chromatographie par appariement d'ions va donc être testée sur cette colonne pour améliorer cette séparation.

En chromatographie d'appariement d'ions, des cations ou anions hydrophobes (contre-ions) sont ajoutés en petites quantités à la phase mobile. L'appariement d'ions consiste en une association d'ions entre le soluté sous sa forme ionisée et le contre-ion (CI) de charge opposée. Pour l'acide formique par exemple, nous aurons :



Les CI sont généralement de grosses molécules organiques constituées par une chaîne alkyle lipophile plus ou moins longue et un groupement ionisé basique fort hydrophile (molécule amphiphile). Ils doivent être introduits dans la phase mobile à une concentration inférieure à leur concentration micellaire critique (cmc). En effet, pour une longueur de chaîne supérieure ou égale à 8 CH₂, le CI possède des propriétés tensioactives et au-delà de la cmc, les molécules de CI s'associent en micelles. L'annexe 15 décrit en détail la mise en solution d'un tensioactif et ses caractéristiques.

Le CI va interagir fortement avec la chaîne alkyle de la phase stationnaire (Fig.35) et former une couche échangeuse d'ion sur la surface. Les CI vont être adsorbés sur la surface externe de la phase stationnaire.

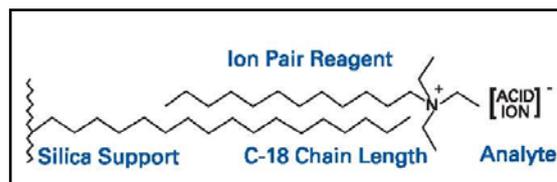


Fig.35 : RP-LC, Principe de l'appariement d'ions [Registech, 2008]

La rétention est dans ce cas influencée par le type et la concentration du CI, la force ionique, le pH de la phase mobile et la concentration et le type de solvants organiques utilisés dans la phase mobile.

Le dodécyltriéthylammonium phosphate a été choisi afin d'avoir une grande chaîne alkyle et un maximum de rétention avec les solutés ionisés. Sa concentration micellaire critique est de 16 mmol/L. La phase mobile est composée par un mélange de NaH_2PO_4 et de Na_2HPO_4 à 10 mmol/L. La colonne HDO doit être utilisée à un pH compris entre 1,5 et 7, c'est pourquoi le pH de travail est fixé à 6,5. Les concentrations en chacun de deux sels pour obtenir un pH de 6,5 ont été calculées. Le détail des calculs est donné en annexe 16 et les valeurs sont données en annexe 12. Le temps nécessaire pour équilibrer le système est long par rapport à la chromatographie de phase inverse classique, égal à environ 30 fois le volume mort de la colonne au lieu de 5 à 10 en RP-LC classique.

Résultats et discussions

Dans un premier temps, nous allons préparer un éluant à $\text{pH} = 6,5$ contenant 10 mmol/L d'un mélange de NaH_2PO_4 et de Na_2HPO_4 et 1 mmol/L de CI. Les temps et facteurs de rétention obtenus sont donnés dans le Tableau XVII. Afin de se rendre compte des interactions et de la différence d'élution entre les différents acides, les analyses ont été effectuées jusqu'à l'élution de l'acide, même si le facteur de rétention est très élevé pour certains.

Tableau XVII : Colonne HDO, Appariement d'ions,
Données chromatographiques

		pKa	log(P)	t_R , en min	k
2	Acide glyoxylique	3,3	-0,93	8,7	4,5
4	Acide glycolique	3,8	-1,11	8,8	4,5
6	Acide acétique	4,75	-0,31	11,03	5,9
5	Acide formique	3,75	-0,54	11,74	6,3
7	Acide propionique	4,87	0,33	24,3	14
8	Acide isobutyrique	4,77	0,88	55,6	34
9	Acide butyrique	4,81	0,79	56,7	34
3	Acide succinique	4,16	-0,59	127	78
1	Acide oxalique	1,2	-0,7	174	108
10	Acide valérique	4,82	1,39	194	120

Nous remarquons que l'acide glyoxylique est le premier à éluer et que son facteur de rétention est important pour un premier composé. Les interactions avec la phase stationnaire sont importantes. Pour les acides monocarboxyliques, les composés les plus polaires éluent en

premier (acides glyoxylique (2) et glycolique (4)). Ils ne sont pas résolus (résolution proche de 0) et forment un seul et même pic.

Les acides gras volatils (acides acétique, propionique, butyrique, isobutyrique et valérique) éluent en fonction de la longueur de la chaîne alkyle. Ces chaînes alkyles ont des interactions hydrophobes plus ou moins importantes avec les chaînes carbonées des CI et des greffons C₁₈. Les acides formique (5) et acétique (6) ainsi que les acides butyrique (9) et isobutyrique (8) voient leur ordre inversé par rapport à la RP-LC.

Les acides dicarboxyliques éluent différemment qu'en RP-LC, en raison de leur double charge. Leur rétention est moins importante que celle de l'acide valérique. L'acide oxalique (1) élue après l'acide succinique (5). Au pH de la phase mobile, la concentration en acide oxalique dissocié est plus importante que celle de l'acide succinique. Si l'acide oxalique est plus dissocié, il aura plus d'interaction avec les CI et la rétention sera plus grande.

Deux autres concentrations en CI ont été testées : 5 et 10 mmol/L. Une très légère amélioration a été apportée quant à la résolution entre les acides glyoxylique et glycolique ($R_s = 0,3$) pour une concentration de 10 mmol/L. Cependant, cette résolution n'est pas satisfaisante. Un changement de phase stationnaire ou de CI pourrait donner de meilleurs résultats pour cette séparation. Les composés possédant un facteur de rétention élevé peuvent éluer plus tôt en réalisant un gradient d'élution avec de l'acétonitrile par exemple. Les résultats obtenus n'étant pas concluants avec cette phase stationnaire et ce CI, l'étude n'a pas été approfondie.

E. Conclusion sur le chromatographie de phase inversée

Deux colonnes de RP-LC ont été testées : la colonne Pyramid, Macherey-Nagel, possédant un « end-capping » polaire avec un alcool et la colonne HDO, Interchim, adaptée pour l'analyse d'acides organiques mais sa structure n'est pas connue.

Concernant la colonne Pyramid, la séparation de tous les acides peut être réalisée par recul d'ionisation à un pH de la phase mobile de 2,5 et en réalisant un gradient pour l'élution des acides butyrique, isobutyrique et valérique. Par rapport à la chromatographie d'exclusion ionique, le temps d'analyse de tous ces acides du plus polaire (acide glyoxylique) au moins polaire (acide valérique) n'est pas amélioré. Cependant, il est amélioré pour la séparation des acides les plus polaires à savoir l'acide glyoxylique, glycolique, formique, acétique, oxalique, succinique et propionique. La plupart de ces acides sont formés lors des études en

photocatalyse, cette colonne semble donc adaptée pour ce type d'études. De plus, les limites de détection et quantification obtenues en IEC et avec cette colonne sont semblables. Le seul inconvénient est l'utilisation d'une phase mobile non tamponnée car elle est composée seulement d'acide phosphorique. Afin de voir comment le pH d'une solution tamponnée et non tamponnée évoluait au cours du temps, une solution non tamponnée d'acide phosphorique à un pH de 2,5 et une solution tamponnée d'acide phosphorique contenant 25 mmol/L de NaH_2PO_4 également à un pH de 2,5 ont été préparées. Le pH de ces solutions a été mesuré pendant deux semaines. Il est resté stable à la valeur de 2,5 dans les deux flacons. L'éluant en RP-LC est renouvelé régulièrement et plus d'une fois par semaine. Un éluant comportant seulement de l'acide phosphorique à un pH de 2,5 n'aura donc pas le temps d'être modifié et les temps de rétention resteront stables.

Concernant la colonne HDO, la séparation par recul d'ionisation n'est pas bonne pour les acides glyoxylique, glycolique, formique et oxalique et la résolution très mauvaise entre les pics des acides butyrique et isobutyrique. Aucune amélioration n'a été apportée à cette séparation en ajoutant un tampon phosphate à la phase mobile. La chromatographie par appariement d'ions a également été testée sur cette colonne afin de modifier le type d'interactions entre la phase stationnaire et le soluté et améliorer la séparation. Les acides glyoxylique et glycolique éluent en premier et n'ont pas pu être séparés correctement. Les facteurs de rétention des acides gras volatiles (excepté l'acide acétique) et celui des diacides sont élevés. Un gradient d'élution avec de l'acétonitrile par exemple pourrait les éluer plus tôt. Cependant, compte tenu de ces résultats, l'étude n'a pas été approfondie et la colonne HDO n'est finalement pas adaptée pour l'analyse de tous les acides étudiés.

La séparation de ces acides va maintenant être étudiée par chromatographie en phase gazeuse.

Partie V :
La chromatographie en phase gazeuse (GC)

A. Appareillage

La GC utilisée est une GC Shimadzu, modèle 2010. Elle est composée de :

- un passeur d'échantillon,
- un injecteur avec division de flux ou split,
- un four à l'intérieur duquel est placée la colonne,
- un détecteur à ionisation de flamme (FID).

L'injecteur permet la vaporisation de l'échantillon avant son introduction dans une colonne capillaire. Il est nécessaire d'injecter rapidement de très faibles quantités d'échantillon afin de réduire la dispersion externe des colonnes. Pour cela, nous allons travailler avec une injection avec division de flux ou en mode split dont le principe est expliqué en annexe 17. Ce type d'injection permet de diminuer la quantité injectée selon la valeur du rapport de division ou split ratio. Ce rapport peut varier entre 20 et 500 selon la nature et la concentration des mélanges à analyser.

L'étalon interne est l'acide 2-éthylbutyrique. Il est très utilisé dans la bibliographie pour l'analyse de acides gras volatils de part sa structure chimique et son point d'ébullition proches de ces acides.

La détection est réalisée par un détecteur à ionisation de flamme, son principe est expliqué en annexe 4. Les débits d'hydrogène et d'air sont de 40 mL/min et 400 mL/min respectivement.

B. La phase mobile ou gaz vecteur

La nature du gaz vecteur (hélium, diazote ou hydrogène) importe peu sur les valeurs de rétention. Les interactions entre celui-ci et le soluté sont très faibles. Cependant, la viscosité et la vitesse de ce gaz ont un effet important sur les qualités de séparation.

Nous avons vu que l'efficacité d'une colonne, sa HEPT, était égale à :

$$\text{HEPT} = L / N \text{ (avec } N \text{ le nombre de plateaux et } L, \text{ la longueur de la colonne).}$$

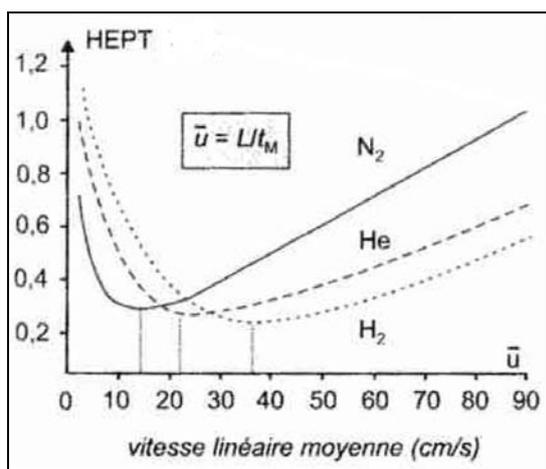


Fig.36 : Courbes de Van Deemter [Rouessac, 2009]

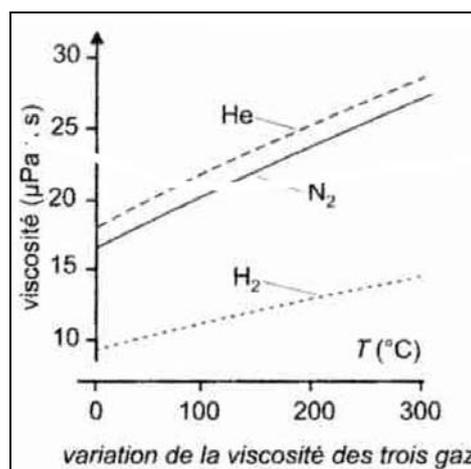


Fig.37 : Viscosité de 3 gaz en fonction de la température [Rouessac, 2009]

Les courbes de Van Deemter (Fig.36) représentent la hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT) en fonction de la vitesse linéaire moyenne du gaz vecteur en cm/s. Pour avoir un nombre de plateaux (N) important, il faut avoir une HEPT la plus petite possible et donc se placer au minimum de la courbe. Nous remarquons que la vitesse optimale pour le diazote est inférieure à celle de l'hélium ou de l'hydrogène pour une efficacité équivalente. Il en résulte des temps d'analyse plus longs. Pour effectuer les analyses rapidement sans perte de résolution des pics, il est souhaitable d'avoir une courbe de faible pente après l'optimum. Nous remarquons que la pente pour l'azote est plus importante que pour l'hélium ou l'hydrogène. La vitesse linéaire pour le diazote devra donc rester proche de cet optimum. Dans notre cas, une vitesse de 20 cm/s a été choisie. Cette valeur est un compromis afin d'allier des analyses un peu plus rapides qu'au minimum de la courbe et une perte de performances moindre.

La viscosité du gaz est également modifiée avec la température (Fig.37). Une augmentation de la température provoque une augmentation de la viscosité et de la perte de charge. Dans nos analyses, nous travaillerons en vitesse linéaire constante. La pression en tête de colonne est corrigée tout au long de l'analyse avec la variation de température afin de garder une efficacité optimale. Les analyses seront plus rapides et les colonnes un peu plus préservées.

C. Les colonnes

Les colonnes capillaires en GC offrent une très bonne efficacité, une rapidité d'analyse, une absence d'adsorption, une bonne sensibilité et une bonne reproductibilité. Ce sont des tubes vides, le plus souvent en silice fondue, à l'intérieur desquels un film homogène et stable

de phase stationnaire est déposé par imprégnation (évaporation de solvants) ou greffée par des liaisons covalentes suivie d'une polymérisation avec la paroi. Les diamètres internes sont généralement de 0,25 ou 0,32 mm et leur longueur est comprise entre 10 et 50 m. L'épaisseur du film la plus couramment rencontrée varie entre 0,2 et 0,5 μm . Ce film est le plus souvent une phase stationnaire liquide non-volatile, inerte chimiquement et stable thermiquement telle qu'une huile, un bas polymère ou un plastifiant. Différentes polarités de phases stationnaires ont été développées pour l'analyse d'une grande variété de composés. Les composés polaires seront analysés sur des phases polaires. Les colonnes de type Carbowax ou FFAP à base de polyéthylène glycol, polymère polaire, sont les plus appropriées pour obtenir une bonne sélectivité des composés polaires. La structure des phases stationnaires de ces colonnes est présentée dans les Fig.38 et Fig.39.

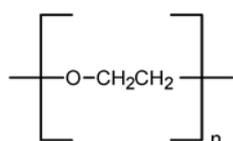


Fig.38 : Structure des colonnes Carbowax [BGB, 2007]

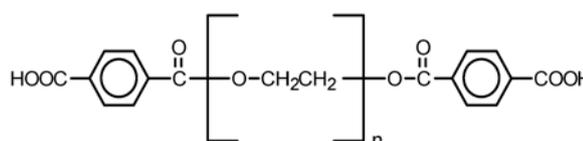


Fig.39 : Structure des colonnes FFAP [BGB, 2007]

Le type de colonne Carbowax est préparé par condensation d'oxyde d'éthylène en utilisant des hydroxydes alcalins comme catalyseurs. Le FFAP est le produit de réaction du PEG avec l'acide 2-nitrotéréphtalique [Rotzsche, 1991].

Il est à noter que des traces d'oxygène ou d'eau ont des effets néfastes sur la plupart des phases des colonnes GC, notamment une dégradation plus rapide de cette phase stationnaire. Une étape d'extraction (changement de solvant) peut préserver la colonne plus longtemps. L'injection d'eau en GC nécessite l'emploi de phase stationnaire spécifique possédant une résistance chimique à l'eau acceptable [Morin, 2007]. Certaines colonnes ont été développées et permettent l'analyse de différents composés dans l'eau mais leurs durées de vie en sont tout de même écourtées (FFAP, RTX-200, Carbowax). De plus, l'eau est l'un des solvants les plus difficiles à injecter en GC. Son point d'ébullition est élevé, et pour un même volume de solvant injecté, le volume d'eau vaporisé est plus important à cause de sa masse molaire. De plus, l'eau ayant une tension superficielle très élevée par rapport à d'autres solvants, sa condensation dans la porosité de la phase stationnaire est favorisée, rendant sa surface moins adsorbante pour les composés à analyser. Il en résulte un élargissement des pics lors de l'analyse [Grob, 1989].

La colonne utilisée est une colonne ZB-FFAP de marque Phenomenex. Sa longueur L est de 30 m, son diamètre interne, ID, est de 0,32 mm et l'épaisseur de film, df, est de 0,25 μm .

Les acides vont être analysés soit directement dans leur phase aqueuse, soit après une extraction sur phase solide afin d’avoir les acides dans un solvant organique.

D. Résultats et discussions

D.1 Réponse des acides en GC-FID

En GC-FID, les composés d’une même famille, ici les acides organiques, éluent suivant leur température d’ébullition en étant retenus par la phase stationnaire de la colonne. Les températures d’ébullition des acides étudiés sont données dans le Tableau XVIII.

Tableau XVIII : GC, Propriétés physiques des acides étudiés

	Formule	Température d'ébullition (°C)	Masse molaire (g/mol)	pKa
acide glycolique	HO-CH ₂ -COOH	100	76	3,83
acide formique	H-COOH	101	46,03	3,77
acide glyoxylique	O=CH-COOH	111	74	3,3
acide acétique	CH ₃ -COOH	118	60,05	4,76
acide propionique	CH ₃ -CH ₂ -COOH	141	74,08	4,87
acide butyrique	CH ₃ -(CH ₂) ₂ -COOH	164	88,11	4,83
acide isobutyrique	(CH ₃) ₂ -CH-COOH	152	88,11	4,84
acide valérique	CH ₃ -(CH ₂) ₃ -COOH	186	102,13	4,84
acide 2-éthylbutyrique	(C ₂ H ₅) ₂ -CH-COOH	193	116,2	4,8
acide oxalique	COOH-COOH	-	90,03	1,23 4,19
acide succinique	COOH-(CH ₂) ₂ -COOH	235	118,09	4,16 5,61

Les acides glycolique, formique et glyoxylique ne sont pas détectés dans les conditions d’analyse en partie à cause du solvant (l’eau) dans lequel ils se trouvent. Une dérivation ou un changement de solvant qui se vaporise plus bas en température (un alcool par exemple) devrait permettre leur analyse. De plus, un détecteur FID répond principalement suivant le nombre de carbone dans la molécule. L’acide formique possède un seul carbone ne sera de toute façon pas analysable par GC-FID, sa réponse étant trop faible.

Les acides gras volatils (acétique, propionique, butyrique, isobutyrique et valérique) ont des températures d’ébullition qui permettent leur analyse directe par GC-FID. L’étalon interne, l’acide 2-éthylbutyrique est également parfaitement analysable et ne devrait pas coéluer avec un autre acide puisque sa température d’ébullition est différente et bien distincte.

Les diacides (oxalique et succinique) possèdent des températures d’ébullition trop élevées pour une analyse directe. L’acide oxalique possède une température de fusion de 190°C,

température à laquelle il se décompose. Leur analyse par GC impose donc de passer par une étape de dérivation afin de les rendre volatils.

Compte tenu de ces informations, nous allons travailler sur l'analyse des acides gras volatils. Leur analyse par chromatographie en phase gazeuse est d'ailleurs la plus répandue dans la bibliographie du fait de ces propriétés. Nous allons dans un premier temps optimiser les analyses sur la colonne FFAP. Ensuite les méthodes d'analyse par les différents tests statistiques seront validées.

Une extraction sur phase solide (SPE) de ces acides sera effectuée. Cette extraction a pour but de changer la matrice d'analyse (alcool) et de concentrer l'échantillon. Nous calculerons les rendements d'extraction.

D.2 Optimisation de la séparation

Afin d'optimiser la séparation, nous travaillons sur une solution aqueuse contenant les 5 acides gras volatils à 80 mg/L et l'étalon interne à une concentration de 40 mg/L. Pour rappel, la colonne est une colonne ZB-FFAP (L =30 m, ID = 0,32 mm et $df = 0,25 \mu m$).

D.2.1 Conditions de séparation

Pour les analyses, la température de l'injecteur est de 250°C, la température du détecteur de 300°C et le rapport de split est de 20. La température du four est maintenue à 70°C pendant 2 minutes, puis augmente avec une rampe de 10°C/min jusqu'à 200°C. Cette température est maintenue pendant 3 minutes avant un retour aux conditions initiales. Un chromatogramme des acides étudiés est donné sur la Fig.40.

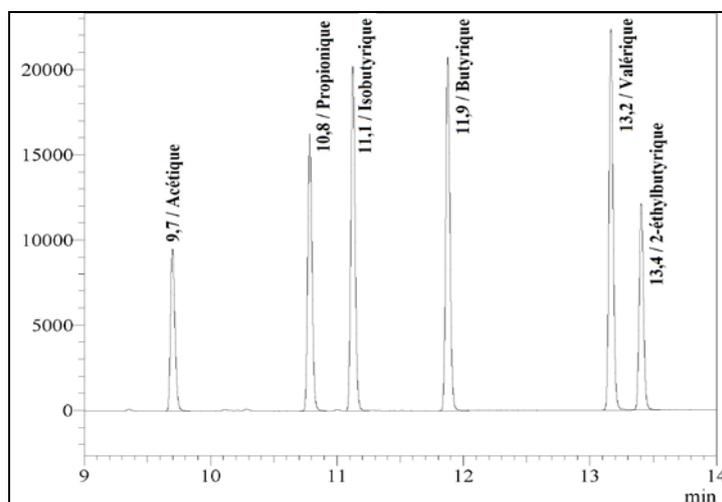


Fig.40 : GC, Colonne ZB-FFAP, Chromatogramme des acides gras volatils

D.2.2 Influence du pH

L'échantillon analysé présente un pH de 4. Il a été injecté directement ou en l'acidifiant à un pH de 1,9. Pour cela, l'échantillon a été mélangé à une solution d'acide phosphorique à 0,25 mol/L (75:25). La réponse en aire est supérieure de 25% pour l'échantillon acidifié du fait qu'ils se trouvent sous leur forme moléculaire et ils interagissent plus facilement avec la phase stationnaire polaire. Nous avons vu que dans le cas contraire, ils se trouvent sous forme ionique, ne sont pas volatils et restent sous forme de sels dans le port d'injection [Morin, 2007]. Les répétabilités pour les deux échantillons sont inférieures à 2%. Nous acidifierons donc les échantillons dans la suite de l'étude.

D.2.3 Données chromatographiques et qualité de séparation

Les données chromatographiques sont répertoriées dans le Tableau XIX. Le temps mort est égal à 3,3 min et a été mesuré en injectant un solvant apolaire, le cyclohexane.

Tableau XIX : GC, Colonne ZB-FFAP, Données chromatographiques

	t_R , min	k	Aire	Résolution
acide acétique	9,7	1,9	23 286	///
acide propionique	10,8	2,3	38 314	3,9
acide isobutyrique	11,1	2,4	46 860	10,3
acide butyrique	11,9	2,6	48 519	16,8
acide valérique	13,2	3	51 706	
acide 2-éthylbutyrique	13,4	3.1	28 628	///

La rétention des composés étudiés est effectuée par des liaisons hydrogènes avec la phase stationnaire. Les pics obtenus sont larges et symétriques (Fig.40). La largeur des pics provient des interactions entre la phase stationnaire et les solutés mais également de la matrice aqueuse. L'aire des pics augmente avec la longueur de la chaîne alkyle. Ainsi, l'aire de l'acide valérique est 2,2 fois supérieure à celle de l'acide acétique. L'analyse n'est pas très longue, les facteurs de rétention sont inférieurs à 3. Les résolutions entre les pics sont bonnes.

D'après la Fig.41, il existe une relation linéaire pour les acides gras volatils à chaîne aliphatique entre le logarithme du facteur de rétention et le nombre de carbone. Cette droite permet d'estimer le facteur de rétention d'acides gras volatils de même structure. Les acides ramifiés (isobutyrique et 2-éthylbutyrique) ne se situent pas sur cette droite car ils ne sont pas de la même famille.

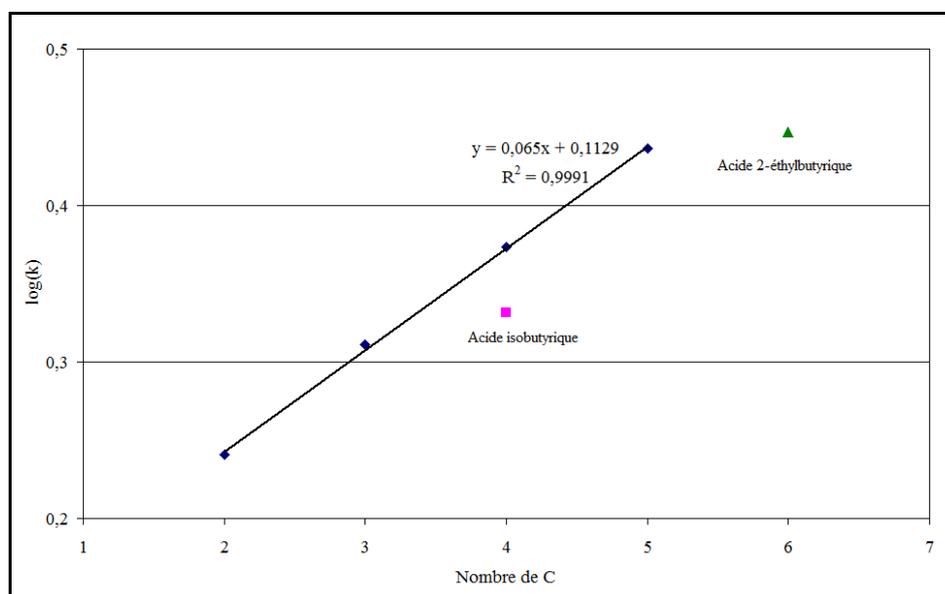


Fig.41 : GC, Colonne ZB-FFAP, $\log(k) = f(\text{nombre de carbone})$

Cette méthode permet donc l'analyse de ces acides par GC-FID. Nous allons maintenant voir si cette méthode peut être validée.

D.3 Validation de la méthode

Pour valider la méthode, nous préparons 6 solutions d'acides gras volatiles à 2, 4, 8, 20, 50 et 100 mg/L contenant chacune 40 mg/L d'étalon interne.

Les données permettant de déterminer si la méthode est linéaire et répétable, ainsi que les limites de détection et quantification sont données dans le Tableau XX.

Tableau XX : GC, Colonne ZB-FFAP, Données statistiques pour la validation de la méthode

	Répétabilité	Linéarité		LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
	CV, %	r ²	t _{calc}		
acide acétique	0,8	0,9999	441	0,3	0,9
acide propionique	0,5	0,9999	496	0,2	0,8
acide butyrique	0,5	0,99995	884	0,1	0,4
acide isobutyrique	0,5	0,99996	791	0,1	0,5
acide valérique	0,4	0,9999	717	0,2	0,5

Le coefficient de variation peut être calculé car les variances de répétabilité sont homogènes sur le domaine étudié. Ces coefficients sont inférieurs à 1%, indiquant une bonne répétabilité des mesures sur ce domaine.

Les coefficients de corrélation linéaire sont très proches de 1 et sont donc bons. La statistique t_{calc} est supérieure à la valeur de la table avec un risque de 1% indiquant que la méthode est linéaire sur le domaine étudié.

Les limites de détection et quantification sont plus faibles qu'en chromatographie d'exclusion ionique ou chromatographie en phase inverse pour les acides butyrique, isobutyrique et valérique. Pour les deux autres, elles sont équivalentes. Pour la GC, une limite plus élevée est observée pour l'acide acétique. Ce résultat est normal car sa réponse en FID est la plus faible. Cependant, ces limites sont calculées à partir d'échantillons composés uniquement de standard donc propres. Elles auront tendance à augmenter suivant la matrice dans laquelle on analyse (boue de station d'épuration par exemple).

D.4 Extraction sur phase solide (SPE)

B. Jurado *et al.* (2010) ont testé différentes phases solides polymériques pour l'extraction d'acides carboxyliques en phase aqueuse. Ils obtiennent les meilleurs résultats avec l'adsorbant LiChrolut EN de chez Merck pour les petits acides gras volatils (C_2 à C_{12}). J'ai donc choisi de tester cet adsorbant SPE composé d'un copolymère de polystyrène-divinylbenzène (PS/DVB). Ce polymère est le même que celui utilisé pour la chromatographie d'exclusion ionique sauf qu'il n'est pas greffé avec des groupements sulfoniques. Nous avons vu dans cette partie que les acides gras volatils ont des interactions hydrophobes avec les noyaux aromatiques de la résine, ce qui leur procure une rétention plus grande.

L'adsorbant SPE est de dénomination HR-P commercialisé par Macherey-Nagel. L'équipe ne disposant de dispositif SPE composé de chambres à vide pour le traitement des échantillons dans des cartouches SPE, le système « chromafix » s'adaptant sur des seringues va être utilisé. La quantité d'adsorbant est de 330 mg. Le volume mouillable minimum est de 0,8 mL.

B. Jurado *et al.* acidifient leur échantillon de 50 mL à un pH de 1,3 afin d'avoir les acides sous leur forme moléculaire et augmenter les interactions hydrophobes avec le copolymère. L'adsorbant est conditionné avec un mélange acétonitrile-méthanol (1:1) puis avec de l'eau ultrapure. L'échantillon est ensuite déposé sur l'adsorbant. La rétention des acides

carboxyliques est instantanée et la matrice aqueuse n'est pas récupérée. Les acides sont ensuite élués avec du méthanol ($V_{\text{élution}} = 200\mu\text{L}$).

Nos échantillons de réaction ont un volume de 2 à 3 mL. Nous allons donc voir dans un premier temps, si en déposant tous les acides avec 3 mL de solution aqueuse sur le polymère et si avec un volume d'élution identique, nous récupérons l'ensemble des acides après extraction. Cependant, le rendement ne peut être calculé qu'en fin d'extraction.

L'adsorbant est conditionné avec 3 mL de mélange acétonitrile-méthanol (1:1) puis avec 3 mL d'eau ultrapure. L'échantillon est une solution standard composée des acides gras volatils à 40 mg/L. Cette solution est acidifiée à un pH de 1,8 en le mélangeant à une solution d'acide phosphorique à 0,25 mol/L (75:25).

D.4.1 Rendement d'extraction

Afin de savoir si tous les acides sont retenus par la résine, nous allons faire deux tests : un dépôt de 6 mL d'échantillon, désigné HRP 6 mL et un dépôt de 3 mL d'échantillon, désigné HRP 3mL. Nous éluerons le premier avec 6 mL de méthanol et le deuxième avec 3 mL. Chaque test sera effectué sur 5 réplicats afin de mesurer la répétabilité par le coefficient de variation donné dans le Tableau XXI. Chaque échantillon est analysé 3 fois directement et après extraction.

Tableau XXI : GC, Colonne ZB-FFAP, SPE, Coefficient de variation

	Analyse directe	HRP-6mL	HRP-3mL
Acide acétique	1,6%	11%	5,3%
Acide propionique	1,8%	8,8%	7,5%
Acide isobutyrique	1,5%	5,1%	7%
Acide butyrique	1,6%	9,6%	6,6%
Acide valérique	1,5%	5,9%	8,9%

Pour l'extraction (changement de solvant), les coefficients de variation sont compris entre 5 et 11% et sont donc supérieurs à la valeur de 2% couramment admise en chromatographie. L'extraction n'est donc pas répétable. Ce mauvais résultat peut sans doute être expliqué par le matériel utilisé qui permet donc seulement d'avoir des résultats qualitatifs et ne permet pas de quantifier. Un dispositif SPE composé de chambres à vide pour le traitement des échantillons dans des cartouches permettrait d'obtenir des résultats plus répétables. En effet, la vitesse à laquelle les acides sont déposés et élués ainsi qu'un contrôle plus fin du volume déposé et élué sur la résine sont des facteurs très importants pour une bonne répétabilité et un rendement maximum.

Les rendements d'extraction sont déterminés en comparant les aires des échantillons injectés directement (AGV 25 mg/L) et après SPE et sont donnés pour chaque acide sur la Fig.42.

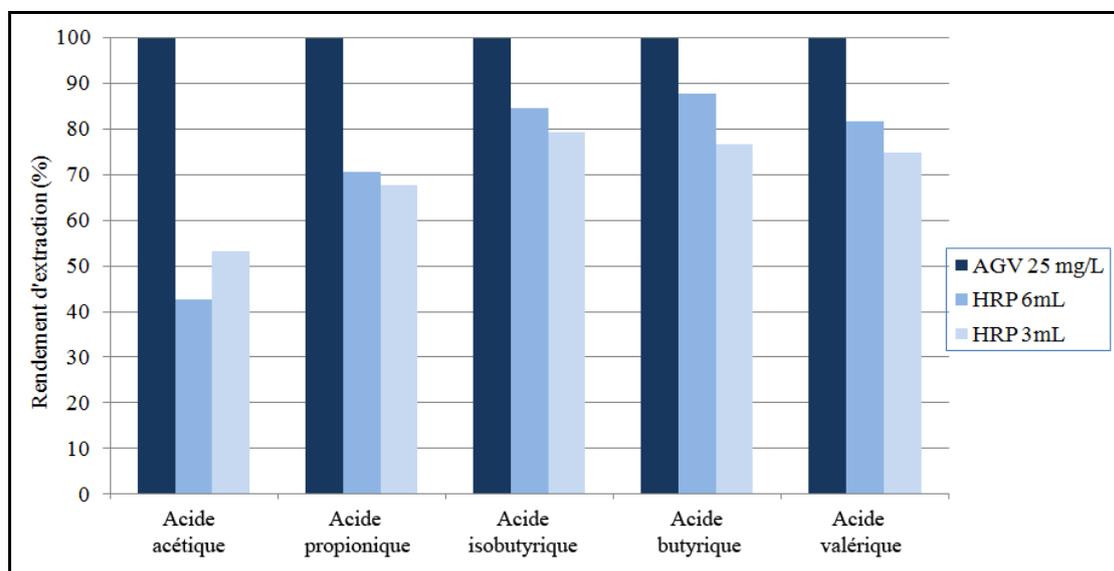


Fig.42 : GC, Colonne ZB-FFAP, SPE, Rendements d'extraction

L'acide acétique possède le rendement d'extraction le plus faible. Sa chaîne alkyle est la plus courte et il interagit donc moins avec la résine polymérique. Pour les acides isobutyrique, butyrique et valérique, ces rendements sont assez homogènes compris entre 80 et 90 % pour les échantillons HRP 6mL et entre 75 et 80 % pour les échantillons HRP 3 mL.

Les rendements d'extraction sont légèrement supérieurs pour les échantillons HRP 6mL que pour les échantillons HRP 3mL sauf pour l'acide acétique. Si l'on considère les coefficients de variation importants pour les 5 acides, cette différence entre les rendements d'extraction pour HRP 6mL et HRP 3 mL n'est pas significative. Nous continuerons donc l'étude pour la préconcentration en déposant 3 mL d'échantillon.

D.4.2 Préconcentration des échantillons

Nous allons préconcentrer les échantillons. Pour cela, 3 mL d'échantillon (AGV à 25 mg/L) sont déposés et élués avec 1 mL et 2 mL de méthanol. Ces échantillons sont désignés respectivement HRP 1 mL et HRP 2 mL. Nous effectuerons 5 réplicats pour chacun pour la répétabilité.

Les coefficients de variation sont calculés pour chaque échantillon et sont donnés dans le Tableau XXII.

Tableau XXII : GC, Colonne ZB-FFAP, SPE, Coefficients de variation pour la préconcentration

	HRP 2 mL	HRP 1 mL
Acide acétique	11,4%	14,9%
Acide propionique	12,9%	11,1%
Acide isobutyrique	7,2%	8,8%
Acide butyrique	8,5%	9,0%
Acide valérique	6,5%	9,4%

Ces coefficients sont plus élevés pour la majorité des acides que les coefficients de variation calculés auparavant. Dans le cas d'une analyse sur des échantillons réels, les résultats obtenus peuvent donc donner une tendance sur l'évolution des concentrations mais ne peuvent être utilisés quantitativement.

Nous déterminons ensuite les rendements de préconcentration pour les échantillons HRP 1mL et HRP 2 mL (Fig.43 et Fig.44). Dans 3 mL d'échantillon à 25 mg/L, nous avons 0,075 mg de chaque acide. Nous déposons donc 0,075 mg de chaque acide sur l'adsorbant. En éluant avec 1 mL de méthanol par exemple, nous devrions retrouver les acides concentrés à 75 mg/L.

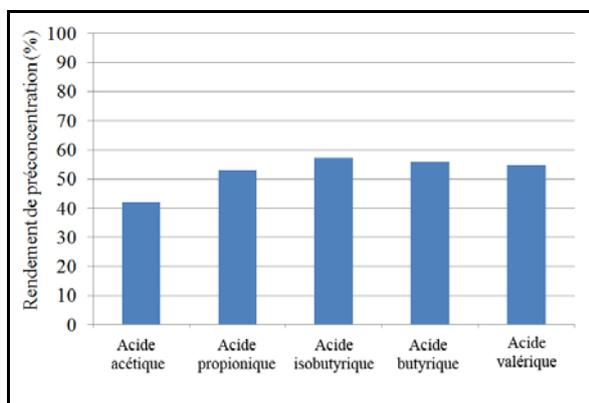


Fig.43 : HRP 2 mL

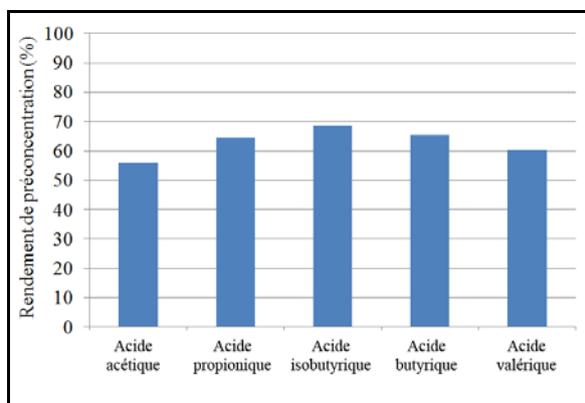


Fig.44 : HRP 1 mL

Pour une préconcentration par un facteur de 2 (Fig.43), les rendements sont faibles dans l'ensemble. Pour une concentration attendue de 50 mg/L, nous obtenons 21 mg/L pour l'acide acétique et approximativement 27 mg/L pour les autres. L'échantillon de départ (AGV 25mg/L) possède une concentration en acides de 25 mg/L. Pour extraire 25 mg/L d'acides, il faut donc quasiment préconcentrer l'échantillon par un facteur de 2.

Pour une préconcentration par un facteur de 3 (Fig.44), les rendements sont légèrement plus élevés mais ne sont pas satisfaisants. En effet, pour une concentration attendue de 75 mg/L,

nous obtenons 42 mg/L pour l'acide acétique et un maximum de 52 mg/L pour l'acide isobutyrique.

Les profils des rendements sont assez semblables pour les deux types d'échantillon. Dans les deux cas, l'acide isobutyrique possède le rendement le plus élevé et l'acide acétique le moins élevé.

Cette méthode peut permettre de concentrer un échantillon en faible concentration et donc détectable pour l'analyse mais elle ne permet pas de réaliser d'analyse quantitative. Ce travail pourrait être poursuivi en concentrant davantage (10 ou 50 fois) pour l'identification de traces d'acides mais également en utilisant des cartouches SPE d'échange anionique (SAX). Cependant, les études au laboratoire sont des études cinétiques avec beaucoup d'échantillons et de petits volumes. Pour ce type de suivi cinétique, il semble donc difficile de réaliser de tels traitements sur l'échantillon. Par contre, cette méthode est préconisée pour l'obtention d'informations qualitatives.

E. Conclusion sur la chromatographie en phase gazeuse

L'étude a porté sur l'analyse des acides gras volatils seulement. L'analyse des autres acides par GC, les acides oxalique, formique, glyoxylique, glycolique et succinique auraient nécessité une étape de dérivation. Il serait intéressant de tester cette étape même si des pertes d'analytes seront sans doute observées pouvant entraîner des variations sur la répétabilité. De plus, pour les échantillons de faibles concentrations et de petits volumes, une perte d'analytes peut fausser les résultats des études cinétiques.

Pour les acides gras volatiles, la séparation est très bonne en injectant directement les acides en phase aqueuse sur une colonne de type FFAP. L'échantillon est acidifié avant injection à un pH de 1,9. Les limites de détection et quantification sont semblables à la chromatographie exclusion ionique et à la chromatographie de phase inversée pour les acides acétique et propionique et légèrement inférieures pour les acides isobutyrique, butyrique et valérique.

Une extraction dans un solvant organique (le méthanol) et une préconcentration a été testée. Les résultats permettent de réaliser des études qualitatives mais non quantitatives. Il serait intéressant de comparer ces résultats avec un autre type de cartouche SPE (à échange anionique, SAX).

Conclusion générale

L'objet du présent travail portait sur l'analyse des produits d'oxydation des polluants dans les effluents aqueux et plus particulièrement, les acides et diacides organiques à chaînes courtes. Pour cela, une étude bibliographique récapitulant les techniques d'analyse utilisées a été présentée. Les travaux réalisés concernaient l'analyse de 10 acides et diacides (C_1 à C_5) couramment formés lors de ces dégradations par chromatographie d'exclusion ionique, par chromatographie d'échange anionique, par chromatographie liquide de phase inversée et par chromatographie en phase gazeuse. Le but était de décrire les mécanismes d'interaction entre les acides en solution aqueuse préparés à partir de standard et les phases stationnaires et/ou mobile, mais également de connaître les avantages et les inconvénients de chaque technique. La chromatographie d'exclusion ionique suivie d'une détection UV est la technique d'analyse actuellement utilisée au laboratoire. Une bonne séparation est obtenue et la méthode d'analyse est validée pour tous les acides. L'analyse de l'acide oxalique a été la plus difficile car ce composé élué proche du volume mort. Sa quantification reste tout de même possible et sa limite de quantification est de 0,3 mg/L. Les limites de quantification pour les autres acides varient entre 0,7 et 2,5 mg/L.

Les conditions analytiques sur l'appareillage de chromatographie d'échange anionique disponible au laboratoire n'ont pas permis d'effectuer la séparation des acides, dont la plupart éluent en moins d'une minute. L'étude a tout de même été poursuivie et cette technique suivie d'une détection par conductimétrie permet d'obtenir des limites de détection et quantification dix fois plus basses que par UV. En optimisant la séparation avec un autre type de phase stationnaire ou mobile, cette technique pourrait être utilisée pour les analyses des produits de réaction en photocatalyse en faibles concentrations.

En chromatographie liquide de phase inversée suivie d'une détection par UV, les meilleurs résultats ont été obtenus avec une colonne possédant un « end-capping » polaire et une phase mobile acidifiée à un pH de 2,5. Une bonne séparation de tous les acides est obtenue et les limites de détection et quantification sont semblables à celles obtenues par exclusion ionique. Par rapport à l'exclusion ionique, le temps d'analyse est amélioré pour les acides les plus polaires, à savoir les acides glyoxylique, glycolique, formique, acétique, oxalique, succinique et propionique, et il est identique pour les acides butyrique, isobutyrique et valérique.

Les analyses ont été effectuées sur des solutions composées des standards. Dans les effluents réels, les matrices sont différentes, elles peuvent interférer avec l'analyse des acides organiques et également endommager plus rapidement la colonne chromatographique. Une étape d'extraction sur phase solide (SPE) permettrait d'isoler les acides de la matrice et éviter

ces désagréments. Simultanément, une étape de préconcentration par SPE pourrait améliorer la sensibilité de la méthode.

Seuls les acides gras volatils ont été séparés en chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme. La séparation des autres acides aurait nécessité une étape de dérivation supplémentaire. Les résultats obtenus pour les acides gras volatils sont très bons en acidifiant les échantillons à un pH de 1,9 avant injection dans la colonne de type FFAP. Une étape d'extraction et une étape de préconcentration sur phase solide (SPE) dans un solvant organique et sur une cartouche contenant un polymère, le polystyrène-divinylbenzène, ont également été testées. Cependant, la méthode pour l'extraction et la préconcentration permet seulement de réaliser des études qualitatives. Il serait intéressant de comparer les résultats obtenus avec des cartouches SPE à échange anionique, mais également de tester la microextraction sur phase solide couplée à la technique espace de tête, semblant donner de très bons résultats dans la littérature.

Pour toutes ces techniques, un couplage avec un spectromètre de masse permettrait d'abaisser nettement les limites de détection et quantification.

La chromatographie d'exclusion ionique est la plus répandue mais l'optimisation de la méthode est limitée si des composés coéluent. En effet, seuls le pH de la phase mobile et/ou la phase stationnaire peuvent être changés. La chromatographie liquide de phase inversée permet des développements plus nombreux. Un plus grand choix dans le type de phase stationnaire, l'appariement d'ions permettent une modification des interactions et la séparation de nombreuses molécules. La chromatographie en phase gazeuse semble plus adaptée pour l'analyse des acides gras volatils en phase aqueuse pouvant être injectés directement dans la colonne. Enfin, la chromatographie d'échange anionique peut fournir de bons résultats, mais son développement n'a pas été approfondi dans cette étude. Le laboratoire n'est pas équipé en électrophorèse capillaire, mais son utilisation pour l'analyse des acides organiques en phase aqueuse semble prometteuse.

Annexes

ANNEXE 1 : Principe de la LLE et SPE

L'extraction liquide-liquide (LLE) [Cote, 1998]

Le principe de l'extraction liquide-liquide est présenté sur la Fig.45.

L'extraction LLE comporte deux étapes. La première est la mise en contact de la solution d'alimentation contenant les solutés à séparer et d'une seconde phase liquide, le solvant. Cette étape nécessite un temps suffisant pour obtenir un équilibre pendant lequel les solutés

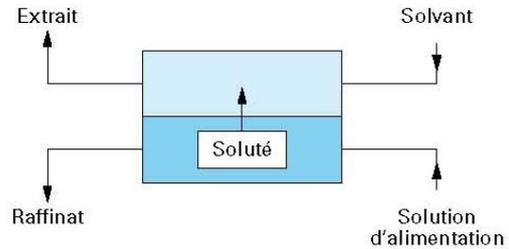
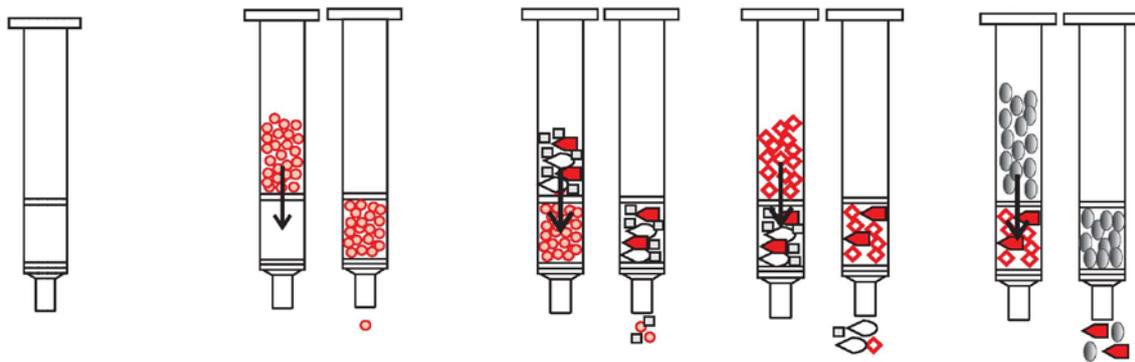


Fig.45 : Principe de l'extraction liquide-liquide [Cote, 1998]

sont transférés dans le solvant. Ce dernier qui contient alors le ou les solutés est appelé extrait. La solution d'alimentation qui a perdu une majeure partie des solutés est appelée raffinat. La deuxième étape consiste à séparer ces deux liquides (extrait et raffinat) sous l'effet de la gravité naturelle, d'une force centrifuge ou d'un champ électrique par exemple.

L'extraction sur phase solide (SPE) [Supelco, 1998]

La SPE se déroule en 5 étapes selon le schéma de principe (Fig.46).



Etape 1 : choix
de l'adsorbant

Etape 2 : Conditionnement
de l'adsorbant

Etape 3 : Dépôt
de l'échantillon

Etape 4 : Lavage
de l'adsorbant

Etape 5 : Elution
des solutés

Fig.46 : Principe de l'extraction sur phase solide SPE [Supelco, 1998]

Le conditionnement de l'adsorbant est nécessaire afin d'assurer des interactions reproductibles avec l'analyte. Il consiste à imprégner l'adsorbant avec un solvant adéquat et ainsi produire un environnement convenant à l'adsorption de l'analyte. Le lavage de l'adsorbant permet aux composés non retenus par l'adsorbant d'être entraînés hors de celui-ci. Le solvant de lavage doit être correctement choisi afin de ne pas éluer les solutés d'intérêt. L'élution consiste à récupérer les solutés d'intérêt avec un éluant adéquat.

ANNEXE 2 : Phases et applications SPE

Les différentes phases SPE ainsi que leurs choix (Macherey-Nagel) sont présentées dans la Fig.47.

Guide concis pour le choix des phases SPE et des solvants

Notre gamme de produits :		Solubilité de l'échantillon	Solvant	Polarité de l'échantillon	Phases recommandées pour l'adsorption	Solvants recommandés pour l'éluion (selection)				
Phases standards	Phases spéciales	soluble dans l'eau	aqueux	non ionique	apolaire	Easy, HR-P C18 ec, C18, C18 Hydra C8, C4, C2, C ₆ H ₅ , CN	alcools acétonitrile hexane CH ₂ Cl ₂			
résines polymériques (PS/DVB)	Drug Drug II ABC18 Diamino Tetracycline Crosslinks AOX CN/SiOH C18 PAH NH₂ / C18 Na₂SO₄ / Florisil® SiOH-H⁺/SA SA/SiOH NAN DNPH Dry XTR				moyennement polaire	Easy, HR-P C18 ec, C18, C18 Hydra C8, C4, C2, C ₆ H ₅ , CN	alcools acétate d'éthyle CHCl ₃ , CH ₂ Cl ₂			
EASY					polaire	CN, OH PA DMA NH ₂	alcools acétate d'éthyle CHCl ₃ , CH ₂ Cl ₂			
HR-P				ionique	cationique	PCA (WCX) SA (SCX) PSA PS-H ⁺	acides solutions salines solutions tampons			
PS-RP						anionique	SB (SAX) NH ₂ DMA PS-OH ⁻	acides solutions salines solutions tampons		
silices modifiées					aqueux		apolaire	Easy, HR-P, PS-RP C18 ec, C18, C18 Hydra C8, C4, C2, C ₆ H ₅ , CN	alcools acétonitrile hexane CH ₂ Cl ₂	
C18 ec / ec f						organique		moyennement polaire	SiOH NH ₂	alcools acétate d'éthyle CHCl ₃ , CH ₂ Cl ₂
C18 / f									polaire	CN, OH PA DMA NH ₂
C18 Hydra					échangeurs d'ions		SA (SCX) SB (SAX) PCA (WCX) PSA PS-OH ⁻ PS-H ⁺ PS-Ag ⁺ PS-Ba ²⁺			
C8										
C4										
C2										
C ₆ H ₁₁ ec										
C ₆ H ₅										
NO ₂										
NH ₂										
DMA										
CN										
OH										
PA										
SiOH										
Alox A, N, B										
Florisil®										

Fig.47 : Gamme et choix des phases SPE, Macherey-Nagel [Macherey, 2007]

ANNEXE 3 : Les liaisons dans l'édifice chimique [Arnaud, 1981 ; Arnaud, 1993 ; Arnaud, 1996 ; Drillat, 1967 ; Moore, 1972]

La liaison covalente simple

La liaison de covalence simple entre deux atomes A et B est due à la mise en commun de deux électrons de valence, qui deviennent indiscernables. Du point de vue quantique, les deux électrons de liaison se trouvent dans une orbitale moléculaire qui englobe les deux noyaux et, en vertu du principe de Pauli, ils ont des spins opposés. On peut approximativement considérer que cette orbitale moléculaire résulte de la fusion des orbitales atomiques (s , sp^3 , sp^2 , sp) qui se recouvrent de façon axiale. On note ce type de liaison σ : A-B, correspondant à A:B.

Ex. H-O-H, Cl-Cl, H-Cl

Il est important de noter que la liaison covalente simple est une liaison forte, dont les longueurs sont bien définies et égales à la somme des rayons de covalence de A et de B.

Ex. Energies de liaison de H-H ($104 \text{ kcal.mol}^{-1}$), H-O ($110 \text{ kcal.mol}^{-1}$), C-C (83 kcal.mol^{-1}), C-H ($100 \text{ kcal.mol}^{-1}$).

La polarité de la liaison covalente simple est due à la différence d'électronégativité des deux éléments, c'est-à-dire de la tendance qu'ils possèdent à attirer les électrons dans la liaison covalente. La liaison est parfaitement symétrique si les atomes sont identiques mais, s'ils sont différents, c'est évidemment l'atome le plus électronégatif qui attire le plus le doublet. La liaison se comporte alors comme un dipôle électrique indiqué par divers schémas :

Ex. $\text{H} \rightarrow \text{---Cl}$ ou H-Cl



La flèche dirigée de l'hydrogène vers le chlore symbolise l'effet inductif (-I) par rapport à l'élément le plus électronégatif. Pour résumer, l'effet inductif, intéressant les électrons σ , est dû à l'électronégativité relative des atomes liés. Il s'agit d'un effet statique correspondant à une polarisation permanente. A ce titre, nous rappelons, dans le domaine de la chimie organique, les effets inductomères des substituants que peut porter un atome de carbone :

- Référence – effet inductif nul ($I = 0$) : H (hydrogène) ;
- Substituants à effet inductif attractif (-I) : X (halogènes), OH, NH_2 ;
- Substituants à effet inductif répulsif (+I) : R (groupes alkyles), M (métaux).

La covalence multiple

Il peut arriver que la liaison covalente soit multiple quand les atomes A et B engagent plus d'un électron de valence chacun. La liaison issue du recouvrement latéral d'orbitales atomiques p est une liaison π .

Ex. Acide succinique : $\text{O}=(\text{OH})\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{OH})=\text{O}$

Une différence d'électronégativité des atomes liés favorise la délocalisation des électrons π , provoquant ainsi un effet mésomère (-M) par rapport à l'élément le plus électronégatif.

Ces liaisons multiples sont plus fortes que des liaisons simples.

Ex. $\text{C}=\text{C}$ ($146 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$)

La covalence, simple ou dative, est la liaison organique par excellence.

La covalence dative ou coordinance

C'est une covalence dans laquelle la mise en commun résulte du don des deux électrons d'un atome à l'autre, pourvu que ce dernier dispose d'un niveau vide pour les accueillir. La nature de la covalence dative n'est pas différente de celle de la covalence ordinaire.

Ex. $(\text{HO}-)_3\text{P}\rightarrow\text{O}$ ou $(\text{HO}-)_3\text{P}^+-\text{O}^-$

Le nombre de liaisons que peut former un atome vérifie, sauf exception, la règle de l'octet qui spécifie que les atomes tendent à s'entourer d'un octet d'électrons (4 doublets dans les niveaux s et p).

La liaison ionique ou électrostatique

La liaison ionique peut être considérée comme la limite d'une liaison de covalence très polaire. Ainsi, lorsque les deux atomes en présence ont des électronégativités très différentes, le partage du doublet devient si dissymétrique qu'il passe entièrement sur l'atome le plus électronégatif. Ce type de liaison est issu de la cession d'un électron d'un atome sur l'autre. La molécule se réduit alors à une paire d'ions de charges opposées qui constituera le motif du réseau cristallin.

Ex. Na^+ , Cl^-

La cohésion du cristal est assurée par les attractions électrostatiques, fortes et à relativement grande portée puisque la force ne décroît que comme $1/r^2$. Par exemple, l'énergie de la liaison ionique Na^+ , Cl^- égale à 89 kcal/mol montre la grande stabilité de la paire d'ions.

La formation d'un ion à partir d'un atome s'accompagne d'une importante variation de volume. Ainsi, les rayons ioniques des cations et des anions peuvent être moitié et double des rayons covalents des atomes dont ils dérivent.

Forces intermoléculaires ou forces de Van der Waals

Les forces de Van der Waals concernent les interactions intermoléculaires qui peuvent avoir quatre origines diverses, précisées ci-après : attractions entre deux dipôles permanents, attraction entre un dipôle permanent et un dipôle induit, attraction entre dipôles induits et répulsion entre molécules.

1. Polarité et moment électrique. Polarisation et effet inductomère

Un dipôle électrique est l'ensemble de deux charges opposées $+q$ et $-q$ situées à une distance l petite devant la distance où on étudie leurs effets. Il est entièrement caractérisé par son moment dipolaire \mathcal{M} , vecteur de module ql dirigé de $-q$ vers $+q$. Nous avons déjà vu que les liaisons de covalence sièges d'effets inductif/mésomère se comportent comme un dipôle électrique. Dans une molécule polyatomique, les divers moments électriques s'ajoutent vectoriellement. Ainsi, l'eau, où l'angle H-O-H vaut 100° possède un moment dipolaire, alors que le gaz carbonique CO_2 n'a pas de moment dipolaire, car la molécule est symétrique : $\text{O}=\text{C}=\text{O}$.

Un dipôle électrique crée un potentiel et un champ électrique \mathbf{E} dépendant de la direction. L'effet de ce champ électrique sur un deuxième dipôle en exalte la distorsion du nuage électronique et provoque donc une polarisation supplémentaire. Cet effet inductomère est donc un effet dynamique correspondant à une polarisation induite supplémentaire. Il est à l'origine, en chimie organique, des mécanismes des réactions de substitution et des réactions d'addition quand le deuxième dipôle est à covalence simple et covalence mixte, respectivement. Ces forces électrostatiques entre deux molécules polaires sont des forces d'attraction appelées forces de Keesom.

L'effet du champ électrique \mathbf{E} créé par un dipôle permanent sur une molécule non polaire peut y provoquer une polarisation induite qui disparaît quand elle s'éloigne. Ces interactions également attractives entre dipôle permanent et dipôle induit sont appelées forces de Debye.

Il existe un troisième type de forces attractives en l'absence de dipôles permanents (ex. CO_2) qui s'explique en admettant que, par suite des mouvements électroniques, ces molécules peuvent posséder un moment dipolaire variant rapidement (nul en moyenne) qui peut polariser une molécule voisine et y créer un dipôle variant en phase avec lui.

Enfin, les forces de dispersion, appelées forces de London, sont dues à la répulsion entre molécules, polaire ou polarisable, quand elles viennent à proximité l'une de l'autre. En chimie organique, on parle alors de gêne ou d'encombrement stérique.

2. Energie d'interaction de Van der Waals

L'énergie d'interaction de Van der Waals due à l'interaction entre atomes ou molécules non liés dépend de leur distance ρ et est la somme de deux termes :

Un terme d'attraction $V_a = -A\rho^{-6}$

$$V_\rho = V_a + V_r \quad (17)$$

Un terme de répulsion $V_r = B\rho^{-12}$

A et B étant des constantes dépendant de la nature des atomes ou molécules mises en jeu.

Quand la distance interatomique ou intermoléculaire ρ augmente de zéro à l'infini, le terme d'attraction V_a croît de $-\infty$ à 0^- , tandis que le terme de répulsion décroît de $+\infty$ à 0^+ , si bien que l'énergie d'interaction de Van der Waals V_ρ est fortement positive pour $\rho < 0,28$ nm environ (Répulsion prédominante) alors qu'elle est finement négative pour $\rho > 0,28$ nm environ (Attraction quasi nulle). On appelle rayon de Van der Waals d'un élément la moitié de la distance minimale à laquelle peuvent s'approcher deux atomes de cet élément non directement liés. En conséquence, deux atomes différents ne peuvent pas s'approcher à une distance inférieure à la somme de leurs rayons de Van der Waals.

L'ordre de grandeur d'énergie d'interaction de Van der Waals est $2-7 \text{ kcal.mol}^{-1}$, les forces de London, apportant la contribution principale à la cohésion des substances et augmentant avec la masse molaire. L'ensemble des forces de Keesom et de Debye, intervenant d'autant plus que le moment dipolaire \mathcal{M} est grand, contribue pour moins de 5% à l'énergie d'interaction totale.

La liaison hydrogène

Il s'agit d'une coordinance dégénérée dans laquelle un proton H lié à un élément électronégatif A joue le rôle d'accepteur de doublet fourni par un autre atome électronégatif B. Elle se présente à peu près uniquement avec les halogènes, l'oxygène et l'azote et l'énergie de ce type de liaison est typiquement 85 kcal/mol .

Notation : B \cdots → H →— A (distance B \cdots H $\leq 0,35$ nm)

Ex. CH₃-O \cdots → H →— O-CH₃

H

ANNEXE 4 : Les détecteurs en GC

Le détecteur à ionisation de flamme (FID) [Rouessac, 2009]

Le schéma de principe est présenté dans la Fig.48. Le FID détecte seulement les produits contenant du carbone et de l'hydrogène. L'échantillon entraîné par le gaz vecteur pénètre dans une flamme obtenue par combustion de dihydrogène et d'air. Les composés organiques forment alors des ions et particules chargées. Un courant ionique de très faible intensité (10-12 μA) est alors

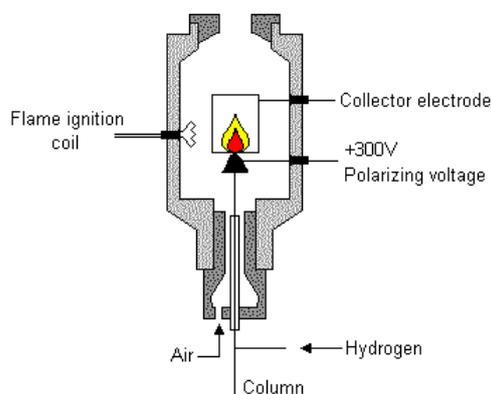


Fig.48 : Schéma d'un détecteur à ionisation de flamme [UNL, 2011]

produit entre deux électrodes (différence de potentiel, ddp, de 100 à 300 V). La première électrode correspond à la masse et est l'extrémité du brûleur, la deuxième est de forme annulaire autour de la flamme et est l'électrode collectrice. Le signal obtenu est amplifié par un électromètre en une tension mesurable.

Le détecteur à capture d'électron (ECD) [Rouessac, 2009]

Ce détecteur est considéré comme sélectif car il est beaucoup plus sensible aux composés halocarbonés. Une source radioactive (Fig.49) émet des particules β^- qui ionise le gaz vecteur (N_2). Les électrons arrachés sont captés par l'anode et créent un courant de base.

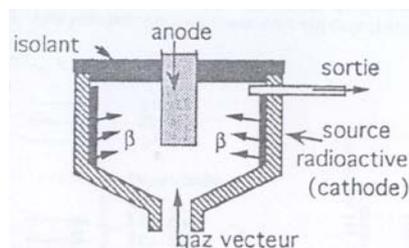
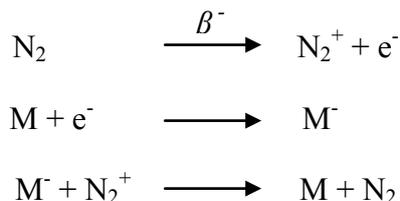


Fig.49 : Schéma d'un détecteur à capture d'électron [Tranchant 2009]

Lorsque certains composés pénètrent dans le détecteur, ils peuvent capter des électrons libres et une baisse du signal est observée et mesurée.

Les réactions successives se produisant sont (avec M une molécule contenant un halogène) :



Le spectromètre de masse (GC) [Arpino, 2007]

Un spectromètre de masse est composé d'une source d'ionisation, d'un analyseur, d'un détecteur d'ions et d'un système informatique pour traiter les données (Fig.50).

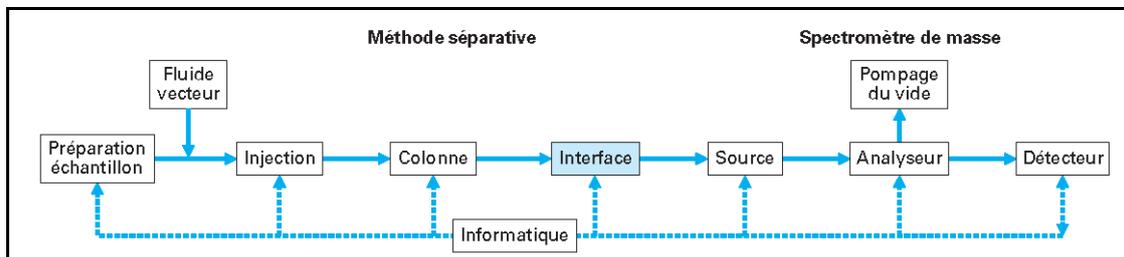
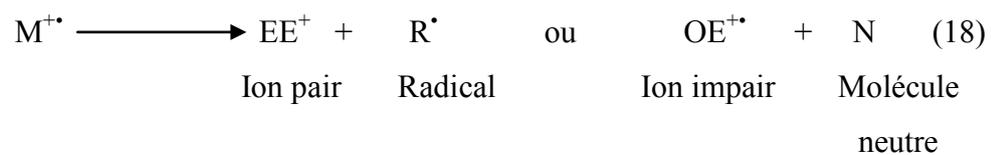


Fig.50 : Schéma simplifié d'une GC-MS [Arpino, 2007]

La source d'ions se trouve sous vide et une interface permet son raccordement à la colonne chromatographique. La source permet de transformer des molécules d'un état neutre à un état ionisé en phase gaz. L'analyseur, quant à lui, trie les ions en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z , unité, le Thomson).

La MS permet d'identifier, de doser une substance et d'obtenir des informations sur la composition, la structure et la masse moléculaire. La masse d'une molécule s'exprime en unité de masse atomique (uma) ou en Dalton (Da). Elle évalue également la quantité relative de chacun des ions présents.

Une molécule M est introduite et ionisée dans un spectromètre de masse. L'ion ainsi obtenu, appelé ion moléculaire $M^{+\bullet}$, est un radical cation à nombre impair d'électrons. Il permet la détermination de la masse moléculaire du composé. L'ion moléculaire peut ensuite être fragmenté selon l'équation (18).



Ces ions fragments sont ensuite séparés en fonction de leur rapport masse/charge (m/z) par un champ magnétique et/ou électrique, puis collectés par un détecteur. Tous ces ions fragments constituent le spectre de masse. Leur lecture permet l'identification de la structure moléculaire.

ANNEXE 5 : Etalonnage externe ou interne

Etalonnage externe

Cette méthode est généralement utilisée en chromatographie liquide car le volume injecté est constant (boucle calibrée). La réponse du détecteur est directement reliée à la concentration de l'échantillon. On a une équation telle que :

$$\text{Aire} = b_1 * \text{Concentration} + b_0$$

Il est donc possible de tracer des courbes d'étalonnage en injectant plusieurs solutions de concentrations différentes et en relevant l'aire du pic correspondant.

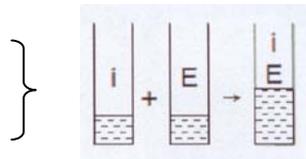
Etalonnage interne

Cette méthode est généralement utilisée en GC, le volume injecté n'étant pas calibré dans un boucle. On élimine ainsi l'erreur d'injection à la seringue. Les aires de chaque pic sont comparées à celle d'une substance de référence, l'étalon interne. Une quantité connue de cet étalon est ajoutée à l'échantillon. Cet étalon interne doit être de pureté connue, séparé de tous les constituants de l'échantillon, présent à une concentration adaptée.

Equations reliant la valeur de l'aire à la concentration du composé :

$$\text{Produit } i : A_i = V_i \cdot C_i \cdot k_i$$

$$\text{Etalon } E : A_E = V_E \cdot C_E \cdot k_E$$



(avec A : aire du pic, V : volume injecté, C : concentration et k : coefficient de réponse)

On a alors :

$A_i/A_E = V_i \cdot C_i \cdot k_i / V_E \cdot C_E \cdot k_E$ et donc, comme le volume de produit et d'étalon injecté est le même on obtient :

$$A_i/A_E = C_i / C_E \cdot k_{i/E} \quad (19)$$

Il est alors possible de tracer une courbe d'étalonnage pour chaque composé afin de déterminer leur coefficient de réponse.

ANNEXE 6 : Validation d'une méthode

Les caractéristiques que nous allons étudier pour valider une méthode sont :

- la sensibilité Rapport de la variation de la valeur d'information (aire du pic) de la méthode d'analyse à la variation de la grandeur en analyte (concentration). C'est la pente de la droite d'étalonnage [AFNOR, 1999].
- le blanc Réponse en absence d'analyte. C'est l'ordonnée à l'origine de la droite d'étalonnage [Amarouche, 2010].
- la répétabilité Conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode, sur des individus d'essai identiques dans la même laboratoire, par le même opérateur, utilisant un même équipement et pendant un court intervalle de temps [AFNOR, 1999].
- la linéarité Capacité d'une méthode d'analyse, à l'intérieur d'un certain intervalle, à fournir une valeur d'information (aire du pic) ou des résultats proportionnels à la quantité en analyte à doser dans l'échantillon [AFNOR, 1999].
- la limite de
détection (LOD) Plus petite concentration de l'analyte pouvant être détectée, mais non quantifiée, dans les conditions expérimentales décrites de la méthode [Amarouche, 2010].
- la limite de
quantification (LOQ) Plus petite concentration de l'analyte pouvant être quantifiée avec une incertitude acceptable dans les conditions expérimentales décrites de la méthode [Amarouche, 2010].

Sensibilité et blanc [AFNOR, 1999]

Pour chaque acide, 6 niveaux de calibration vont être préparés et niveau sera mesuré 5 fois.

Une droite d'étalonnage est tracée d'équation $Aire = b_1 \times Concentration + b_0$ (20)

Les coefficients b_1 , désignant la pente et b_0 , désignant l'ordonnée à l'origine sont calculés par la méthode des moindres carrés.

Répétabilité [Amarouche, 2010]

La quantification est réalisée au travers d'un écart-type de répétabilité dépendant du domaine d'application de la méthode étudiée. Cet écart-type est calculé selon l'équation (21).

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (21)$$

La variance est l'écart-type au carré, soit s_r^2 . La répétabilité n'étant pas forcément constante sur tout le domaine, il faut la calculer en chacun des points (niveau). A l'issue des calculs, on

obtient 6 écarts types de répétabilité ($s_{r1}, s_{r2}, \dots, s_{r6}$) sur tout le domaine d'application de la méthode.

Un test de COCHRAN permettant de comparer les variances est utilisé. Pour cela, une statistique C est calculé selon l'équation (22) avec s_{\max} , écart type le plus élevé de l'ensemble.

$$C = \frac{s_{\max}^2}{\sum_{i=1}^p s_i^2} \quad (22)$$

- a. Si la statistique C du test est inférieure ou égale à sa valeur critique à 1%, l'hypothèse d'homogénéité des variances est acceptée,
- b. Si la statistique C du test est supérieure à sa valeur critique à 1%, l'hypothèse d'homogénéité des variances est rejetée.

Si le test de Cochran ne rejette pas l'hypothèse d'homogénéité, la répétabilité pourra être déterminée à partir des 6 répétabilités déjà calculées précédemment et de la formule (23):

$$s_r = \sqrt{\frac{1}{p} \sum_{i=1}^p s_{r_i}^2} \quad (23)$$

Le CV est le rapport entre l'écart-type de répétabilité et la moyenne des valeurs d'informations (aire).

La linéarité [Tenenhaus, 2007]

La linéarité de la méthode est déterminée par le calcul du coefficient de régression linéaire r^2 et par un test d'hypothèse sur le coefficient de régression de la pente b_1 . Pour une régression linéaire simple, ce test permet de décider avec une faible marge d'erreur s'il y a une liaison linéaire entre les variables dans le domaine choisi. Pour cela, on émet les deux hypothèses suivantes : $H_0 : b_1 = 0$ et $H_1 : b_1 \neq 0$.

La statistique t_{calc} est calculée selon la formule (24).

$$t_{\text{calc}} = \frac{b_1}{s_{b_1}} \quad (24) \text{ (avec } s_{b_1}, \text{ l'écart-type sur la pente de la droite).}$$

Sa loi de probabilité est une loi de Student à $n-2$ degrés de liberté. Dans notre cas, nous avons 28 degrés de liberté. On rejette l'hypothèse H_0 au risque de 1% lorsque $t_{\text{calc}} \geq t_{0,995}(28)$.

$t_{0,995}(28)$ est déterminé par la table de Student et est égal à 2,76. Si l'hypothèse H_0 est rejetée, on conclut, au risque de 1%, à l'existence d'une liaison linéaire entre les variables.

Limite de détection [Amarouche, 2010]

La mesure de détection se calcule selon la formule (25)

$$LOD = 3 \times \frac{s_{b0}}{b_1} \text{ (25) (avec } s_{b0}, \text{ l'écart-type sur l'ordonnée à l'origine).}$$

Limite de quantification [Amarouche, 2010]

La mesure de quantification se calcule selon la formule (26)

$$LOQ = 10 \times \frac{s_{b0}}{b_1} \text{ (26)}$$

ANNEXE 7 : Principe DU TOC

La mesure du TOC est réalisée par un analyseur de carbone organique total de marque Shimadzu modèle TOC-V_{CSH}. Elle est réalisée par mesure du carbone organique non-purgeable (NPOC). Un schéma de principe est donnée dans la Fig.51. De l'acide chlorhydrique est ajouté à l'échantillon sous bullage d'air. Le carbone sous forme inorganique est transformé en CO₂ qui est purgé. Le carbone restant dans l'échantillon correspond au TOC, il est alors transformé en CO₂ par combustion dans un four à 720°C sur catalyseur, sous un flux d'air. Le débit d'air, la pression et l'humidité dans le four sont contrôlés. L'air chargé en CO₂ est évacué du four, refroidi et asséché. La quantité de CO₂ est alors mesurée par un détecteur infrarouge. Un étalonnage externe permet de calculer la quantité de carbone total en fonction de l'aire obtenue.

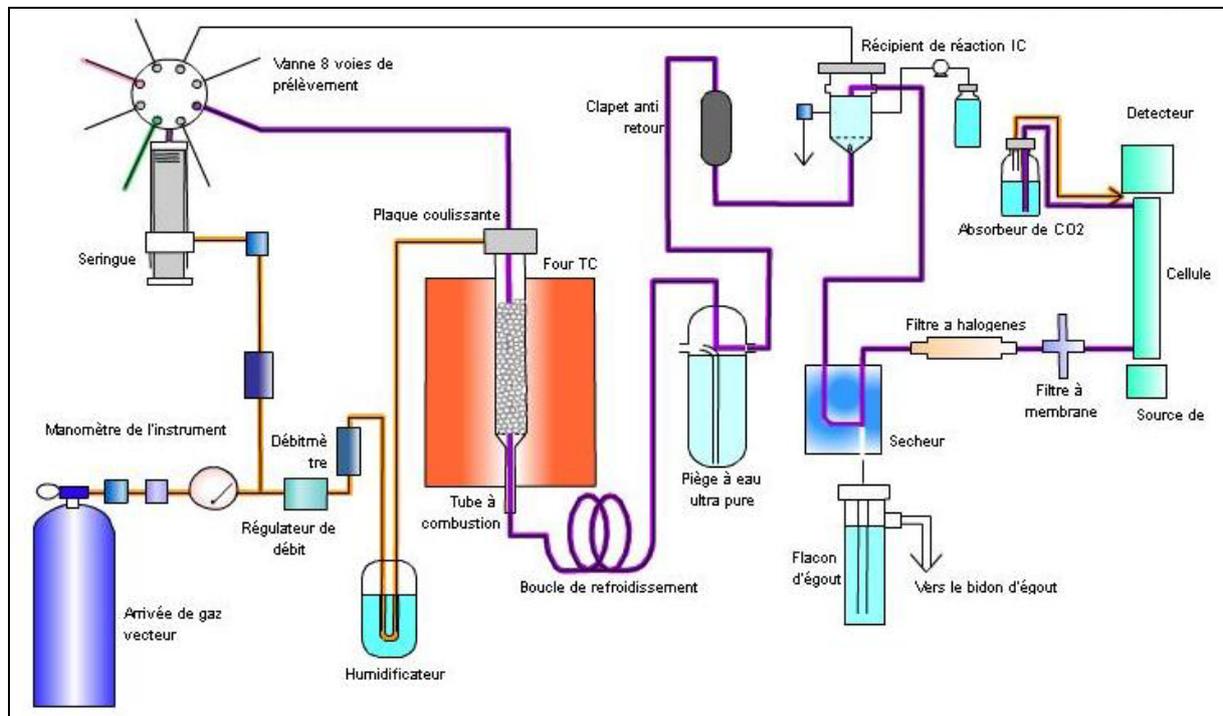


Fig.51 : Schéma d'un analyseur de carbone organique total [Shimadzu, 2001]

Il est calculé selon la relation (27) :

$$TOC = \frac{(C_{\text{soluté}} \times nbC \times M_c)}{M_{\text{soluté}}} \quad (27)$$

avec	TOC	Concentration en carbone organique total en mg _C / L ou ppm _C
	C _{soluté}	Concentration du soluté en mg / L
	nbC	Nombre de carbone dans la molécule
	M _c	Masse molaire d'un atome de carbone, soit 12 g / mol
	M _{soluté}	Masse molaire du soluté en g / mol

ANNEXE 8 : Le détecteur UV

Fonctionnement d'un détecteur UV

L'absorbance est reliée à la concentration d'un soluté par la loi de Beer-Lambert :

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda) \times l \times C \quad (28)$$

(avec ε , le coefficient d'extinction molaire propre à chaque molécule (L/mol/cm) et l , la largeur de la cellule (cm) et C , la concentration du milieu (mol/L⁻¹)).

Le méthanol, solvant couramment utilisé en LC et sa réponse en UV est quasiment nulle à partir de 205 nm.

Les systèmes LC ne donnent pas de réponse très stable aux alentours de 200 nm car ces conditions sont assez proches des limites d'utilisation du détecteur UV. En effet, la lampe au deutérium utilisé pour l'UV fonctionne dans un domaine de 190 nm à 400 nm.

Un spectre UV de l'acide valérique est donné dans la Fig.52.

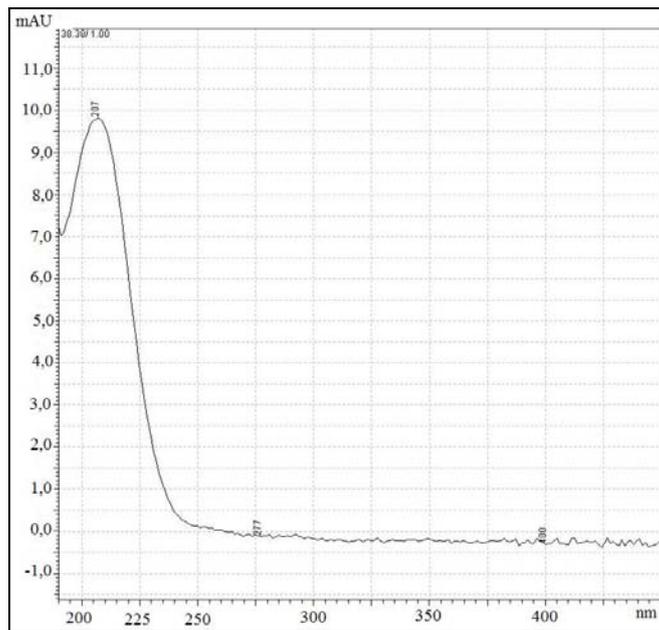


Fig.52 : Spectre UV de l'acide valérique à 500 mg/L

ANNEXE 9 : La chromatographie ionique [Eith, 2001]

La détection conductimétrique

La conductivité κ d'une solution est l'inverse de la résistance R qu'un liquide produit entre deux électrodes de surface A , placées à une distance L l'une de l'autre.

$$\kappa = \frac{L}{A \times R} \quad (29)$$

La conductivité équivalente Λ d'une solution peut être déterminée par l'équation.

$$\Lambda = \frac{\kappa}{C} \quad (30) \text{ (avec } C, \text{ la concentration).}$$

La conductivité d'un électrolyte est obtenue en additionnant les deux conductivités ioniques Λ^-_{anion} et $\Lambda^+_{\text{cation}}$.

$$\kappa = C \times (\Lambda^-_{\text{anion}} + \Lambda^+_{\text{cation}}) \quad (31)$$

(avec κ , la conductivité en S/cm, Λ , la conductivité limite en S.cm² et C , la concentration en mol/L).

La variation de conductivité provoquée par les analytes est proportionnelle à leur concentration dans l'éluant :

$$\Delta\kappa = \frac{(\Lambda_S - \Lambda_E) \times C_S}{1000} \quad (32)$$

où S et E représentent respectivement l'ion analyte et l'ion éluant.

Exemple :

L'acide acétique possède une conductivité limite de 41 S/cm² à 25°C. Le carbonate de l'éluant possède une conductivité limite de 69 S/cm² à 25°C

La conductivité du pic sans suppression est donc de :

$$\kappa_{pic} = C_{\text{analyte}} \times (\Lambda^-_{\text{CH}_3\text{COO}^-} - \Lambda^-_{\text{CO}_3^{2-}}), \text{ soit } \kappa_{pic} = -28 \times C_{\text{analyte}}$$

La suppression chimique

La phase mobile utilisée comprend les ions Na^+ , HCO_3^- et CO_3^{2-} et possède une conductance très élevée par rapport à celle des solutés. Un supprimeur est ajouté entre le conductimètre et la colonne afin de supprimer la conductance due à l'éluant. Ce supprimeur est une colonne cationique sous forme H^+ . Les ions Na^+ de la phase mobile vont venir s'échanger avec les ions H^+ de la colonne cationique. Nous avons donc des ions H^+ en solution. Ces derniers vont réagir avec les carbonates de l'éluant pour donner du CO_2 et de l'eau selon les réactions (33).



La conductance de l'éluant devient proche de 0. Il existe toujours une conductance résiduelle. Le supprimeur à lit fixe Metrohm (Fig.53) est une version rotative et possède 3 unités de suppression identique : l'une joue le rôle de supprimeur, la deuxième unité est régénérée, et la troisième est rincée avec de l'eau ultrapure. Les unités cationiques saturent après une analyse et doivent être régénérée par un passage d'acide sulfurique. Les ions Na^+ sont alors remplacés par des ions H^+ et un nouveau cycle peut s'opérer. Après réalisation d'une analyse, le barillet pivote de 120 degrés et l'unité rincée est utilisée comme supprimeur. De cette façon, on peut pratiquement travailler de manière continue.

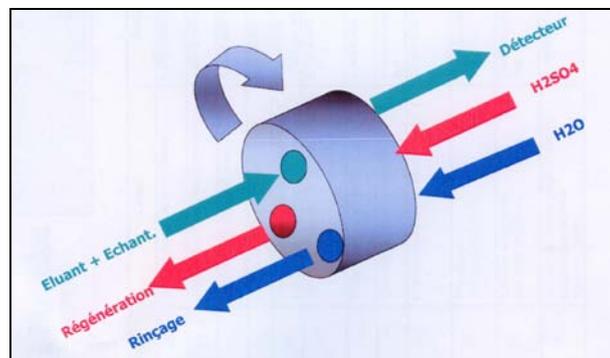


Fig.53 : Schéma du supprimeur à lit fixe Metrohm

Exemple :

Reprenons l'exemple de l'acide acétique. Si la suppression chimique de la conductivité de l'éluant (échange des ions éluants contre des H^+) est utilisée, la sensibilité est alors dépendante de la somme des conductivités équivalentes des anions analytes et des ions H^+ .

Avec suppression, la conductivité mesurée est de (avec $\Lambda_{\text{H}^+}^- = 350 \text{ S/cm}^2$) :

$$\kappa_{pic} = C_{analyte} \times (\Lambda_{\text{CH}_3\text{COO}^-}^- + \Lambda_{\text{H}^+}^+), \text{ soit } \kappa_{pic} = 391 \times C_{analyte}$$

En plus d'avoir supprimé la conductivité de l'éluant, la réponse de l'analyte est augmentée augmentant ainsi la sensibilité.

Annexe 10 : La chromatographie liquide de phase inversée

Hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT) et vitesse linéaire (u) optimales

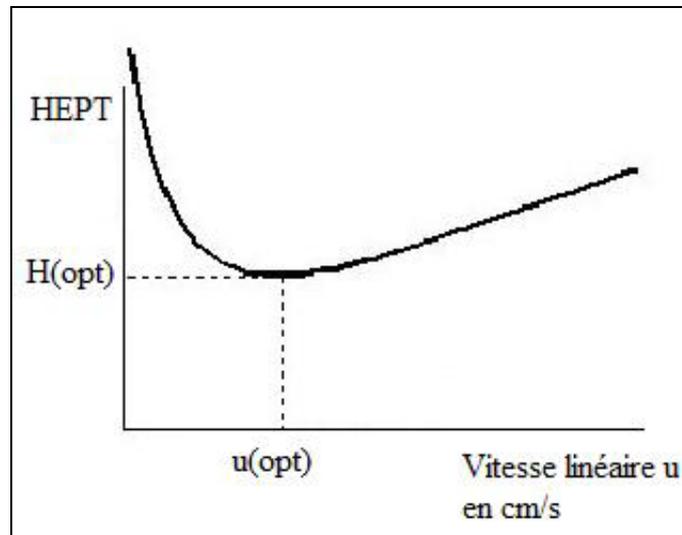


Fig.54 : Courbe de Van Deemter [Orsay, 2011]

La courbe de Van Deemter (Fig.54) donne la dépendance de la hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT) à la vitesse linéaire u en cm/s. Elle montre que l'on a pas intérêt à trop diminuer le débit de la phase mobile au-dessous de la valeur optimale u(opt) car la HEPT augmente rapidement et la résolution R_s se détériore très vite (via N) pour des valeurs faibles de u. Suivant la pente de la courbe après u(opt), un compromis peut être trouvé entre une vitesse d'analyse plus rapide sans une grande perte d'efficacité et de résolution.

On a la relation (34) :

$$H(\text{opt}) = 3d_p \quad (34)$$

(avec d_p , le diamètre des particules constituant la phase stationnaire).

Pour des particules de 5 μm , la vitesse linéaire optimale est de 0,1 cm/s. Pour des particules de 3 μm , la vitesse linéaire optimale est de 0,17 cm/s.

A partir de ces données, de la géométrie de la colonne et de la porosité ε , le temps mort, le volume mort, le débit optimal de travail et le nombre de plateaux théoriques peuvent être calculés.

Les caractéristiques des colonnes utilisées dans cette étude sont rappelées dans le Tableau XXIII.

Tableau XXIII : Caractéristiques des colonnes RP-LC utilisées

	Colonne Pyramid	Colonne HDO
Taille des particules (dp en μm)	5	3
Longueur (L en cm)	25	15
Diamètre interne (ID en cm)	0,46	0,3
Porosité (ϵ)	0,7	0,7

Calcul du temps mort théorique (pour la colonne Pyramid) :

$$t_m = \frac{L(\text{cm})}{u(\text{cm/s})} = \frac{25}{0,1} = 250\text{s} = 4,2 \text{ min}$$

Le temps mort théorique est donc de 4,2 min.

Calcul du volume mort théorique (pour la colonne Pyramid):

$$V_m = V_{col} (\text{cm}^3) \times \epsilon$$

$$\text{Soit } V_m = \frac{(\pi \times (ID)^2 \times \epsilon \times L)}{4} = 2,9\text{mL}$$

Le volume mort théorique est donc de 2,9 mL

Calcul du débit optimal théorique (pour la colonne Pyramid) :

$$D_{opt} = \frac{V_m}{t_m} = 0,7\text{mL}$$

Pour une colonne de longueur 25 cm, de diamètre interne 0,46 cm, le débit optimal de travail est de 0,7 mL/min.

Les mêmes calculs peuvent être effectués pour la colonne HDO. Le débit optimal obtenu est de 0,5 mL/min.

Calcul du nombre de plateaux théoriques

On a vu que H(opt) était égal à 3dp soit pour la colonne Pyramid possédant des particules de 5 μm de diamètre, une valeur de 15 μm . Pour la colonne HDO, H(opt) = 9 μm .

On sait que le nombre de plateaux théoriques N est égal à :

$$N = \frac{L(\text{cm})}{H(\text{cm})} = \frac{25}{(15 \times 10^{-4})} = 16700 \text{ plateaux théoriques avec la colonne Pyramid.}$$

$$N = \frac{L(\text{cm})}{H(\text{cm})} = \frac{15}{(9 \times 10^{-4})} = 16700 \text{ plateaux théoriques avec la colonne HDO.}$$

Les deux colonnes ont donc le même nombre de plateaux.

ANNEXE 11 : Détail des calculs pour ajustement du pH avec H₃PO₄ seul

[Garric, 1970]

Les équilibres	pKe	pK1	pK2	pK3
H ₂ O = H ⁺ + OH ⁻	14			
H ₃ PO ₄ = H ⁺ + H ₂ PO ₄ ⁻		2,2		
H ₂ PO ₄ ⁻ = H ⁺ + HPO ₄ ⁻⁻			7,2	
HPO ₄ ⁻⁻ = H ⁺ + PO ₄ ⁻⁻⁻				12,3

Rappel : pK = log (1/K)

Ke	K1	K2	K3
1,00E-14			
	0,00631		
		6E-08	
			5E-13

On a 4 équations correspondant aux 4 équilibres

$$K_e = [H^+][OH^-] \quad (35)$$

$$K_1 = [H^+][H_2PO_4^-]/[H_3PO_4] \quad (36)$$

$$K_2 = [H^+][HPO_4^{--}]/[H_2PO_4^-] \quad (37)$$

$$K_3 = [H^+][PO_4^{---}]/[HPO_4^{--}] \quad (38)$$

1 équation correspondant au bilan matière

$$C_0 = [H_3PO_4] + [H_2PO_4^-] + [HPO_4^{--}] + [PO_4^{---}] \quad (39)$$

1 équation correspondant à la neutralité électrique

$$[H^+] = [H_2PO_4^-] + 2[HPO_4^{--}] + 3[PO_4^{---}] + [OH^-] \quad (40)$$

Le pH est donné. On a donc 6 équations indépendantes et 6 inconnues :

C₀, [OH⁻], [H₃PO₄], [H₂PO₄⁻], [HPO₄⁻⁻] et [PO₄⁻⁻⁻]. On peut calculer C₀ correspondant.

(36), (37) et (38) injectées dans (39) donnent :

$$C_0 = [H_3PO_4] (1 + K_1/[H^+] + K_1K_2/[H^+]^2 + K_1K_2K_3/[H^+]^3) \quad (41)$$

On obtient [H₃PO₄] en injectant (35), (36) (37) et (38) dans (40) :

$$[H_3PO_4] = ([H^+] - K_e/[H^+]) / (K_1/[H^+] + 2K_1K_2/[H^+]^2 + 3K_1K_2K_3/[H^+]^3) \quad (42)$$

(42) dans (41) donne :

$$C_0 = ([H^+] - K_e/[H^+]) / (K_1/[H^+] + 2K_1K_2/[H^+]^2 + 3K_1K_2K_3/[H^+]^3) \quad (43)$$

$$\quad * (1 + K_1/[H^+] + K_1K_2/[H^+]^2 + K_1K_2K_3/[H^+]^3)$$

CONCLUSION

La masse m de solution H₃PO₄ 85 % à diluer dans 1 L pour avoir [H⁺] = 10^{-pH} est donc :

$$m = MC_0 * 100/85 \text{ avec} \quad M \text{ masse molaire de H}_3\text{PO}_4 = \quad 98$$

$$\text{soit } m = 100/85 * M * ([H^+] - K_e/[H^+]) / (K_1/[H^+] + 2K_1K_2/[H^+]^2 + 3K_1K_2K_3/[H^+]^3) \quad (44)$$

$$\quad * (1 + K_1/[H^+] + K_1K_2/[H^+]^2 + K_1K_2K_3/[H^+]^3)$$

Annexe 12 : Ajustement du pH, Application numérique [Garric, 1970]

Pour des pH entre 1,5 et 3, les masses d' H_3PO_4 à ajouter à 1 L d'eau et à 1L d'une solution tampon à 25mmol/L de NaH_2PO_4 sont données dans le Tableau XXIV.

Tableau XXIV : Ajustement du pH avec H_3PO_4 seul
et avec un mélange $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$

pH désiré	m(H_3PO_4) en g dans 1 L d'eau	m(H_3PO_4) en g dans 1 L de tampon NaH_2PO_4 à 25 mmol/L
1,5	21,92	36,36
1,6	14,43	25,90
1,7	9,57	18,69
1,8	6,42	13,66
1,9	4,35	10,10
2	2,98	7,55
2,1	2,07	5,70
2,2	1,45	4,34
2,3	1,04	3,33
2,4	0,749	2,57
2,5	0,547	1,99
2,6	0,405	1,55
2,7	0,303	1,21
2,8	0,229	0,952
2,9	0,174	0,749
3	0,134	0,590

Les concentrations en NaH_2PO_4 et Na_2HPO_4 pour avoir un pH compris entre 6 et 7 et une concentration du mélange à 10 mmol/L sont données dans le Tableau XXV.

Tableau XXV : Ajustement du pH
pour un mélange $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$

pH désiré	Concentration en NaH_2PO_4 en mol/L	Concentration en Na_2HPO_4 en mol/L
6	4,74E-04	9,53E-03
6,1	5,91E-04	9,41E-03
6,2	7,34E-04	9,27E-03
6,3	9,07E-04	9,09E-03
6,4	1,12E-03	8,88E-03
6,5	1,37E-03	8,63E-03
6,6	1,66E-03	8,34E-03
6,7	2,01E-03	7,99E-03
6,8	2,40E-03	7,60E-03
6,9	2,85E-03	7,15E-03
7	3,34E-03	6,66E-03

Annexe 13 : Effet et pouvoir tampon [Drillat, 1967 ; Garric, 1970]

1. Exemple de courbe de titrage d'un triacide faible H_3PO_4 par une base forte $NaOH$ à $25^\circ C$

Soit l'acide phosphorique H_3PO_4 en solution aqueuse de concentration molaire initiale c_0 à laquelle on ajoute de la soude, à raison de x moles de soude par mole d'acide. On admettra que l'addition de soude ne fait pas varier le volume, c'est-à-dire que la soude de la burette est concentrée par rapport à la solution contenue dans le bécher.

Les espèces dissoutes sont $[H^+]$, $[OH^-]$, $[H_3PO_4]$, $[H_2PO_4^-]$, $[HPO_4^{--}]$, $[PO_4^{---}]$ et $[Na^+]$ dont les concentrations sont liées par les équations suivantes :

- Conservation de l'élément phosphore P

$$c_0 = [H_3PO_4] + [H_2PO_4^-] + [HPO_4^{--}] + [PO_4^{---}] \quad (39)$$

- Conservation de l'élément sodium Na

$$[Na^+] = xc_0 \quad (46)$$

- Neutralité électrique

$$[H^+] + [Na^+] = [OH^-] + [H_2PO_4^-] + 2[HPO_4^{--}] + 3[PO_4^{---}] \quad (47)$$

- Les quatre équilibres ioniques

$$K_1 = \frac{[H^+][H_2PO_4^-]}{[H_3PO_4]} \quad (48)$$

$$K_2 = \frac{[H^+][HPO_4^{--}]}{[H_2PO_4^-]} \quad (49)$$

$$K_3 = \frac{[H^+][PO_4^{---}]}{[HPO_4^{--}]} \quad (50)$$

$$K_e = [H^+][OH^-] \quad (51)$$

L'expression analytique de la fonction donnant le nombre de moles x de soude versées par mole d'acide, à volume constant en fonction de la concentration en protons $[H^+]$, obtenue par réarrangements des Eqs. (1-7), est la suivante :

$$x = \frac{1}{c_0} \left(\frac{K_e}{[H^+]} - [H^+] \right) + \frac{\left(\frac{K_1}{[H^+]} + \frac{2K_1K_2}{[H^+]^2} + \frac{3K_1K_2K_3}{[H^+]^3} \right)}{\left(1 + \frac{K_1}{[H^+]} + \frac{K_1K_2}{[H^+]^2} + \frac{K_1K_2K_3}{[H^+]^3} \right)} \quad (52)$$

Il est clair que cette fonction dépend du paramètre c_0 qui est la concentration molaire initiale d'acide phosphorique.

La courbe de titrage représente l'évolution du pH de la solution en fonction du nombre de moles x de soude versées par mole d'acide. Les graphes des courbes de titrage de l'acide phosphorique aux deux concentrations molaires initiales $c_0 = 10$ et 50 mmol.L^{-1} sont représentés Fig. 55.

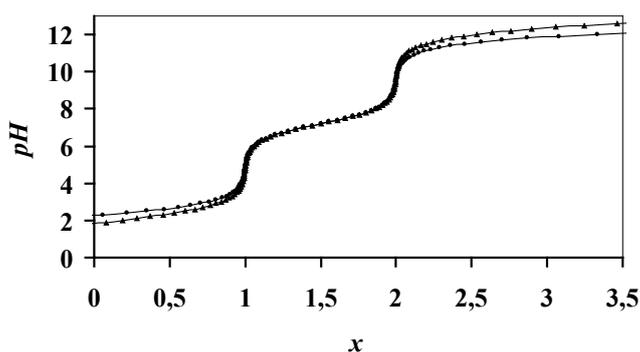


Fig.55 : Titrage de H_3PO_4 par NaOH . (●) : $c_0 = 10 \text{ mmol.L}^{-1}$; (▲) $c_0 = 50 \text{ mmol.L}^{-1}$.

Les courbes de titrage de la Fig.55 permettent de déterminer, aussi précisément que possible, les deux points d'équivalence correspondant à $x = 1$ et $x = 2$ où les anions H_2PO_4^- et HPO_4^- et le cation Na^+ sont dans les proportions stoechiométriques des sels de formule NaH_2PO_4 et Na_2HPO_4 . Pour les deux concentrations c_0 , ces deux points d'équivalence $x = 1$ et $x = 2$ correspondent aux pH de 4,8 et 9,5, respectivement, valeurs à rapprocher de celles données par les relations classiques indépendantes de c_0 : $\text{pH}_{x=1} = (\text{pK}_1 + \text{pK}_2)/2$ et $\text{pH}_{x=2} = (\text{pK}_1 + \text{pK}_2)/2$.

2. Effet et pouvoir tampon

L'examen des courbes de titrage de la Fig.55 montre que dans la région moyenne centrée sur le point de demi-équivalence $x = 1,5$ ($\text{pH} = \text{pK}_2 = 7,2$), le pH varie peu par addition de base et n'y dépend pas de la concentration de l'acide. On a ainsi un moyen de fabriquer une solution dont le pH soit en quelque sorte stabilisé, en neutralisant à trois demi l'acide faible H_3PO_4 par la soude ou, ce qui revient au même, en mélangeant de façon équimolaire l'acide faible NaH_2PO_4 et son sel de base forte Na_2HPO_4 .

Quantitativement, on définit un pouvoir tampon :

$$\tau = \frac{dx}{dpH} \quad (53)$$

La Fig.56 montre l'évolution du pouvoir tampon en fonction du nombre de moles x de soude versées par mole d'acide pour les deux concentrations molaires initiales d'acide considérées.

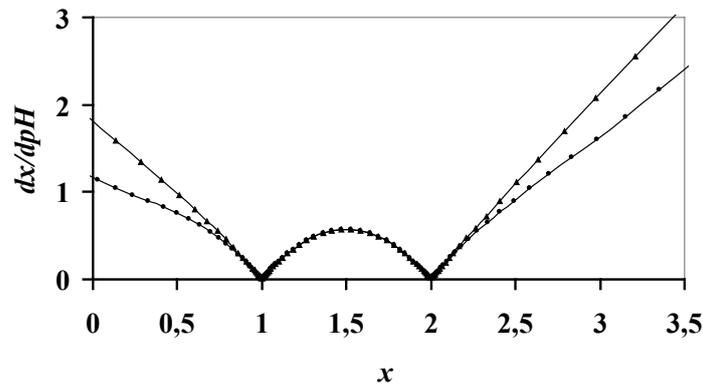


Fig.56 : Pouvoir tampon dans le titrage de H_3PO_4 par NaOH .

(\bullet) : $c_0 = 10 \text{ mmol.L}^{-1}$; (\blacktriangle) $c_0 = 50 \text{ mmol.L}^{-1}$.

On vérifie bien que, dans la région des x compris entre 1 et 2, le pouvoir tampon ne dépend pas de la concentration initiale c_0 de l'acide et varie peu avec x dans le voisinage de son maximum obtenu pour $x = 1,5$.

En dehors de l'intervalle $x = [1,2]$, il n'est pas envisageable d'espérer obtenir quelque solution tampon.

3. Importance des solutions tampons

Certaines réactions et techniques analytiques requièrent des conditions de pH bien déterminées, tout en consommant de plus des protons. Il est ainsi extrêmement avantageux de pouvoir fournir des protons sans que la concentration en ions H^+ libre varie : c'est le propre d'un mélange tampon de pouvoir les fournir dans ces conditions.

Annexe 14 : Détail des calculs pour ajustement du pH avec un mélange

H₃PO₄/NaH₂PO₄ [Garric, 1970]

Pour une concentration en NaH₂PO₄ de 25 mmol/L.

1 équation correspondant au bilan matière

$$[H_3PO_4]_0 + [NaH_2PO_4]_0 = [H_3PO_4] + [H_2PO_4^-] + [HPO_4^{2-}] + [PO_4^{3-}] \quad [54]$$

1 équation correspondant à la neutralité électrique

$$[H^+] + [Na^+]_0 = [H_2PO_4^-] + 2[HPO_4^{2-}] + 3[PO_4^{3-}] + [OH^-] \quad (55)$$

Le pH est donné. On a donc 6 équations indépendantes et 6 inconnues :

[H₃PO₄], [OH⁻], [H₃PO₄], [H₂PO₄⁻], [HPO₄²⁻] et [PO₄³⁻]. On peut calculer C₀ correspondant.

(36), (37) et (38) injectées dans (54) donnent :

$$[H_3PO_4]_0 + [NaH_2PO_4]_0 = [H_3PO_4] (1 + K_1/[H^+] + K_1K_2/[H^+]^2 + K_1K_2K_3/[H^+]^3) \quad (56)$$

On obtient [H₃PO₄] en injectant (35), (36) (37) et (38) dans (55) :

$$[H_3PO_4] = ([H^+] - K_e/[H^+] + [Na^+]_0) / (K_1/[H^+] + 2K_1K_2/[H^+]^2 + 3K_1K_2K_3/[H^+]^3) \quad (57)$$

(58) dans (57) donne :

$$[H_3PO_4]_0 = -[NaH_2PO_4]_0 + ([H^+] - K_e/[H^+] + [Na^+]_0) / (K_1/[H^+] + 2K_1K_2/[H^+]^2 + 3K_1K_2K_3/[H^+]^3) (1 + K_1/[H^+] + K_1K_2/[H^+]^2 + K_1K_2K_3/[H^+]^3) \quad (58)$$

CONCLUSION

La masse m de solution H₃PO₄ 85 % à diluer dans 1 L pour avoir [H⁺] = 10^{-pH} est donc :

$$m = MC_0 \cdot 100 / 85 \text{ avec} \quad M \text{ masse molaire de H}_3\text{PO}_4 = 98$$

$$\text{soit } m = 100/85 \cdot M \cdot [- [NaH_2PO_4]_0 + ([H^+] - K_e/[H^+] + [Na]_0) / (K_1/[H^+] + 2K_1K_2/[H^+]^2 + 3K_1K_2K_3/[H^+]^3) (1 + K_1/[H^+] + K_1K_2/[H^+]^2 + K_1K_2K_3/[H^+]^3)] \quad (59)$$

Annexe 15 : Mise en solution d'un tensioactif [Arnaud, 1996 ; Moore, 1972 ; Souchay, 1964]

Miscibilité de liquides moléculaires. Solvation

Pour que deux liquides se mélangent de façon homogène pour donner une solution, il faut que les forces entre molécules différentes soient au moins égales à celles entre molécules identiques (Ex. H₂O-ROH par liaison hydrogène). En général, les liquides polaires se mélangent mieux entre eux qu'avec des liquides non polaires (Ex. H₂O-HC). La dissolution d'un composé sera possible s'il y a des interactions assez fortes entre les molécules ou ions dissous et les molécules de solvant.

En conséquence, les substances ioniques se dissolvent surtout dans des liquides polaires (Ex. NaCl-H₂O). Cette attraction entre ions chargés et molécules polaires (dipôles électriques) est suffisamment forte pour former des associations stables de telle sorte que l'ion dissous est entourée de molécules de solvant liées qui se déplacent avec lui. Cette association est appelée solvation.

Types de solution

Il y a lieu de faire la distinction entre les solutions vraies et les solutions colloïdales :

- Dans les solutions vraies, le soluté (substance dissoute minoritaire) est dispersé à l'état de particules de très petite taille (< 1 nm) dans le solvant (milieu dispersif majoritaire) ;
- Dans les solutions colloïdales, les particules sont plus grandes, une certaine hétérogénéité apparaissant au fur et à mesure que la taille croît.

Caractères de solubilité

Les propriétés des substances sont liées aux types de liaison présents dans les molécules. Ainsi, de manière générale, la solubilité obéit à la règle suivante : les composés fortement polaires, ou ioniques, sont solubles dans les solvants polaires, alors que les composés à caractère covalent prédominant sont solubles dans les solvants peu ou pas polaires.

Solvants polaires et non polaires

Concernant le mécanisme d'une dissolution, à l'origine, avant toute action réciproque, il y a attraction entre particules individuelles du soluté et du solvant. La plupart de ces forces d'attraction sont de nature électrostatique. Si l'on met un solide dans un liquide, pour qu'il y ait solubilisation, il faut que le liquide sépare les différentes particules solides les unes des autres. De plus, il faut que les particules provenant du solide écartent les molécules du liquide pour

s'y disperser. Le processus est le même lorsque l'on dissout un liquide ou un gaz dans un liquide, l'énergie nécessaire pour effectuer la première étape étant d'autant plus forte que le soluté est plus condensé.

- Solvants polaires. Dans les solvants polaires, il existe de fortes liaisons intermoléculaires. Pour vaincre ces liaisons, il faut que le soluté présente une affinité pour le solvant au moins aussi forte que les molécules de solvant entre elles. Une substance non polaire ne pourra pas vaincre les forces d'attraction intermoléculaires d'un solvant polaire. Une substance polaire pourra présenter des forces d'attraction avec le solvant, et donc, éventuellement, s'y dissoudre.

- Solvants non polaires. Les solvants non polaires sont soumis à de faibles forces de liaison intermoléculaires et sont peu susceptibles d'en présenter avec des substances polaires. Un solvant non polaire pourra difficilement séparer des particules polaires réunies entre elles. Deux substances non polaires tendent à se dissoudre par effet d'entropie (accroissement du désordre). D'après ces remarques, on voit qu'il y a plusieurs possibilités pour l'état du soluté dans le solvant : (i) dispersion simple avec aucune action sur le solvant (composés non polaires) ; (ii) interaction avec le solvant avec mise en jeu de forces dites de solvatation. Le soluté est dit solvaté. L'intensité de ces forces (de nature électrostatique) peut être telle que cette interaction aboutit à une réaction soluté-solvant, l'entité en solution étant alors différente du produit de départ (solubilisation des acides forts dans l'eau).

Les colloïdes

Parmi les intermédiaires entre la dispersion grossière d'un solide dans un liquide (précipité au sein d'une solution) et la molécule simple en solution (solution vraie), se placent les particules colloïdales, de taille < 100 nm (cette limite étant loin d'être absolue), forme sous laquelle le soluté, solide ou liquide, est dispersé. Plutôt que solution colloïdale, on parlera de suspensions ou dispersions colloïdales. En effet, ces "solutions", qui paraissent homogènes à l'état macroscopique, sont hétérogènes au niveau atomique.

En ce qui concerne la structure, on distingue :

- Les colloïdes moléculaires qui sont des macromolécules simples dont les atomes sont réunis par des forces de valence (Ex. polymères) ;

- Les colloïdes micellaires qui ne sont pas des grosses molécules mais qui sont formés par l'agrégation en micelles de petites molécules réunies entre elles par les forces de Van der Waals. Cette catégorie sera développée par la suite ;

- Les sols qui sont constitués de nanoparticules colloïdales solides suspendues dans un liquide, voire un gaz (on parlera alors d'aérosols).

Les colloïdes micellaires

Dans cette structure, le soluté correspond à des molécules amphiphiles ou tensioactives (surfactant en anglo-saxon) constituées d'une partie hydrophile (ou lipophile) ionique, chargée positivement ou négativement (tête), qui présente de l'affinité pour l'eau et d'une partie lipophile (ou hydrophobe) qui a de l'affinité pour les milieux organiques (queue).

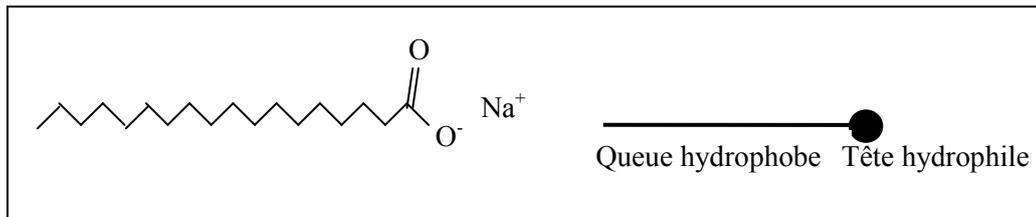


Fig.57 : Stéarate de sodium $C_{17}H_{35}COONa$

Considérons la mise en solution d'un tensioactif dans un solvant polaire (Ex. H_2O), possédant une interface macroscopique avec une phase différente, gaz (air), liquide (huile) ou solide (salissure). A des concentrations inférieures à la *concentration micellaire critique* (cmc), les macromolécules de tensioactif sont dispersées individuellement. Celles-ci se concentrent aux interfaces entre la solution liquide et l'autre phase, leurs têtes hydrophiles étant tournées vers la solution, les queues hydrophobes tendant au contraire à en sortir. A la *concentration micellaire critique*, les molécules de tensioactif forment un film monomoléculaire ordonné comme si les molécules étaient rangées en rang d'oignons. Aux concentrations supérieures à la cmc, il se constitue d'autre part dans la solution des micelles, c'est-à-dire des agglomérats de quelques dizaines à quelques centaines de molécules tournant leur tête hydrophile vers l'extérieur coté solvant. On peut faire une microémulsion stable en ajoutant dans l'eau de l'huile qui ira au centre des micelles. Aux concentrations très élevées, ces agglomérats peuvent se présenter sous forme d'édifices plus importants, à géométrie cylindrique, voire structure lamellaire, par exemple. En cas de structures ordonnées, on parle de cristaux liquides.

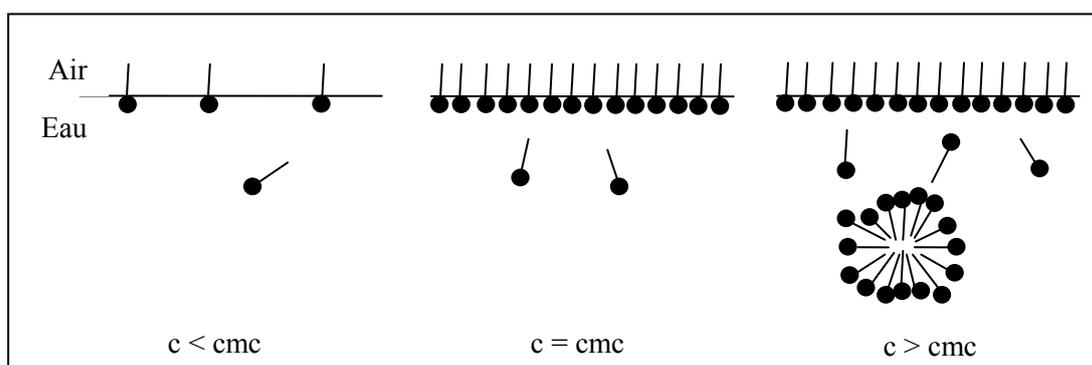


Fig.58 : Mise en solution d'un tensioactif dans un solvant polaire et cmc

Comme conséquence importante, la tension superficielle γ de la solution diminue de façon linéaire de γ_{H_2O} à γ_{cmc} lorsque la concentration de tensioactif augmente de zéro à la cmc puis présente un plateau au-delà, de faible valeur (γ_{cmc}).

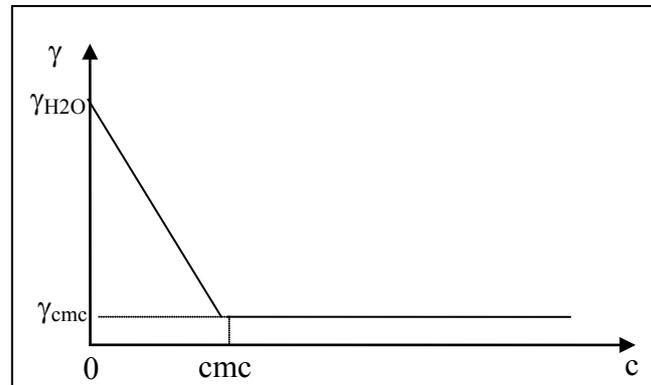


Fig. 59 : Courbe tension superficielle $\gamma = f(c)$

Contre-ions

Dans les solutions colloïdales, les particules en suspension peuvent être chargées ou non. Soit par exemple des nanoparticules colloïdales de silice dans l'eau. La silice possède un point de charge zéro $pH_{PCZ} = 1,5-3$ tel que :

- Pour un $pH < pH_{PCZ}$ de la solution, obtenu par exemple par ajout de HCl, les charges positives H^+ viennent s'adsorber de manière immobile sur les particules, provoquant ainsi une redistribution des ions de la solution : les anions Cl^- , majoritaires, tendent à s'accumuler autour de la particule pour satisfaire à l'électroneutralité de l'ensemble. Il s'agit des contre-ions qui restent libres de se déplacer par mouvement brownien et former une couche diffuse de moins de 1 nm à quelques nm.
- Pour un $pH > pH_{PCZ}$ de la solution, obtenu par exemple par ajout d'ammoniac, des charges négatives viennent s'adsorber fixement sur les particules et les ions ammonium NH_4^+ constituent les contre-ions dans la solution.
- Pour le $pH = pH_{PCZ}$ de la solution, la charge globale des particules est nulle (autant de charges positives que de charges négatives).

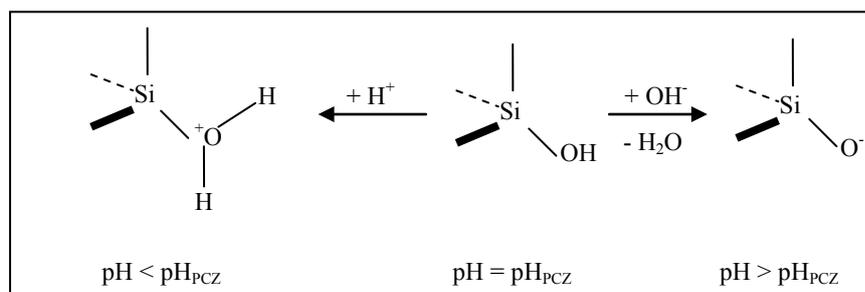


Fig. 60 : Contre-ions et point de charge zéro pH_{PCZ}

En conséquence, l'ensemble des charges adsorbées fixes sur la particule et l'ensemble des contre-ions constituant une couche diffuse autour de la particule du fait du mouvement brownien au sein de la solution constitue la *double couche électrique*, qui est un "pseudocondensateur", avec le gradient de concentration suivant lorsque l'on s'écarte de la surface de la particule dans la couche double :

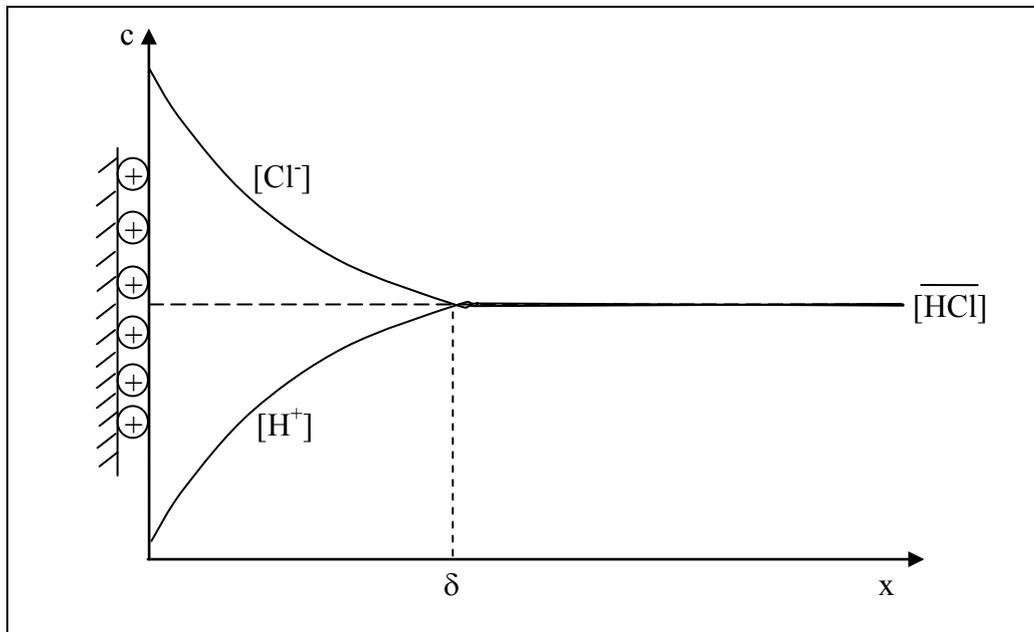


Fig.61 : Nanoparticule colloïdale de silice dans une solution aqueuse de HCl à pH = 0

L'ajout d'un électrolyte indifférent de type sel métallique par exemple (NaCl), indifférent parce que ne modifiant pas les charges adsorbées et donc le potentiel (quelques mV) en surface des nanoparticules, permet de contrebalancer sur une épaisseur plus fine l'excès de charges des particules.

Annexe 16 : Détail des calculs pour un ajustement du pH avec

NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ [Garric, 1970]

Pour un mélange à 10 mmol/L

1 équation correspondant au bilan matière

$$[\text{H}_2\text{PO}_4^-]_0 + [\text{HPO}_4^{2-}]_0 = x + y = [\text{H}_3\text{PO}_4] + [\text{H}_2\text{PO}_4^-] + [\text{HPO}_4^{2-}] + [\text{PO}_4^{3-}] \quad [60]$$

1 équation correspondant à la neutralité électrique

$$[\text{H}^+] + [\text{Na}^+]_0 = [\text{H}^+] + x + 2y = [\text{H}_2\text{PO}_4^-] + 2[\text{HPO}_4^{2-}] + 3[\text{PO}_4^{3-}] + [\text{OH}^-] \quad (61)$$

On veut un pH égal à 6,5. On a 6 équations indépendantes et 7 inconnues :
[NaH₂PO₄]₀, [Na₂HPO₄]₀, [OH⁻], [H₃PO₄], [H₂PO₄⁻], [HPO₄²⁻] et [PO₄³⁻].
On pourra calculer x et y si on donne S (Eq. 11).

(36), (37) et (38) injectées dans (60) donnent :

$$x + y = [\text{H}_3\text{PO}_4] (1 + K_1/[\text{H}^+] + K_1K_2/[\text{H}^+]^2 + K_1K_2K_3/[\text{H}^+]^3) \quad (61)$$

En injectant (35), (36) (37) et (38) dans (61), on obtient :

$$x + 2y + [\text{H}^+] = K_e/[\text{H}^+] + [\text{H}_3\text{PO}_4](K_1/[\text{H}^+] + 2K_1K_2/[\text{H}^+]^2 + 3K_1K_2K_3/[\text{H}^+]^3) \quad (62)$$

(63) divisé par (62) donne :

$$y = (x + y) \frac{(K_1/[\text{H}^+] + 2K_1K_2/[\text{H}^+]^2 + 3K_1K_2K_3/[\text{H}^+]^3)}{[(1 + K_1/[\text{H}^+] + K_1K_2/[\text{H}^+]^2 + K_1K_2K_3/[\text{H}^+]^3) - 1] - [\text{H}^+] + K_e/[\text{H}^+]} \quad (63)$$

$$x = \Sigma - y \quad [64]$$

Annexe 17: Principe d'un injecteur split [Rouessac, 2009]

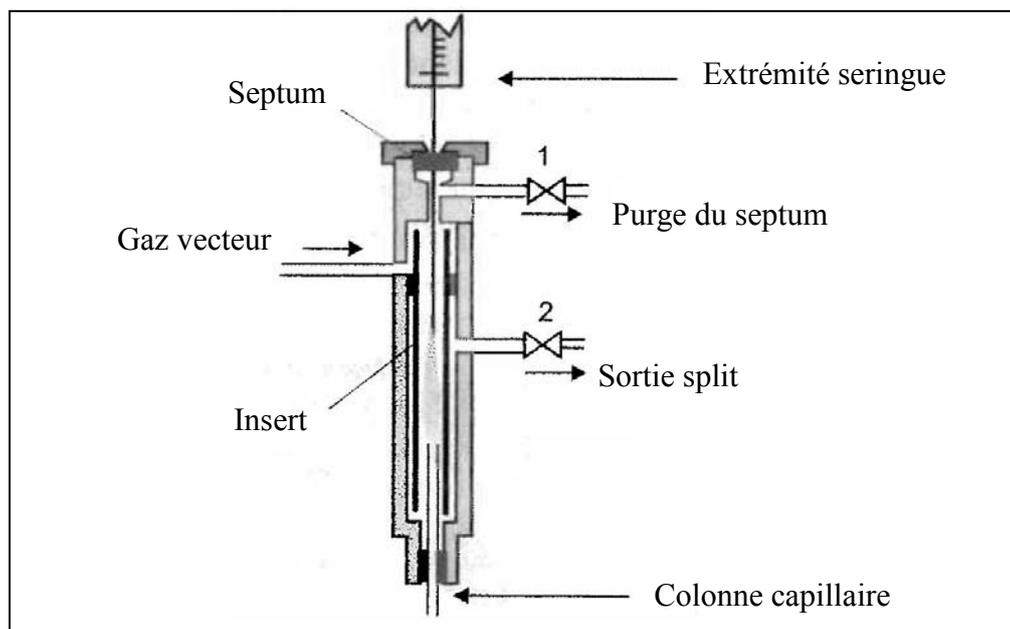


Fig.62 : Schéma d'un injecteur split [Rouessac, 2009]

Un schéma d'un injecteur split est présenté sur la Fig.62. L'aiguille de la seringue vient percer un septum en élastomère bouchant l'entrée de l'injecteur. Le gaz vecteur, le diazote (N₂) arrive avec un débit important dans la chambre de vaporisation (insert) où il est mélangé à l'échantillon injecté. La température de cette chambre dépend de la volatilité des échantillons à analyser. Ce débit est ensuite divisé en deux fractions. La plus importante, appelée la fuite, est évacuée par la sortie split de l'injecteur en entraînant la majeure partie de l'échantillon introduit. L'autre partie est injectée dans la colonne et contient une petite fraction de l'échantillon, égale au rapport de division. On a la relation :

$$\text{Rapport de division} = (\text{débit sortie split} + \text{débit sortie colonne}) / (\text{débit sortie colonne}).$$

La purge du septum élimine les produits volatils émis par le septum.

Les caractéristiques pour notre GC sont données dans le Tableau XXVI.

Tableau XXVI: Conditions opératoire sur l'injecteur split
(Colonne L=30m, ID=0.32mm, df 0.25 μm)

Pression (kPa)	37
Débit total (mL/min)	24
Débit colonne (mL/min)	1
Vitesse linéaire (cm/s)	20
Débit de purge (mL/min)	3
Split ratio	20

Références Bibliographiques

[Abalos, 2000], ABALOS, M., BAYONA, J.M., PAWLISZYN, J., Development of a headspace solid-phase microextraction procedure for the determination of free volatile fatty acids in waste waters, *Journal of chromatography A*, 2000, 873, 107-115.

[Abe, 2010], ABE, E., GRASSIN, S., ALVAREZ, D., ALVAREZ, J.C., Extraction liquide-liquide : théorie, applications, difficultés, *Annales de Toxicologies Analytiques*, 2010, 22(2), 51-59.

[Afnor, 1999], AFNOR, Qualité de l'eau, Protocole d'évaluation d'une méthode alternative d'analyse physico-chimique quantitative par rapport à une méthode de référence, NF XP T 90-210, Paris, France : AFNOR, 1999, 56p.

[Albert, 1997], ALBERT, D.B, MARTENS, C.S, Determination of low-moleclular-weight organic acid concentrations in seawater and pore-water samples via HPLC, *Marine Chemistry*, 1997, 56, 27-37.

[Amarouche, 2010], AMAROUCHE, S., Caractérisation d'une méthode de mesure : étape clé dans le processus de validation, Paris, France : Editions techniques de l'ingénieur, 2010, 13p.

[Arnaud, 1981], ARNAUD, C., Chimie Organique, 3^{ème} édition, Paris, France : Masson, 1981, 138p. (Memo-guides).

[Arnaud, 1993], ARNAUD, P., Cours de chimie physique, 3^{ème} édition, Paris, France : Dunod, 1993, 531p.

[Arnaud, 1996], ARNAUD, P., Chimie Organique – Cours, 16^{ème} édition, Paris, France : Dunod, 1996, 530p.

[Arpino, 2007], ARPINO, P., Couplages chromatographiques avec la spectrométrie de masse. I, Paris, France : Editions techniques de l'ingénieur, 2007, 17p.

[Banel, 2011], BANEL, A., WASIELEWSKA, M., ZYGMUNT, B., Application of headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry to determine short-chain alkane monocarboxylic acids in aqueous samples, *Analytical and bionalytical chemistry*, 2011, 399, 3299-3303.

[Béziat, 1999], BEZIAT, J.C., BESSON, M., GALLEZOT, P., DURECU, S., Catalytic wet air oxidation on Ru/TiO₂ catalyst in a trickle-bed reactor, *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 1999, 38, 1310-1315.

[Bruzzoniti, 1997], BRUZZONITI, M.C., MENTASTI, E., SARZANINI, C., HAJOS, P., Ion chromatographic separation of carboxylic acids – Prediction of retention data, *Journal of chromatography A*, 1997, 770, 13-22.

[Burgot, 2003], BURGOT, G., PELLERIN, F., Microextraction en phase solide (SPME), Paris, France : Editions Techniques de l'ingénieur, 2003, 20p.

[Carrier, 2009], CARRIER, M., BESSON, M., GUILLARD, C., GONZE, E., Removal of herbicide diuron and thermal degradation products under Catalytic Wet Air Oxidation conditions, *Applied Catalysis B*, 2009, 91, 275-283.

[Caude, 1994], CAUDE, M., JARDY, A., *Chromatographie en phase liquide / Théorie et méthode de séparation*, Paris, France : Editions Techniques de l'ingénieur, 1994, 47p.

[Chen, 2006], CHEN., S.F., MOWERY, R.A., CASTLEBERRY, V.A., VAN WALSUM, G.P., CHAMBLISS, C.K., High-performance liquid chromatography method for simultaneous determination of aliphatic acid, aromatic acid and neutral degradation products in biomass pretreatment hydrolysates, *Journal of chromatography A*, 2006, 1104, 54-61.

[Chi, 2005], CHI, F.H., LIN, P.H.P., LEU, M.H, Quick determination of malodor-causing fatty acids in manure by capillary electrophoresis, *Chemosphere*, 2005, 60, 1262-1269.

[Chi, 2007], CHI, G.T., HUDDERSMAN, K.D., Novel ion chromatography technique for the rapid identification and quantification of saturated and unsaturated low molecular weight organic acids formed during the Fenton oxidation of organic pollutants, *Journal of chromatography A*, 2007, 1139, 95-103.

[Cote, 1998], COTE, G., *Extraction liquide-liquide – Présentation générale*, Paris, France : Editions Techniques de l'ingénieur, 1998, 8p.

[Cruwys, 2002], CRUWYS, J.A., DINSDALE, R.M., HAWKES, F.R., HAWKES, D.L., Development of a static headspace gas chromatographic procedure for the routine analysis of volatile fatty acids in wastewater, *Journal of chromatography A*, 2002, 945, 195-209.

[Destendreau, 2005], DESTANDEAU, E., VIAL, J., JARDY, A., HENNION, M.C., BONNET, D. LANCELIN, P., Development and validation of a reversed-phase liquid chromatography method for the quantitative determination of carboxylic acids in industrial reaction mixtures, *Journal of Chromatography A*, 2005, 1088, 49-56.

[Dodouche, 2010], DODOUCHE, I., LE DU, M., DESCORME, C., BESSON, M., Faisabilité de l'oxydation par voie humide contrôlée des résidus gras issus de l'assainissement pour la production d'AGV, Livrable D3, ANR VALORIA – Programme PRECODD 2008, 2010, 28p.

[Drillat, 1967], DRILLAT, J., TORRES, L., KLAEBE, A., VALLINO, M., *Chimie générale*, Paris, France : Armand Colin, 1967, 120p.

[Eith, 2001], EITH, C., KOLB, M., SEUBERT, A., VIEHWEGER, K.H., *Practical Ion Chromatography, An introduction*, Herisau, Suisse : Metrohm Ltd., 2001, 160p.

[Fisher, 1995] FISHER, K., BIPP, H.P., BIENIEK, D., KETTRUP, A., Determination of monomeric sugar and carboxylic acids by ion exclusion chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1995, 361-373.

[Fisher, 2002], FISHER, K., Environmental analysis of aliphatic carboxylic acids by ion-exclusion chromatography, *Analytica Chimica Acta*, 2002, 465, 157-173.

- [Garric, 1970], GARRIC, M., Cours de chimie, Tome 1, Paris, France : Dunod, 1970, 576p.
- [Glod, 1997], GLOD, B.K., Ion exclusion chromatography: Parameters influencing retention, *Neurochemical Research*, 1997, 22(10), 1237-1248.
- [Grob, 1989], GROB Jr., K., ZHANGWAN, L., Introduction of water and water-containing solvent mixtures in capillary gas chromatography : I. Failure to produce water-wettable precolumns (retention gaps), *Journal of chromatography*, 1989, 473, 381-390.
- [Husek, 1998], HUSEK, P., Chloroformates in gas chromatography as general purpose derivatizing agents, *Journal of chromatography B*, 1998, 717, 57-91.
- [Jurado, 2010], JURADO-SANCHEZ, B., BALLESTEROS, E., GALLEGO, M., Determination of carboxylic acids in water by gas chromatography using several detectors after flow preconcentration, *Journal of chromatography A*, 2010, 1217, 7440-7447.
- [Kibler, 1999], KIBLER, M., BACHMANN, K., New derivatization method for carboxylic acids in aqueous solution for analysis by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection, *Journal of chromatography A*, 1999, 836, 325-331.
- [Kolb, 2006], Kolb, B., ETTRE, L.S., *Static HS-Gas chromatography – Theory and Practice*, 2nd Edition, Hoboken, USA : John Wiley and Sons Inc., 2006, 320p.
- [Lagunas, 2010], LAGUNAS-ALLUE, L., MARTINEZ-SORIA, M.T., SANZ-ASENSIO, J., SALVADOR, A., FERRONATO, C., CHOVELON, J.M., Photocatalytic degradation of boscalid in aqueous titanium dioxide suspension: identification of intermediates and degradation pathways, *Applied catalysis B: Environmental*, 2010, 98, 122-131.
- [MacGinnis, 2001], MACGINNIS, B.D., ADAMS, V.D., MIDDLEBROOKS, E.J., Degradation of ethylene glycol using Fenton's reagent and UV, *Chemosphere*, 2001, 45, 101-108.
- [Moore, 1972], MOORE, W.J., *Physical Chemistry*, 4^{ème} édition, Englewood Cliffs, USA : Prentice-Hall Inc., 1972, 977p.
- [Morin, 2007], MORIN-COULLIER, E., BLETON, J., LAMELOISE, M.L., TCHAPLA, A., Quantification of deformed peaks in gas chromatography (CGC): Application to simultaneous analysis of free fatty acids and less polar compounds in aqueous distillery effluent, *Analytica Chimica Acta*, 2007, 583, 259-265.
- [Ng, 2000], NG, L.K., LAFONTAINE, P., HARNOIS, J., Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of acids and phenols in distilled alcohol beverages – Application of anion-exchange disk extraction combined with in-vial elution and silylation, *Journal of chromatography A*, 2000, 873, 29-38
- [Nollet, 2006], PELDSZUS, S., Chapter 13 – Organic acids, *In Chromatographic Analysis of the Environment*, Vol.93, 3rd Edition, Boca Reaton, USA : Taylor and Francis Group, 2006, 453p.

[Ohta, 2003], OHTA, K., OHASHI, M., JIN, J.Y., TAKEUCHI, T., FUJIMOTO, C., CHOI, S.H., RYOO, J.J., LEE, K.P., Separation of aliphatic carboxylic acids and benzenecarboxylic acids by ion-exclusion chromatography with various cation-exchange resin columns and sulfuric acid as eluent, *Journal of chromatography A*, 2003, 997, 117-125.

[Pan, 1997], PAN, L., PAWLISZYN, J., Derivatization/Solid-phase microextraction: new approach to polar analytes, *Analytical chemistry*, 1997, 69, 196-205.

[Papet, 2010], PAPET, Y., BRUNET, B., MURA, P., Headspace (HS) et micro-extraction en phase solide (SPME). Théorie et applications, *Annales de Toxicologies Analytiques*, 2010, 22(2), 75-79.

[Pham Minh, 2007] PHAM MINH, D., AUBERT, G., GALLEZOT, P., BESSON, M., Degradation of olive mill effluents by catalytic wet air oxidation: 2-oxidation of p-hydroxyphenylacetic and p-hydroxybenzoic acids over Pt and Ru supported catalysts, *Applied catalysis B: environmental*, 2007, 73, 236-246.

[Quitain, 2002], QUITAIN, A.T., FAISAL, M., KANG, K., DAIMON, H., FUJIE, K., Low-molecular-weight carboxylic acids produced from hydrothermal treatment of organic wastes, *Journal of Hazardous Materials*, 2002, B96, 209-220.

[Robert, 2009], ROBERT-PEILLARD, F., PALACIO-BARCO, E., DUDAL, Y., COULOMB, B., BOUDENNE, J.L., Alternative spectrofluorimetric determination of short-chain volatile fatty acids in aqueous samples, *Analytical chemistry*, 2009, 81, 3063-3070.

[Rotzsche, 1991], ROTZSCHE, H., Stationary phases in gas chromatography, Vol.48, Amsterdam, Pays-Bas : Elsevier Science Publishers B.V., 1991, 424p. (Journal of chromatography library).

[Rouessac, 2009], Rouessac, F., Rouessac, A., CRUCHE, D., DUVERGER-ARFUSO, C., MARTEL, A., *Analyse Chimique, Méthodes et techniques instrumentales*, 7ème édition, Paris, France : Dunod, 2009, 511p.

[Scott, 1992], SCOTT, R.P.W., *Liquid chromatography column theory*, Chichester, England : John Wiley and sons, 1992, 279p. (Separation science series).

[Shimadzu, 2001], Shimadzu, TOC-V_{CSH/CSN} - Total Organic Carbon Analyser - User's manual, Kyoto, Japon : Shimadzu, 2001, 306p.

[Serpone, 2005], SERPONE, N., MARTIN, J., HORIKOSHI, S., HIDAKA, H., Photocatalysed oxidation and mineralization of C1-C5 aliphatic acids in UV-irradiated aqueous titania dispersions-kinetics, identification of intermediates and quantum yields, *Journal of photochemistry and photobiology A : Chemistry*, 2005, 169, 235-251.

[Sleiman, 2007], SLEIMAN, M., CONCHON, P., FERRONATO, C., CHOVELON, J.M., Iodosulfuron degradation by TiO₂ photocatalysis: kinetic and reactional pathway investigations, *Applied catalysis B: environmental*, 2007, 71, 279-290.

[Souhay, 1964], SOUCHAY, P., *Thermodynamique chimique*, 2ème édition, Paris, France : Masson, 1964, 578p.

[Tanaka, 1979], TANAKA, K., ISHIZUKA, T., Elution behaviour of acids in ion-exclusion chromatography using a cation-exchange resin, *Journal of Chromatography*, 1979, 174, 153-157.

[Tenenhaus, 2007], TENENHAUS, M., *Statistique – Méthodes pour décrire, expliquer et prévoir*, Paris, France : DUNOD, 2007, 679p.

[Tranchant, 1996], TRANCHANT, J., *Chromatographie en phase gazeuse*, Paris, France : Editions Techniques de l'ingénieur, 1996, 27p.

[Tedetti, 2006], TEDETTI, M., KAWAMURA, K., CHARRIERE, B., CHEVALIER, N., SEMPERE, R., Determination of low molecular weight dicarboxylic and ketocarboxylic acids in seawater samples, *Analytical chemistry*, 2006, 78, 6012-6018.

[Weiss, 2004], WEISS, J., *Handbook of Ion Chromatography*, Vol.1, 3rd Edition, Weinheim, Germany : Wiley-VCH, 2004, 547p.

[Wells, 1999], WELLS, R.J., Recent advances in non-silylation derivatization techniques for gas chromatography, *Journal of chromatography A*, 1999, 843, 1-18.

[Wittmann, 2000], WITTMANN, G., VAN LANGENHOVE, H., DEWULF, J., Determination of acetic acid in aqueous samples, by water-phase derivatisation, solid-phase microextraction and gas chromatography, *Journal of chromatography A*, 2000, 874, 225-234.

[Zhan, 2010], ZHAN, J., HUANG, Y., SONG, Z., CAO, X., YE, B., Solid phase extraction and high performance liquid chromatography for determination of glyoxilic acid in a selective oxidation reaction, *Analytical Letters*, 2010, 43, 1834-1845.

Documents électroniques

[BGB, 2007], BGB, BGB – Chromatography is our business, 2007, disponible sur : < <http://www.bgb-analytik.de/pdf/BGB%202007.pdf> > (consulté le 15/04/2011).

[Interchim, 2005], Interchim, 2005, Horizons nouveaux – Agilent Technologies, disponible sur : < http://www.interchim.com/interchim/Nouveaux_Horizons/NH_Special-Agilent_02-05/HN_Interchrom.htm > (consulté le 23/04/2011).

[Macherey, 2007], Macherey-Nagel, 2007, Pour une solution claire...extraction sur phase solide Chromabond, disponible sur : < <ftp://ftp.mn-net.com/francais/Chromatographie/SPE/Br.SPE.FR.pdf> > (consulté le 15/03/2011).

[Macherey2, 2007], Macherey-Nagel, 2007, Catalogue Chromatographie Liquide, disponible sur : < ftp://ftp.mn-net.com/francais/Chromatographie/Cat.Chromatography_06FR/3_HPLC.pdf > (consulté le 15/03/2011).

[Macherey, 2009], Macherey-Nagel, 2009, NUCLEODUR® high purity silica phases for HPLC, disponible sur : < <http://www.mn-net.com/tabid/7085/default.aspx> > (consulté le 23/04/2011).

[Orsay, 2011], Faculté des sciences d'Orsay, 2011, Cours de chromatographie – Master de chimie 1^{ère} année, disponible sur : < <http://www.masterchimie1.u-psud.fr/Chromatoweb/optimisation.html> > (consulté le 03/06/2011)

[Registech, 2000], Registech, 2000, GC derivatization, disponible sur : < <http://www.registech.com/Library/gcderrev.pdf> > (consulté le 01/03/2011).

[Registech, 2008], Registech, 2008, Ultrapure Ion Pairing Reagents and Buffers, disponible sur : < http://www.registech.com/Library/Catalog/Ion_Pairing_2008.pdf > (consulté le 08/03/2011).

[Supelco, 1998], Supelco, 1998, Bulletin 910 : Guide to solid phase extraction, disponible sur : < <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf> > (consulté le 16/03/2011).

[UAkron, 2010], University of Akron, 2010, The chemical Database, disponible sur : < <http://ull.chemistry.uakron.edu/erd> > (consulté le 20/04/2011).

[UNL, 2011], University of Nebraska-Lincoln, 2011, Undergraduate Instrumentation Center, disponible sur : < <http://www.chem.unl.edu/uic/gc-fid.shtml> > (consulté le 14/05/2011).

[Varian, 1999], Varian, 1999, Combi PAL SPME Manual, disponible sur : < <http://alkianalytical.com/resources/Combi+SPME+manual.pdf> > (consulté le 12/03/2011).