

Améliorations récentes dans l'analyse des ions par électrophorèse capillaire

Ph. Morin

Institut de Chimie Organique et Analytique, CNRS UPRES-A 6005, Université d'Orléans, BP. 6759, 45067 Orléans Cedex 2, France

Capillary electrophoresis (CE) is now considered as a mature analytical technique for the quantitative separation of inorganic and organic ions. Indirect UV detection is generally employed but other interesting and sensitive modes of detection have been developed among them direct UV detection, indirect fluorimetry and conductimetry.

However, practical improvements concern both a better understanding of buffer composition and particularly, the need of selecting suitable buffer co-ion according to the analytes and also the capability of capillary electrophoresis to analyze matrix samples by complexation mechanism or sample pretreatment.

Introduction

L'électrophorèse capillaire est une méthode d'analyse désormais reconnue en raison de ses qualités intrinsèques : efficacité de pic comprise généralement entre 100 et 400 000 plateaux théoriques, résolution élevée, simplicité de la composition du tampon électrophorétique, conditionnement aisé du capillaire, rapidité et automatisation des séparations, faible consommation d'échantillons et de tampons en général dénués de solvants organiques, utilisation possible de nombreux détecteurs (spectrométrie d'absorbance UV, fluorimétrie, conductométrie et couplage prometteur avec la spectrométrie de masse). Elle est complémentaire par rapport aux autres techniques séparatives (en particulier chromatographiques) ce qui de plus en plus permet de valider des méthodes de façon croisée. La séparation des ions en électrophorèse capillaire en milieu libre est basée sur la différence de vitesse électrophorétique de ces ions lorsqu'ils sont soumis à un champ électrique élevé. Son champ d'application comprend tout naturellement l'analyse des ions inorganiques et organiques dont le principe a été expliqué en détail dans une première revue [1]. Aussi, seules les améliorations de l'électrophorèse capillaire depuis 1994 sont mentionnées dans cet article et principalement dans les deux domaines suivants :

- la nécessité de sélectionner le co-ion du tampon selon la nature des ions analysés,

- la possibilité d'analyser des échantillons complexes (présence de matrices ioniques ou disparités entre les concentrations des ions analysés) en suscitant des réactions de complexation *in-situ* ou par prétraitement de l'échantillon.

Rappels

Si la plupart des séparations d'ions en électrophorèse capillaire s'effectuent en utilisant une détection spectrométrique UV par diminution d'absorbance (ou indirecte), d'autres détecteurs ont été utilisés parmi lesquels on peut citer la détection fluorimétrique indirecte, la conductométrie ou la spectrométrie d'absorbance directe. Le tableau I rassemble quelques applications de séparations ioniques réalisées depuis 1994 par électrophorèse capillaire avec les tampons correspondants [1-23]. Une bibliographie plus complète de l'électrophorèse ionique peut être trouvée dans les références [1-2].

Quel que soit le détecteur utilisé, le tampon électrophorétique doit avoir les caractéristiques suivantes :

- le co-ion du tampon doit avoir une mobilité électrophorétique proche de celles des ions à analyser afin de minimiser l'élargissement du pic électrophorétique par dispersion due à l'électromigration,
- le contre-ion doit assurer un bon pouvoir tampon au pH de travail,
- en mode de détection dit indirect, le co-ion du tampon doit posséder un groupement chromophore (détecteur spectrométrique UV) ou fluorophore (détecteur fluorimétrique),
- en mode de détection direct, le tampon ne doit pas absorber à la longueur d'onde d'absorbance des ions analysés (détection spectrométrique),
- le tampon doit être de faible conductivité afin de minimiser l'effet Joule dans le capillaire de séparation.

En électrophorèse capillaire, rappelons que la dispersion d'un pic par électromigration est causée par la perturbation du champ électrique causée, localement dans le tampon, par le passage d'une zone du soluté, en raison d'une différence de conductivité avec la zone du tampon ; ceci induit une dispersion de la vitesse de migration des ions analysés dont la mobilité effective est différente de celle du co-ion du

Tableau I. Quelques exemples de séparations d'ions inorganiques et organiques par électrophorèse capillaire selon plusieurs modes de détection [3-23].

<i>Ions</i>	<i>Mode de détection</i>	<i>Tampon</i>	<i>Réfs.</i>
acides phosphoniques	UV mode indirect	acide sorbique 5 mM, NaOH, décamethonium 0,1 mM, pH 6 [3] acide sorbique 5 mM, hydroxylamine 1,6 mM, polybrène 0,2 %, pH 6 [4]	
acides inorganiques et organiques		acide pyridine-2, 6 dicarboxylique 5 mM, CTAB 0,1 mM, pH 5,6 [5]	
acides inorganiques		K ₂ Cr ₂ O ₇ 5 mM, TEA 1,6 mM, décamethonium 0,1 mM, pH 8 [6]	
acides inorganiques et organiques		acide <i>para</i> -aminobenzoïque 20 mM, Ba(OH) ₂ 0,4 mM, TTAH 70 µM, pH 9,6 [7]	
anions inorganiques		Na ₂ CrO ₄ 4 mM, H ₃ BO ₃ , OFM-OH* 0,5 mM, pH 8 [8]	
cations inorganiques		comparaison de plusieurs cations chromophores (voir Fig. 2) [9]	
cations inorganiques		imidazole 10 mM, CH ₃ COOH pH 4,5, éther-couronne 18-C-6 [10,12]	
cations inorganiques et de métaux de transition		imidazole 10 mM, éther-couronne 18-C-6 0,5 mM, acide lactique 5 mM, pH 4,5 [11]	
cations inorganiques dans matrice sodium		imidazole 5 mM, (pH ajusté avec H ₂ SO ₄), pH 3 [13]	
cations métalliques		imidazole 10 mM, acide glycolique 13 mM, pH 4 [14]	
Fe (II), Fe (III) + o-phénanthroline + EDTA		borate de sodium 100 mM, pH 9,2 [15]	
chloride, sulfate, molybdate	conductométrie	CHES 50 mM, LiOH 20 mM, Triton X-100 à 0,03 %, pH 9,2 [16]	
cations inorganiques		Histidine/MES 30 mM, 18-C-6 2 mM, pH 6,1 [17]	
surfactants anioniques		Na ₂ HPO ₄ 5 mM, pH 9,1 [17]	
Br ⁻ , I ⁻ , CrO ₄ ²⁻ , NO ₃ ⁻ , BrO ₃ ⁻ , ClO ₃ ⁻	UV mode direct (200 nm)	phosphate 20 mM, pH 8 [18]	
NO ₃ ⁻ dans les fluides biologiques	UV mode direct (214 nm)	phosphate 1,6 g/L, NaCl 1,4 g/L, PEG 8000 1 g/L [19]	
Li ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺ , Ba ²⁺ , Cu(II), Zn(II), Mn(II), Fe(III)	fluorimétrie indirecte 488/520 nm	Na ₂ B ₄ O ₇ 2,5 mM, fluorescéine-Na 10 µM, pH 9,2 ou EDTA 5 mM, pH 7 [20-21]	
Cl ⁻ , NO ₃ ⁻ , NO ₂ ⁻ , SO ₄ ²⁻ , oxalate, F ⁻ , citrate, acides gras (C7-C18), acides carboxyliques C1-C12, <i>n</i> -alcane- sulfonates C5-C10	fluorimétrie indirecte 488/520nm	H ₃ BO ₃ 100 mM/Na ₂ B ₄ O ₇ 20 mM, fluorescéine 80 µM, TTAB 10 µM [22-23] Na ₂ B ₄ O ₇ 5 mM, pH 9,2/EtOH 60/40, fluorescéine 10 µM Na ₂ B ₄ O ₇ 5 mM, fluorescéine 10 µM, pH 9,2	

* Produit breveté et commercialisé par WATERS.

tampon électrophorétique. D'après la fonction de régulation de Kohlrausch, on montre que l'efficacité de pic est optimale lorsque la mobilité de l'ion analysé est identique à celle du co-ion.

La plupart des ions inorganiques n'ont pas de groupements chromophores ou présentent des coefficients d'absorptivité molaire trop faibles si bien que la détection spectrométrique indirecte est mise en œuvre. Son principe repose sur le déplacement d'une substance ionique (le co-ion) du tampon par l'ion analysé et peut être mise en œuvre avec la spectrométrie U.V. ou la fluorimétrie. Le co-ion de l'électrolyte doit avoir une charge de même signe que les ions analysés, présenter une forte absorbance, une mobilité voisine de celles des ions analysés et enfin sa concentration ne doit pas induire une absorbance supérieure à la limite du domaine de linéarité du détecteur. La sensibilité de détection dépend du coefficient d'absorbance et de la concentration du co-ion. La relation théorique développée par Ackermans [24] montre que dans le cas d'un électrolyte AB (dont le co-ion A absorbe en UV et le contre-ion B n'absorbe pas), la diminution d'absorbance ΔA_i obtenue pour un ion i s'écrit :

$$\Delta A_i = \varepsilon_A l k_i C_i \quad [1]$$

où ε_A représente le coefficient d'absorptivité molaire de A, l la longueur effective du trajet optique, C_i la concentration de l'ion i et k_i le coefficient de réponse de l'ion i .

Ainsi, la diminution d'absorbance ΔA_i augmente avec le coefficient d'absorptivité molaire ε_A du co-ion A mais demeure indépendante de la concentration de A. La réponse obtenue est différente pour chaque soluté et est fonction des valeurs absolues des mobilités absolues des ions i , A et B. Enfin, la possibilité d'utiliser la même espèce absorbante pour la détection indirecte simultanée d'anions et de cations a été étudiée [25-26].

Analyse des cations inorganiques

Détection indirecte

Spectrométrie

Dans la littérature, un grand nombre de composés basiques (généralement des hétérocycles azotés) absorbant dans le domaine UV ont été testés parmi lesquels l'imidazole, les composés UV-Cat 1 et UV-Cat 2 (brevet Waters), la pyridine, la *para*-aminopyridine, le cation phényl-triméthylammonium, l'éphédrine et la naphtyl-1 amine. Le tableau II indique les mobilités électrophorétiques, le coefficient d'absorptivité molaire et la longueur d'onde d'absorbance maximale de ces différents cations. Très récemment, Aupiais [9] a comparé différents tampons lors de la séparation de 39 cations alcalins, alcalino-terreux, cations de métaux de transition ou cations de lanthanides. Les paramètres sélectionnés ont été le facteur d'asymétrie du pic électrophorétique ainsi que la sensibilité de détection (Fig. 1). Selon ces résultats, il est préférable d'utiliser un tampon électrophorétique à base d'imidazole ou d'UV Cat-2 pour séparer des cations alcalins et alcalino-terreux, la pyridine pour les cations des métaux de transition, l'éphédrine ou l'UV Cat1 pour les lanthanides légers et la naphtyl-1 amine ou le phényltriméthylammonium pour les lanthanides lourds (Fig. 2). Ainsi, la sensibilité de détection peut être améliorée d'un facteur 1 à 4 en sélectionnant correctement le co-ion du tampon. Dans le cas où l'ion analysé a une mobilité électrophorétique supérieure à celle du co-ion, un gain identique peut être obtenu en ajoutant un agent complexant de l'ion analysé afin de réduire sa mobilité électrophorétique et limiter ainsi la dispersion due à l'électromigration.

D'autre part, certains ions ont une mobilité électrophorétique proche (citons parmi les plus connus les cations ammonium et potassium, baryum et plomb, les cations métalliques divalents ou enfin les lanthanides). Dans de tels cas,

Tableau II. Principaux cations chromophores utilisés en EC avec une détection spectrométrique indirecte [9].

chromophore	pKa	mobilité électrophorétique ($10^{-5} \text{ cm}^2/\text{V s}$)	coefficient d'absorbance à 214 nm ($\text{l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
imidazole	7,15	52	5000
UV Cat 2*	—	64	—
pyridine	5,25	51	1800
créatinine	4,83	37,2	9200
UV Cat 1*	—	35	—
éphédrine	9,54	30	7000
phényltriméthyl ammonium	—	31	—
naphtyl-1amine	3,92	17	50 000

* Produit breveté et commercialisé par Waters [30].

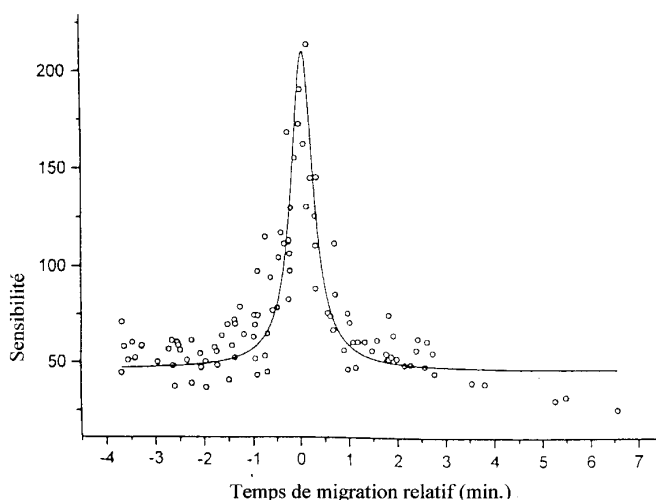


Figure 1. Variation de la sensibilité de détection des cations inorganiques en fonction de leur temps de migration normalisé [9]. Conditions opératoires : capillaire de silice fondue (60 cm $\times$ 75 μ m, longueur utile 52 cm) ; tampon : co-ion chromophore 5 mM, HIBA (0 – 10 mM), pH 4,4 (ajusté avec HNO_3) ; température : non contrôlée ; tension appliquée : 20 kV ; injection hydrostatique : 30 s à 10 cm de hauteur ; détection à 185 nm.

l'addition au tampon électrophorétique d'un agent de complexation (généralement anionique ou neutre) permet de modifier sélectivement la mobilité électrophorétique de certains ions. Plusieurs agents complexants ont été testés et les plus probants sont l'acide α -hydroxy-isobutyrique, l'acide lactique, l'acide tartrique et enfin les éther-couronnes 18-C-6 ou 15-C-5. Le plus utilisé est sans doute l'éther couronne 18-C-6, qui est un complexant du cation potassium [10] ; ainsi, la sélectivité entre les cations ammonium et potassium peut être contrôlée par la concentration de l'éther-couronne. La figure 3 montre que si une concentration d'éther-couronne 18-C-6 égale à 2,5 mM permet l'analyse d'un mélange de cations alcalins et alcalino-terreux ayant des concentrations du même ordre de grandeur, une concentration de 35 mM (voire 250 mM) est nécessaire dans le cas d'échantillons ayant une matrice potassium ou ayant une forte proportion de potassium par rapport aux autres cations. Toutefois, l'analyse d'échantillons contenant des cations alcalins, alcalino-terreux et des cations de métaux de transition requiert l'addition d'un second agent complexant afin de contrôler la sélectivité des cations métalliques. Ainsi, François et al. [11] ont modifié le tampon imidazole en y ajoutant l'éther-couronne 18-C-6 et l'acide lactique pour réussir la séparation rapide et bien résolue de 17 cations inorganiques (en quatre minutes) puis leur quantification (Fig. 4).

Il a été mentionné dans la littérature [27] que la séparation d'ions de mobilités très différentes pouvait être réalisée en ajoutant plusieurs co-ions chromophores dans le tampon ; toutefois, il semble que le gain en sensibilité n'est réelle-

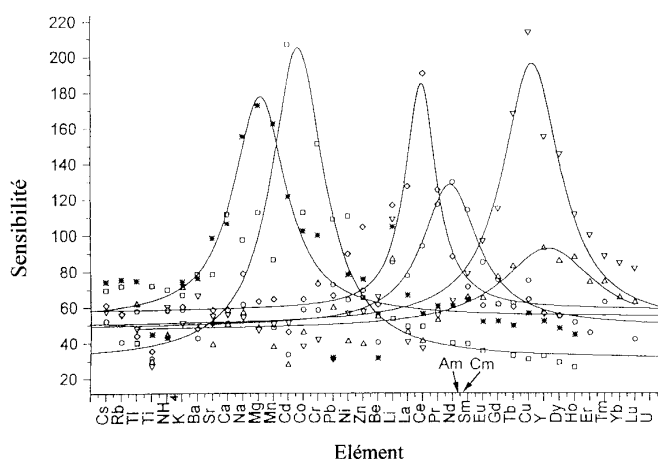


Figure 2. Variation de la sensibilité de détection d'un cation inorganique selon le co-ion chromophore sélectionné [9]. Conditions opératoires : capillaire de silice fondue (60 cm $\times$ 75 μ m, longueur utile 52 cm) ; tampon : co-ion chromophore 5 mM, HIBA (0 – 10 mM), pH 4,4 (ajusté avec HNO_3) ; température : non contrôlée ; tension appliquée : 20 kV ; injection hydrostatique : 30 s à 10 cm de hauteur ; détection à 185 nm. Nature du co-ion : $\square$ pyridine ; $\circ$ éphédrine ; Δ naphtyl-1 amine ; ∇ phényltriméthylammonium ; $\diamond$ UV Cat 1 ; * imidazole.

ment effectif que pour les ions appartenant à une fenêtre de migration très étroite autour de chaque co-ion.

Fluorimétrie

La fluorescence laser est un mode de détection très sensible et spécifique en électrophorèse capillaire. Des premiers résultats sont apparus sur l'analyse des cations alcalins, alcalino-terreux et de métaux de transition complexés négativement par l'EDTA en mode de détection indirecte [20-21]. En particulier, les potentialités du sel de sodium de la fluorescéine pour générer le signal de fond ont été prouvées. La sensibilité du système de détection (quelques dizaines de ppb) est d'autant plus grande que la force ionique du milieu électrophorétique est plus faible, conduisant à utiliser des tampons électrophorétiques très dilués ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 2,5 mM).

Détection directe par conductométrie

Ce mode de détection est basé sur la différence de conductivité entre les zones de l'ion analysé et celle du co-ion. Les tampons sont plus concentrés que ceux utilisés avec une détection spectrométrique indirecte, ce qui améliore la capacité du tampon. Les sensibilités de détection les plus élevées (environ dix fois plus qu'en spectrométrie indirecte) sont obtenues lorsque le tampon est constitué d'un co-ion peu mobile et d'un contre-ion très mobile [28]. Un mélange standard de cations alcalins, alcalino-terreux et d'amines organiques est séparé avec un tampon Hist/MES à pH 6,1 (Fig. 5) ; comme attendu, l'éther couronne 18-C-6 améliore la séparation entre les cations potassium et ammonium [17].

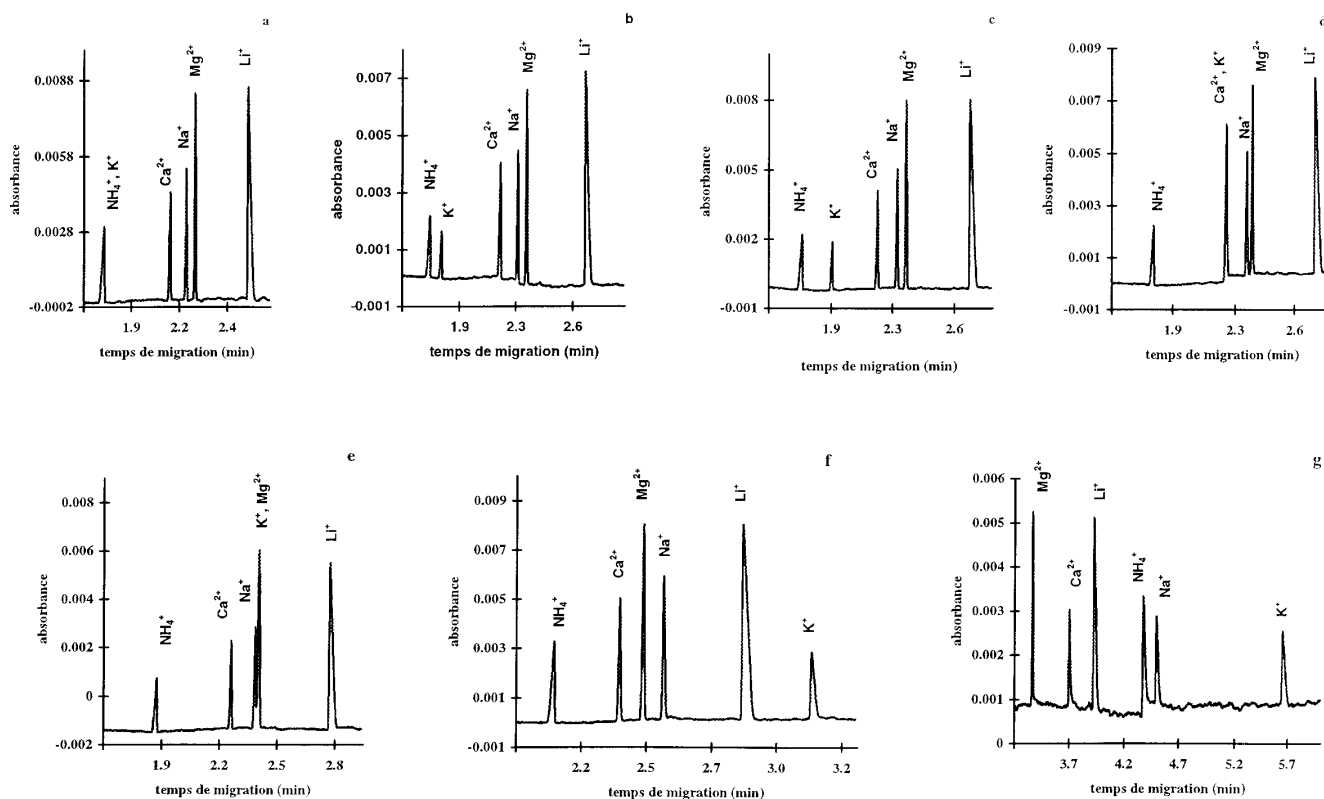


Figure 3. Variation de l'ordre de migration des cations inorganiques selon la concentration en éther-couronne 18-C-6 ajouté au tampon imidazole [10]. Conditions opératoires : capillaire de silice fondue (57 cm $\times$ 75 μ m, longueur utile 50 cm) ; tampon : imidazole 10 mM, éther-couronne 18-C-6, pH 4,5 ; température : 25 $^{\circ}$ C ; tension appliquée : 30 kV ; injection hydrodynamique : 2 s ; détection à 214 nm ; cations (5 ppm) : 1. ammonium ; 2. potassium ; 3. calcium ; 4. sodium ; 5. magnésium ; 6. lithium. Concentration en éther-couronne 18-C-6 (mM) : a) 0,01 ; b) 1 ; c) 2,5 ; d) 7 ; e) 10 ; f) 35 ; g) 300.

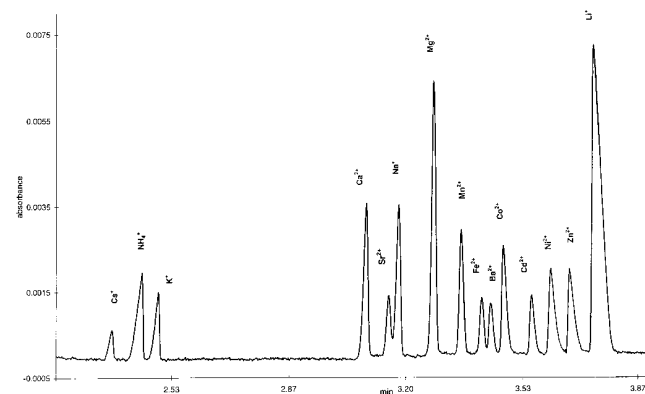


Figure 4. Séparation d'un mélange de 17 cations inorganiques en électrophorèse capillaire avec un tampon imidazole modifié par l'ajout d'éther-couronne 18-C-6 et d'acide lactique [11]. Conditions opératoires : capillaire de silice fondue (57 cm $\times$ 75 μ m, longueur utile 50 cm) ; tampon : imidazole 10 mM, éther-couronne 18-C-6 0,5 mM ; acide lactique 5 mM, pH 4,5 ; température : 30 $^{\circ}$ C ; tension appliquée : 20 kV ; injection hydrodynamique : 2 s ; détection à 214 nm ; concentrations des cations : 5 ppm sauf césium et plomb (10 ppm) et baryum et cuivre (20 ppm).

Analyse des anions organiques et inorganiques

La séparation des anions en électrophorèse capillaire nécessite un tampon contenant non seulement un co-ion de mobilité voisine de celle des anions mais aussi un composé chimique afin d'inverser le flux électroosmotique. En effet, la rapidité de l'analyse et la détection de tout anion quelle que soit sa mobilité électrophorétique nécessite l'inversion du flux électroosmotique. Pour ce faire, la charge de surface de la silice, initialement négative en raison de l'ionisation des groupements silanols dès que le pH est supérieur à 2, devient positive suite à l'adsorption de molécules de tensioactifs cationiques ajoutés au tampon. Plusieurs tensioactifs ont été testés avec succès (Tab. III) parmi lesquels le bromure de tétradécylammonium ou TTAB [16-17,21-23], le bromure de cétyltriméthylammonium ou CTAB [5], le bromure d'hexaméthonium [10] ou un polymère cationique comme le polybrène [3-4]. D'un point de vue pratique, soit le tensioactif est ajouté au tampon électrophorétique, soit le capillaire est rincé entre deux analyses consécutives.

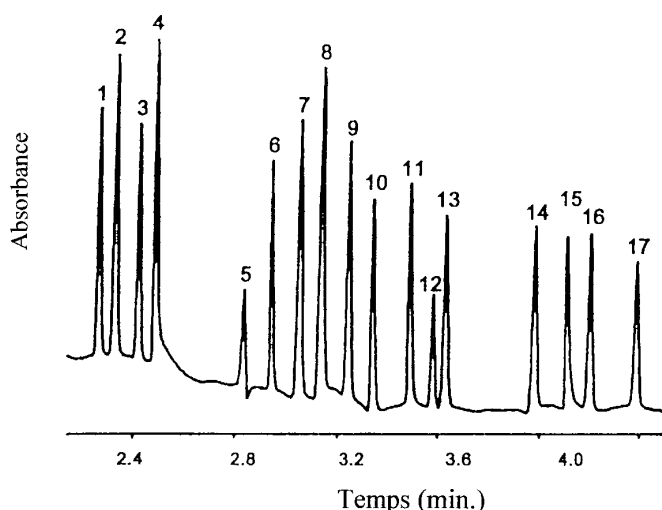


Figure 5. Analyse par électrophorèse capillaire d'un mélange de 17 cations inorganiques avec une détection conductométrique [17]. Conditions opératoires : capillaire de silice fondue (60 cm $\times$ 50 μ m) ; tampon : Hist/MES 30 mM, éther-couronne 18-C-6 2 mM, pH 6,1 ; température : 35 °C ; séparation : 25 kV ; injection hydrodynamique : 12 s à 25 mbar ; concentration des cations (de 2 à 7 ppm) : 1. Cs⁺ ; 2. NH₄⁺ ; 3. K⁺ ; 4. éthylènediamine ; 5. hydrazine ; 6. Ca²⁺ ; 7. Na⁺ ; 8. Mg²⁺ ; 9. éthylammonium ; 10. tétraméthylammonium ; 11. Ba²⁺ ; 12. morpholine ; 13. Li⁺ ; 14. benzylamine ; 15. tétraéthylammonium ; 16. diéthylaminoéthanol ; 17. triéthanolamine.

Détection indirecte

Spectrométrie

Les anions inorganiques et organiques n'ont pas tous une absorbance suffisante dans le domaine UV, si bien que la détection spectrométrique par diminution d'absorbance est très souvent mise en œuvre. La figure 6 permet de sélectionner le meilleur co-ion chromophore selon la nature des anions inorganiques ou organiques analysés (Tab. IV) : les

Tableau III. Principaux tensioactifs cationiques utilisés comme inverseur de flux électroosmotique lors de l'analyse d'anions en électrophorèse capillaire [6].

Tensioactif cationique	Abréviation	Référence
bromure de triméthyltétradécylammonium	TTAB	[7,22-23,29]
bromure de cétyltriméthylammonium	CTAB	[3-4,6-7]
OFM-OH*		[29-30]
hydroxyde de décaméthonium		[3-4]
hydroxyde d'hexaméthonium	—	[6]
polybrène	—	[31-32]

* Produit breveté et commercialisé par Waters.

anions chromate ou pyromellitate (Fig. 7) pour les anions inorganiques mobiles (chlorure, nitrate, bromure, sulfate, phosphate, ...), le trimellitate ou le 2,6-pyridinedicarboxylate pour les anions de mobilité moyenne (citrate, tartrate, malate, succinate) ou le benzoate pour les anions lents des acides carboxyliques à chaîne courte (acétate, pyruvate, lactate, octanoate). En général, le groupe des trois anions suivants, nitrate, nitrite et sulfate est relativement difficile à séparer et la forme des pics carbonate et phosphate est à optimiser.

Enfin, un nouveau tampon à base d'acide sorbique, mise au point par Mercier [3-4], est prometteur pour l'analyse des anions de mobilité moyenne. En effet, l'anion sorbate de mobilité égale à $-33,3 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{V} \times \text{s}$ à pH 6, absorbe fortement à 253 nm ($\epsilon = 25\,000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Ainsi, l'électrolyte acide sorbique-hydroxylamine de forte capacité de tampon convient parfaitement pour la séparation d'un mélange d'anions de mobilité moyenne tels que ceux dérivés des acides alkylphosphoniques (Fig. 8).

Tableau IV. Principaux anions chromophores utilisés en EC avec une détection spectrométrique indirecte [3-5].

chromophore	mobilité électrophorétique ($10^{-5} \text{ cm}^2/\text{V s}$) à pH 6,5 (20 °C)	longueur d'onde de détection	coefficient d'absorbance ($\text{l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
chromate	— 56,7	254	5000
pyromellitate	— 52,8	214	23 900
trimellitate	— 47,3	—	1800
pyridine 2,6-dicarboxylate	— 41,5	192	43 680
sorbate	— 33,3 (à pH 6)	253	25 000
phtalate	— 41,2	196	37 160
benzoate	— 26,7	194	44 480

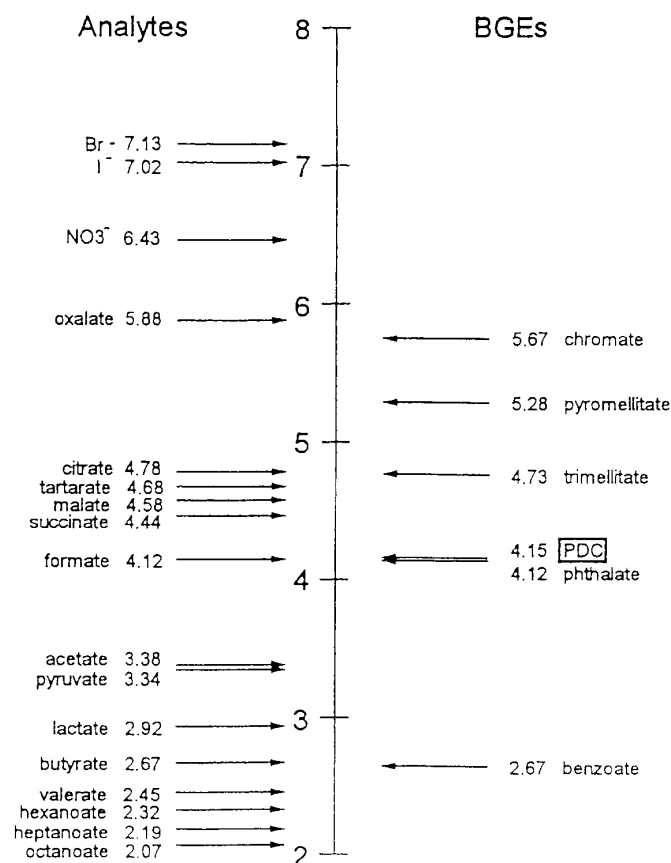


Figure 6. Comparaison des mobilités électrophorétiques des anions inorganiques et organiques avec celles de quelques co-anions utilisés avec une détection spectrométrique indirecte [5]. Conditions opératoires : capillaire de silice fondue modifié PVA (64,5 cm × 50 µm, longueur utile 56 cm) ; tampon : phosphate 20 mM, pH 6,5 ; température : 20 °C ; tension appliquée : -20 kV ; injection hydrodynamique : 2 s à 50 mbar ; détection à 195 nm.

Fluorimétrie

Le système de détection fluorimétrique avec un mode d'absorbance indirecte est apparu bien adapté à l'analyse d'anions inorganiques ou organiques en utilisant toujours le sel de sodium de la fluorescéine comme fluorophore générateur du signal de fond [22-23]. La figure 9 reporte la séparation de quelques anions inorganiques et organiques (citrate, oxalate) ; les reproductibilités obtenues sont acceptables (1 % pour les temps de migration et voisins de 5 % pour les aires corrigées) et les seuils de détection sont d'une centaine de ppb quel que soit l'anion considéré.

Détection directe

Spectrométrie

La détection spectrométrique directe est une technique simple et fiable et peut s'appliquer aux anions possédant des

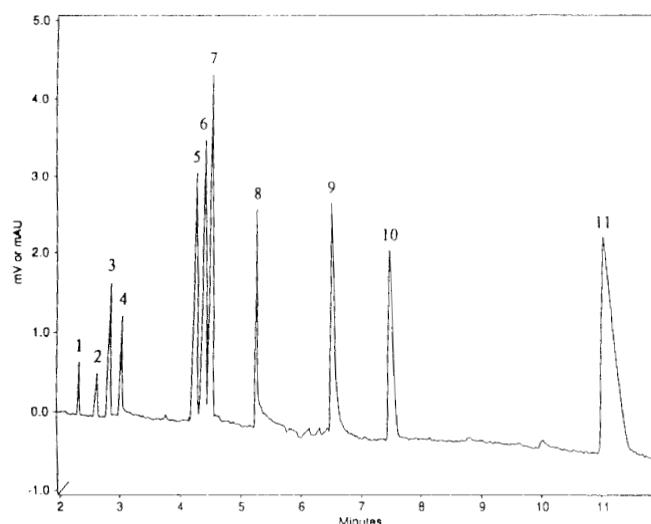


Figure 7. Séparation d'un mélange de 11 anions inorganiques et organiques avec un tampon pyromellitate [40]. Conditions opératoires : capillaire de silice fondue (44 cm × 75 µm) ; tampon : acide pyromellitique 3 mM, Tris, DETA 3 mM, pH 7,5 ; température : 30 °C ; tension appliquée : -20 kV ; injection hydrodynamique : 2 s ; détection à 220 nm ; anions : 1. chlorure ; 2. nitrate ; 3. sulfate ; 4. oxalate ; 5. tartrate ; 6. malate ; 7. succinate ; 8. citrate ; 9. phosphate ; 10. acétate ; 11. lactate.

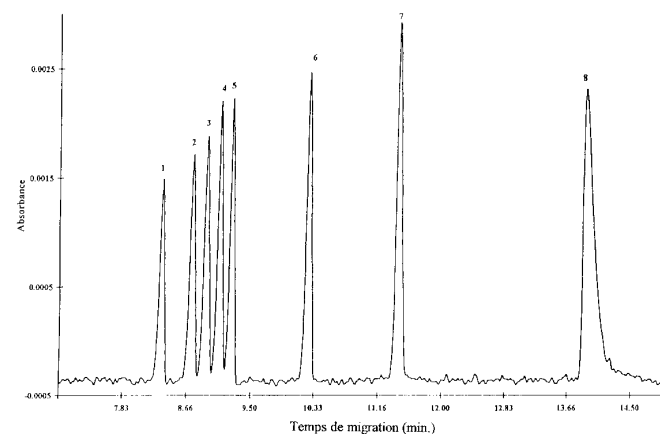


Figure 8. Analyse par électrophorèse capillaire d'un mélange d'acides alkylphosphoniques avec un tampon sorbate [3-4]. Conditions opératoires : capillaire de silice fondue (67 cm × 50 µm, longueur utile 60 cm) ; tampon : acide sorbique 5 mM (pH 6,0), bromure d'hexaméthonium 0,1 mM ; température : 35 °C ; tension appliquée : + 30 kV ; injection hydrodynamique : 5 s ; détection à 254 nm ; concentration des anions : 20 ppm ; acides phosphoniques : 1. CEPA ; 2. PMPA ; 3. CMPA ; 4. DMPA ; 5. EEPA ; 6. IMPA ; 7. EMPA ; 8. MPA.

groupements chromophores. Une application fréquente est l'analyse des halogénures, halogénates et oxoanions avec un simple tampon phosphate de pH 8 (Fig. 10) ; la détection est

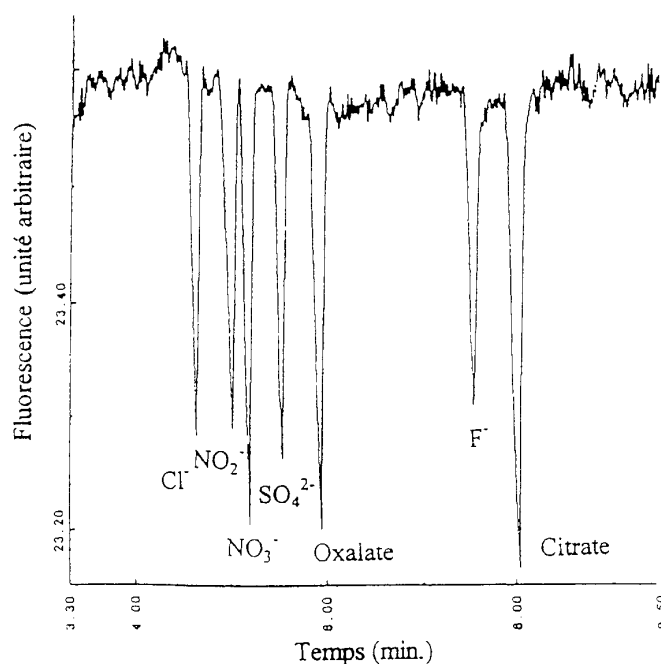


Figure 9. Analyse par électrophorèse capillaire d'un mélange d'anions inorganiques contenant également les ions oxalate et citrate avec une détection fluorimétrique indirecte [23]. Conditions opératoires : capillaire de silice fondue (57 cm $\times$ 50 μ m, longueur utile 50 cm) ; tampon : H_3BO_3 100 mM, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 20 mM, fluorescéine 80 μ M, TTAB 10 μ M ; température : 25 $^\circ\text{C}$; tension appliquée : -20 kV ; injection hydrodynamique : 4 s ; détection fluorimétrique $\lambda_{\text{exc}} = 488$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 520$ nm.

souvent réalisée à 200 nm, puisque la plupart de ces anions ont un maximum d'absorption entre 190 et 210 nm avec des coefficients d'absorptivité molaire non négligeables ($\epsilon = 1 - 10\,000$ L mol $^{-1}$ cm $^{-1}$) ; le seuil de détection est de l'ordre du ppm [18]. Ce mode de détection direct est intéressant pour analyser des anions absorbants (nitrate, nitrite) en présence d'autres anions transparents (sulfate, phosphate) [33].

Pour améliorer les seuils de détection, des méthodes de préconcentration de l'échantillon directement à l'intérieur du capillaire de séparation (par empilement de grands volumes) ont été mises au point [34]. Elles ont permis d'abaisser d'un ordre de grandeur les limites de détection de dérivés anioniques de l'arsenic sans modification de l'appareillage.

Conductométrie

Des séparations sensibles peuvent être obtenues en utilisant des tampons à base de zwitterions de type Good's buffers avec une détection conductométrique. Les séparations d'anions sont d'autant plus reproductibles, robustes et sensibles que le tampon électrophorétique est de force ionique élevée et de faible conductivité. La figure 11 montre la séparation d'un mélange standard (1 ppm) d'anions, en utilisant le tampon CHES 50 mM, LiOH 10 mM, 0,03 % Triton X-100 à un pH 9,2 [17]. Le capillaire est rincé avant chaque injection avec une solution de CTAB 1 mM durant 0,4 min.

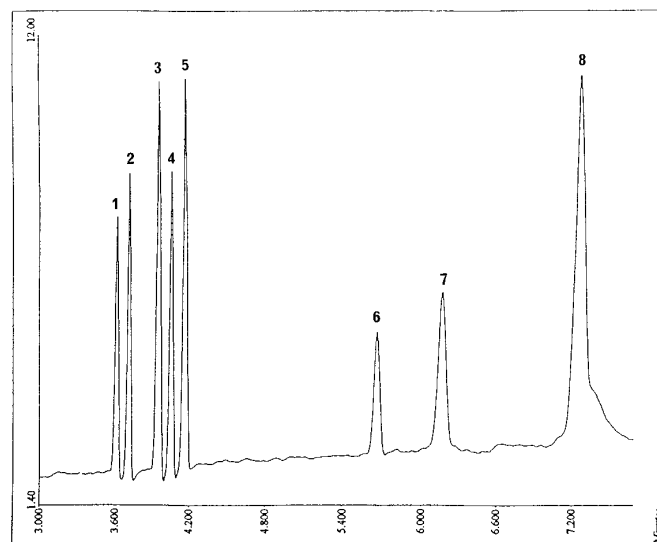


Figure 10. Analyse par électrophorèse capillaire d'un mélange d'anions inorganiques avec une détection conductométrique [17]. Conditions opératoires : capillaire de silice fondue (60 cm $\times$ 50 μ m) ; tampon : CHES 50 mM, LiOH 10 mM, 0,03 % Triton X-100 ; conditionnement : CTAB 1 mM (0,4 min) ; tension appliquée : -25 kV ; courant : 10 μ A ; injection : 8 nL ; anions : 1. bromure ; 2. chlorure ; 3. nitrite ; 4. sulfate ; 5. nitrate ; 6. fluorure ; 7. phosphate ; 8. carbonate.

La tension de séparation est négative. Un des avantages de ce mode de détection par rapport à une détection spectrométrique (limitée par la loi de Beer-Lambert), provient de l'étendue de son domaine de linéarité (3 ordres de grandeur).

En conclusion, l'analyse des ions par électrophorèse capillaire est devenue une méthode analytique de routine lorsque l'échantillon contient des ions ayant des concentrations de même ordre de grandeur. Depuis quelques années, les analystes ont recherché des solutions pour analyser des ions dans des échantillons possédant une matrice ionique.

Analyses d'échantillons ayant une matrice ionique

Comme dans toute technique séparative, la présence d'un ion en forte concentration dans l'échantillon perturbe l'analyse des autres ions minoritaires de même signe. Deux attitudes peuvent être adoptées pour pallier à ces problèmes de co-migration : soit changer la composition chimique du tampon électrophorétique afin de modifier l'ordre de migration des ions, ou réaliser un prétraitement de l'échantillon pour éliminer la matrice ionique gênante.

Modification de la composition du tampon électrophorétique

La résolution R_s entre deux solutés en électrophorèse capillaire libre s'écrit :

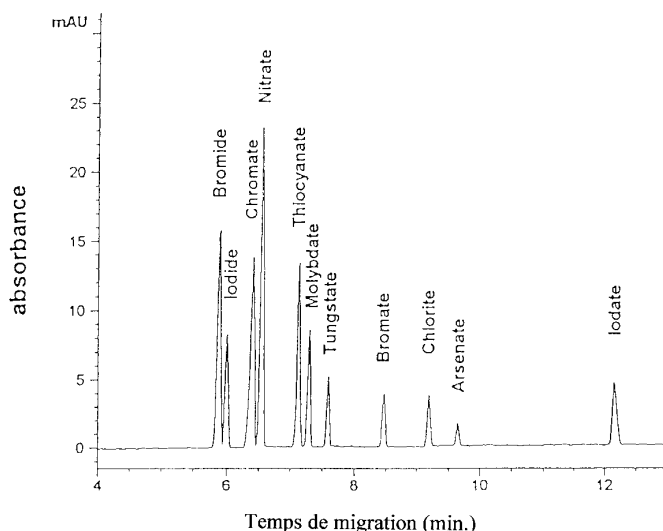


Figure 11. Analyse par électrophorèse capillaire d'un mélange d'anions inorganiques avec une détection spectrométrique directe [18]. Conditions opératoires : capillaire de silice fondue (64,5 cm × 50 μm, longueur utile 56 cm) ; tampon : phosphate 20 mM (pH 8,0) ; température : 20 °C ; tension appliquée : -15 kV ; injection hydrodynamique : 4 s à 50 mbar ; détection à 200 nm ; concentration des anions : 50 ppm.

$$R_s = 1/4 \sqrt{2} \cdot \Delta m_{ep} \cdot [V L_d / D_m (m_{eo} + m_{ep}) L_T]^{1/2} \quad [2]$$

où m_{eo} , m_{ep} sont respectivement la mobilité électroosmotique et la mobilité électrophorétique moyenne des deux solutés, Δm_{ep} la différence de mobilité électrophorétique entre les deux solutés, D_m le coefficient de diffusion moyen des solutés, V la tension appliquée, L_T et L_d les longueurs totale et effective du capillaire. L'amélioration de la résolution peut être obtenue soit par une modification du flux électroosmotique (réduction ou inversion) ou par une augmentation de la sélectivité Δm_{ep} (mise en œuvre de réactions de complexation sélective).

Adaptation du flux électroosmotique

Le flux électroosmotique peut être diminué par une simple modification du pH (Fig. 12). Ainsi, Yang [13] a amélioré la résolution entre le cation sodium majoritaire (20 ppm) et les autres cations calcium, magnésium et manganèse (1 ppm) par une diminution du pH du tampon imidazole de 4,5 à 3,0 au prix d'une légère augmentation du temps d'analyse. Une autre solution consiste en l'ajout d'un solvant organique au tampon afin de modifier la viscosité et le potentiel zéta et réduire ainsi le flux électroosmotique. Le dosage des cations calcium, magnésium, strontium et baryum à 1 ppm en présence d'une matrice sodium (1000 ppm) a été réalisé par le simple ajout de méthanol (20 %) au tampon électrophorétique (dans cet exemple, méthyl-4 benzylamine 10 mM, pH 4,3).

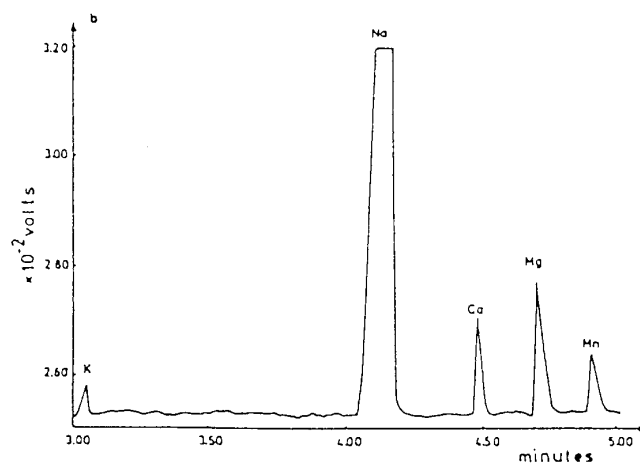
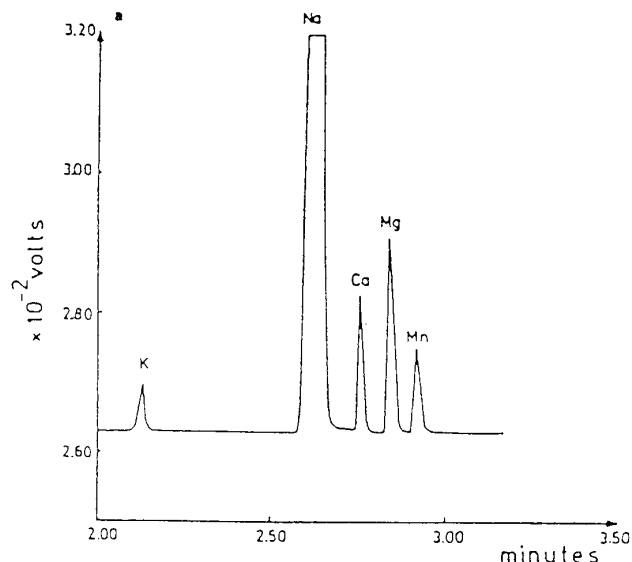


Figure 12. Amélioration de la séparation de cations inorganiques en présence d'une matrice ionique par modification du flux électroosmotique [13]. Conditions opératoires : capillaire de silice fondue (60 cm × 75 μm) ; tampon : imidazole 5 mM (pH ajusté avec H₂SO₄) ; température non contrôlée : 21,5 °C ; tension appliquée : + 20 kV ; injection hydrostatique : 20 – 30 s à 10 cm de hauteur (40 nL) ; détection à 205 nm ; concentration des cations : 1 ppm sauf le sodium à 20 ppm.

Boden [35] a montré qu'il était possible d'analyser par EC les anions minoritaires présents dans un acide minéral ou organique grâce à une modification contrôlée du flux électroosmotique. Ainsi, lors de l'analyse des impuretés anioniques présentes dans l'acide borique 0,9 M, en utilisant le tampon classique (chromate de sodium 5 mM, TTAB 0,20 mM, pH 8,1), une forte perturbation de la ligne de base est observée (Fig. 13a). Dans ce cas, le flux électroosmotique est inversé ($v_{eo} = -0,5$ mm/s) et tous les anions présents dans l'échantillon, y compris l'anion borate, migrent

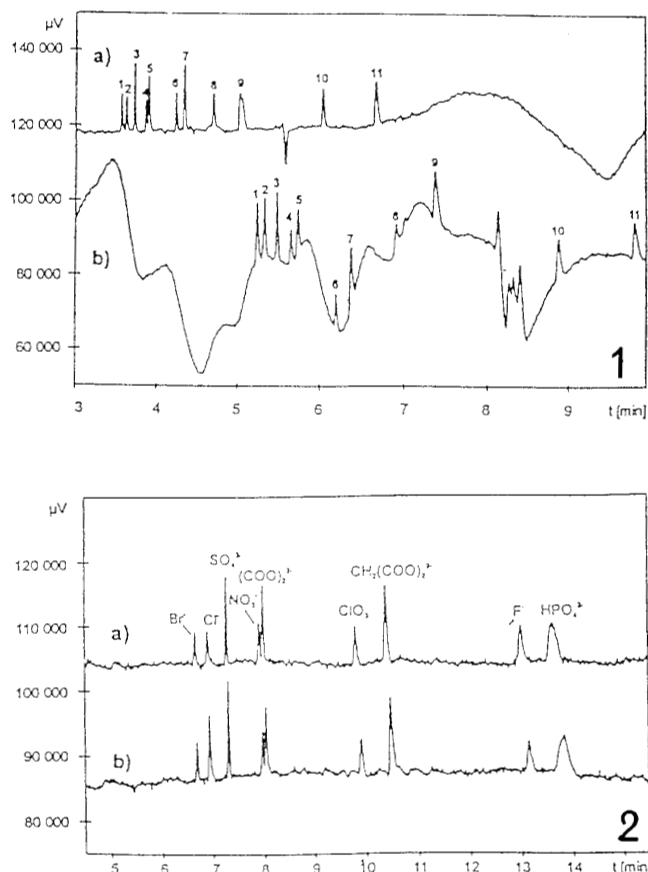


Figure 13. Détermination des impuretés anioniques contenues dans l'acide borique par électrophorèse capillaire [35]. Conditions : capillaire de silice fondue (85 cm $\times$ 75 μ m) ; injection hydrostatique : 10 s à 10 cm ; détection : 254 nm ; anions : 1. bromure ; 2. chlorure ; 3. sulfate ; 4. nitrate ; 5. oxalate ; 6. chlorate ; 7. malonate ; 8. fluorure ; 9. phosphate ; 10. acétate ; 11. propionate. 1) tampon : Na_2CrO_4 5 mM, TTAB 0,20 mM (pH 8,1) ; $v_{eo} = -0,5$ mm/s, a) mélange standard d'anions (25 μ M) ; b) mélange d'anions (25 μ M) dissous dans H_3BO_3 0,9 M, 2) tampon : Na_2CrO_4 5 mM, TTAB 0,01 mM (pH 8,1) ; $v_{eo} = +1,2$ mm/s, a) mélange standard d'anions (25 μ M) ; b) mélange d'anions

vers l'anode sous l'influence conjointe du flux électroosmotique inversé et de leur vitesse électrophorétique. Pour pallier ce problème, la concentration en tensioactif cationique est ajustée (0,01 mM) de telle sorte que le flux électroosmotique ne soit plus inversé, mais réduit par rapport à un tampon chromate sans TTAB et de valeur inférieure en valeur absolue à la mobilité électrophorétique de l'ion borate. En maintenant toujours une tension négative de séparation, les anions vont tous migrer vers le détecteur sauf l'anion borate qui constitue la matrice ionique (Fig. 13b). Bien entendu, cette méthode peut s'appliquer à l'analyse d'impuretés anioniques dans un acide, à condition que la mobilité de son anion soit plus faible que celles de tous les anions à analyser. Le dosage des anions minéraux dans les

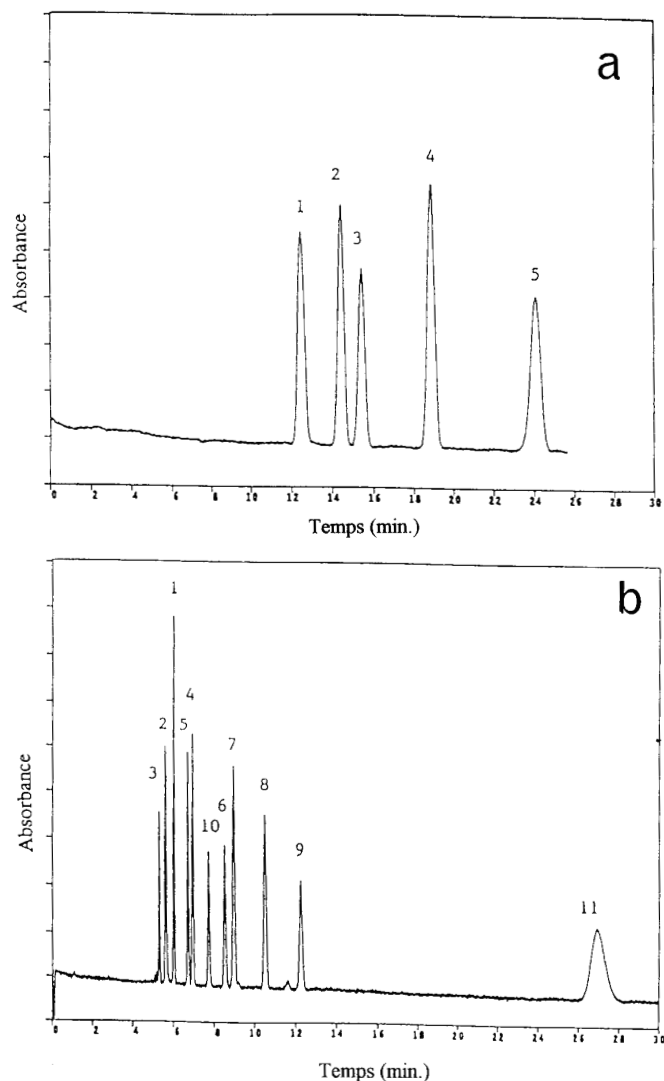


Figure 14. Utilisation d'un tampon de force ionique élevée pour analyser les anions présents dans des échantillons salins [36]. Conditions opératoires : capillaire de silice fondue (33 cm $\times$ 75 μ m, longueur utile 25,5 cm) ; température : 49 $^{\circ}\text{C}$; tension appliquée : -10 kV ; courant : 280 μ A ; injection hydrostatique : 40 s ; détection à 214 nm ; a) tampon : NaCl 1,5 M, pH 2,4 ; anions (10 ppm sauf NO_3^-) : 1. I^- ; 2. SCN^- ; 3. NO_3^- ; 4. IO_4^- ; 5. IO_3^- . b) tampon : borate 20 mM, Li_2SO_4 220 mM, pH 8,5 ; anions (12 ppm) : 1. acide 1,3,5-benzènetricarboxylique ; 2. acide 1,2,4,5-benzènetétracarboxylique ; 3. acide 1,3-benzène-disulfonique ; 4. acide 1,2,4-benzènetricarboxylique ; 5. acide 4,5-dihydro-1,3-benzènedisulfonique ; 6. acide téréphtalique ; 7. acide isophtalique ; 8. acide 1,2,3-benzènetricarboxylique ; 9. acide phtalique ; 10. acide 1,2-benzènedisulfonique ; 11. acide benzènesulfonique.

acides organiques ou des anions minéraux (chlorure, nitrate, sulfate) dans de l'acide phosphorique semble ainsi possible.

En électrophorèse capillaire, il est communément admis qu'un tampon de force ionique élevée induit une distorsion des pics en raison de l'effet Joule. Récemment, Ding et al.

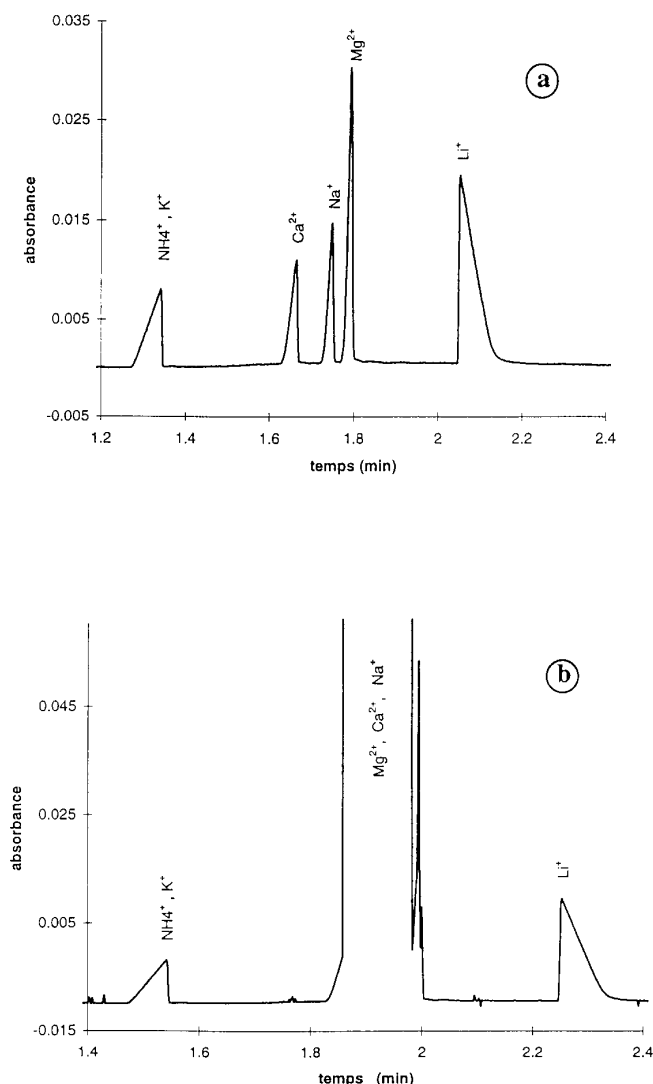


Figure 15. Séparation d'un mélange de cations en électrophorèse capillaire [37]. (a) de même concentration, (b) en présence d'une matrice sodium. Conditions opératoires : capillaire de silice fondue (47 cm $\times$ 75 μ m) ; tampon : 10 mM imidazole, pH 4,5 ; température : 25 $^{\circ}$ C ; séparation : 30 kV ; injection hydrodynamique : 5 s ; concentration des cations : a) 10 ppm ; b) 10 ppm sauf Na^+ 500 mg/L.

[36] ont obtenu des séparations très satisfaisantes de solutions salines (NaCl 0,5 M) d'anions inorganiques (Fig. 14a) et organiques (Fig. 14b), en utilisant des électrolytes très concentrés (NaCl 1,5 M ou Li_2SO_4 0,2 M) avec une détection spectrométrique directe. La température du capillaire a été évaluée à 49 $^{\circ}$ C pour un courant de 280 μ A. Dans ce cas, le flux électroosmotique est quasiment supprimé par interactions entre les groupements silanols et les cations sodium ou lithium, évitant ainsi l'utilisation d'un inverseur de flux électroosmotique. Ce type d'analyse est applicable à condition que, d'une part la matrice saline n'absorbe pas, et

d'autre part, que la teneur en sel dans l'électrolyte soit trois fois supérieure à celle dans l'échantillon. Une des applications principales est le dosage d'anions dans l'eau de mer.

Modification de la mobilité électrophorétique du co-ion de la matrice

La figure 15 illustre l'impossibilité d'analyser avec le tampon usuel (imidazole 10 mM, acide acétique, pH 4,5) un mélange de cations inorganiques dès lors que l'un d'entre eux (ici le calcium) est à une teneur beaucoup plus importante que les autres (ici 50). Toutefois, François et al. [10-11] puis Cahours et al. [37] ont montré que de telles comigrations pouvaient être évitées en ralentissant la migration du cation de la matrice. L'ajout d'agents complexants tels que les éther-couronnes 18-C-6 ou 15-C-5, les anions oxalate ou dipicolinate, permet l'analyse et la quantification de cations inorganiques à l'état de traces en présence de matrice, respectivement potassium, sodium, magnésium ou calcium. De plus, lors de l'analyse d'un échantillon ayant une matrice calcium, avec le tampon imidazole-acide dipicolinique, le pic du calcium disparaît de l'électrophorégramme dès que l'on ajoute plus de 12,5 μ M d'acide dipicolinique au tampon imidazole (10 mM, pH 4,5), sans doute en raison de la formation d'un complexe neutre entre le cation Ca^{2+} et le dianion dipicolinate (Fig. 16). D'une part, cette méthode est simple puisqu'elle ne requiert qu'une légère modification du tampon, d'autre part elle n'induit pas de perte d'efficacité, ni de modification du temps d'analyse. Enfin, elle est quantitative et permet de doser des cations à des teneurs massiques de 0,05 % dans des matrices calcium et magnésium et 0,2 % dans une matrice sodium (Fig. 17).

Prétraitement de l'échantillon

Par simple dilution

Yang [38] a montré qu'il était possible en électrophorèse capillaire d'analyser les cations dans les plantes après une étape de minéralisation à l'acide nitrique ou sulfurique. Toutefois, le minéralisat doit être dilué pour éviter une distorsion de la forme des pics. D'un point de vue pratique, le minéralisat ne doit pas contenir après dilution plus de 8 mM d'acide nitrique ou 25 mM d'acide sulfurique ; la concentration minimale détectable est alors de 600 ppb pour les cations inorganiques [38].

Par passage sur résines échangeuses d'ions

Dans certains cas, la matrice ionique d'un échantillon peut être simplement éliminée par extraction en phase solide de l'échantillon, selon un mode d'échange d'ions, et permettre ainsi le dosage des ions minoritaires qui auraient été masqués sans ce prétraitement [39].

Ainsi, le dosage des cations inorganiques (10 ppm) présents dans l'acide sulfurique 0,5 M (Fig. 18) est possible en EC, avec un tampon imidazole (10 mM, pH 4,5), après passage de cet acide dilué sur une résine de type OH^- (Fig. 18).

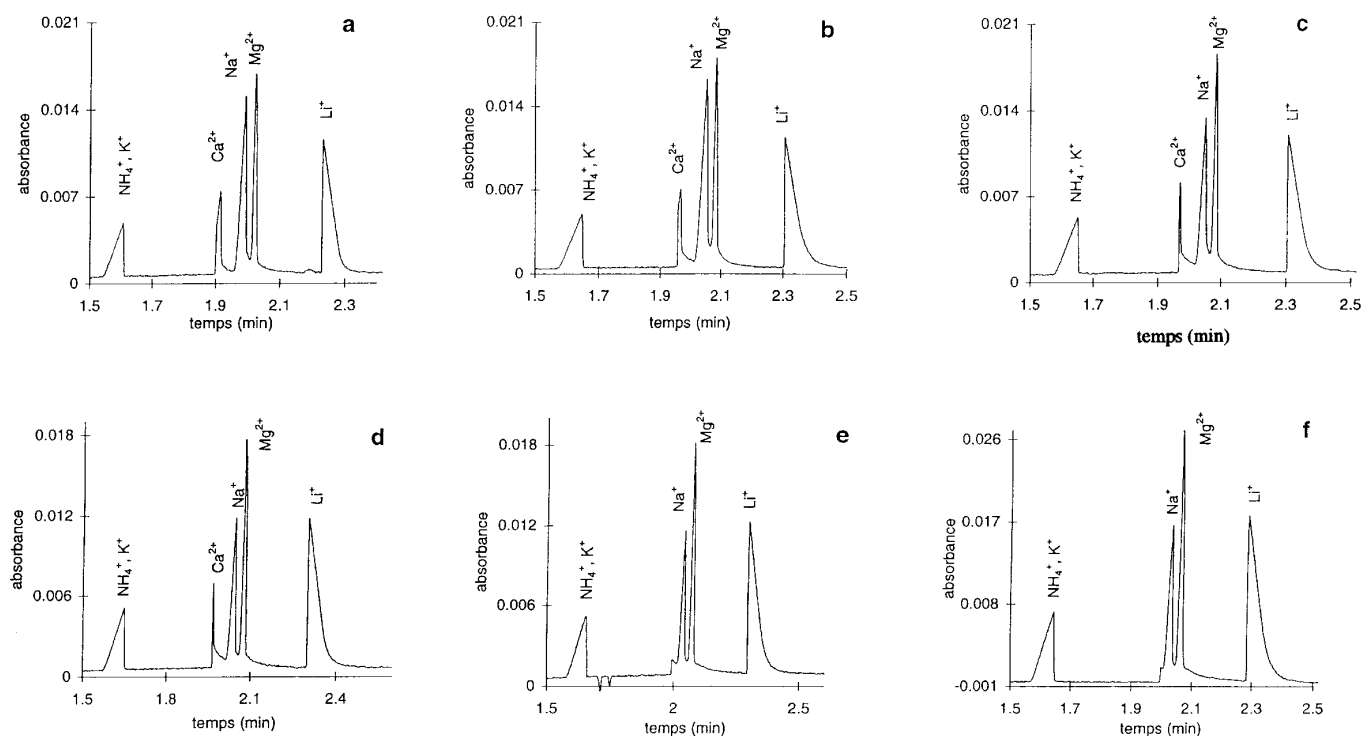


Figure 16. Influence de la concentration en acide dipicolinique ajouté au tampon imidazole sur la séparation d'un mélange de cations inorganiques [37]. Conditions opératoires : capillaire de silice fondue (47 cm $\times$ 75 μ m, longueur utile 40 cm) ; tampon : imidazole 10 mM, acide dipicolinique, pH 4,5 ; température : 25 $^{\circ}$ C ; tension appliquée : 30 kV ; injection hydrodynamique : 5 s ; détection à 214 nm ; cations (10 ppm). concentration de l'acide dipicolinique (μ M) : (a) 2,5 ; (b) 5 ; (c) 7,5 ; (d) 10 ; (e) 12,5 ; (f) 15.

D'autre part, le prétraitement de la soude 1 M sur une résine de type H^+ permet la détermination des anions inorganiques présents dans la soude. Enfin la résine Ag^+ est très pratique pour éliminer une matrice chlorure ; citons l'analyse des anions inorganiques dans HCl 1 M ou dans NaCl 1 M [39]. Dans ces exemples, le tampon utilisé est le tampon dichromate de potassium 5 mM, pH 8 et la détection indirecte est réalisée à 254 nm. Les séparations mentionnées ont été réalisées pour une concentration en ions minoritaires de 10 ppm.

Conclusion

Un grand nombre de tampons peuvent être utilisés en électrophorèse capillaire avec une détection spectrométrique indirecte. Toutefois, la sélection d'un tampon performant nécessite la connaissance des qualités d'absorbance spectrale des divers co-ions potentiels ainsi que de leurs propriétés électrophorétiques. D'autre part, en terme de sélectivité, l'ajout d'un agent complexant spécifique d'un ion permet d'éviter la co-migration de deux ions ainsi que la perturbation occasionnée par la matrice ionique de l'échantillon. Enfin, la sensibilité de détection peut être évaluée à quelques

centaines de ppb en injection hydrodynamique standard avec une détection spectrométrique indirecte et semble meilleure avec une détection conductométrique ou fluorimétrique (facteur 10 environ). Des techniques plus compliquées (et pas applicables à tous les échantillons) existent, telle que la pré-concentration de l'échantillon à l'intérieur de la colonne (stacking).

Lorsque l'échantillon comporte une matrice ionique, il est possible soit de prétraiter l'échantillon sur résines échangeuses d'ions, soit de modifier la composition chimique du tampon afin d'introduire un mécanisme de complexation in-situ de l'ion majoritaire ou pour réguler la valeur du flux électroosmotique de telle sorte que l'ion majoritaire (ou celui de la matrice) ne migre pas vers le détecteur.

Références

1. Morin, Ph.; François, C.; Dreux M. *Analisis* **1994**, 22, 178.
2. Macka, M.; Haddad, P. *Electrophoresis* **1997**, 12-13, 2482.
3. Mercier, J. P.; Morin, Ph.; Dreux, M.; Tambuté, A. *J. Chromatogr. A* **1996**, 741, 279.
4. Mercier, J. P.; Morin, Ph.; Dreux, M.; Tambuté, A. *J. Chromatogr. A* **1997**, 779, 245.
5. Soga, T.; Ross, G. *J. Chromatogr. A* **1997**, 767, 223.

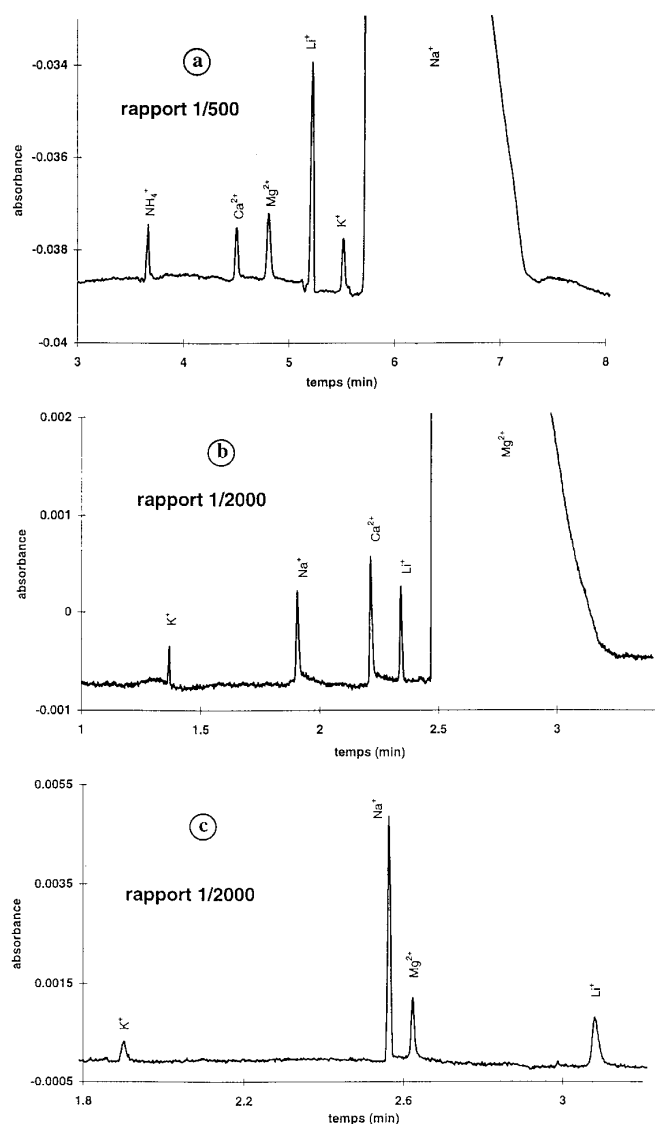


Figure 17. Séparations de cations inorganiques à l'état de traces dans un échantillon avec une matrice ionique [37]. Conditions opératoires : capillaire de silice fondue (47 cm × 75 µm, longueur utile 40 cm) ; tampon : (a) 10 mM imidazole, 500 mM éther couronne15-C-5, pH 4,5, (b) 10 mM imidazole, 0,75 mM acide oxalique, pH 4,5, (c) 10 mM imidazole, 200 µM acide dipicolinique, pH 4,5 ; détection à 214 nm ; tension : 30 kV ; injection hydrodynamique : (a) 5 s, (b) 1 s, (c) 5 s ; température : (a) 20 °C, (b) 25 °C, (c) 25 °C. Concentration des cations : (a) NH_4^+ , K^+ , Mg^{2+} , Li^+ , Ca^{2+} (1 ppm) et Na^+ 500 ppm ; (b) NH_4^+ , K^+ , Li^+ , Ca^{2+} , Na^+ (0,5 ppm) et Mg^{2+} 1000 ppm ; (c) NH_4^+ , K^+ , Mg^{2+} , Li^+ , Na^+

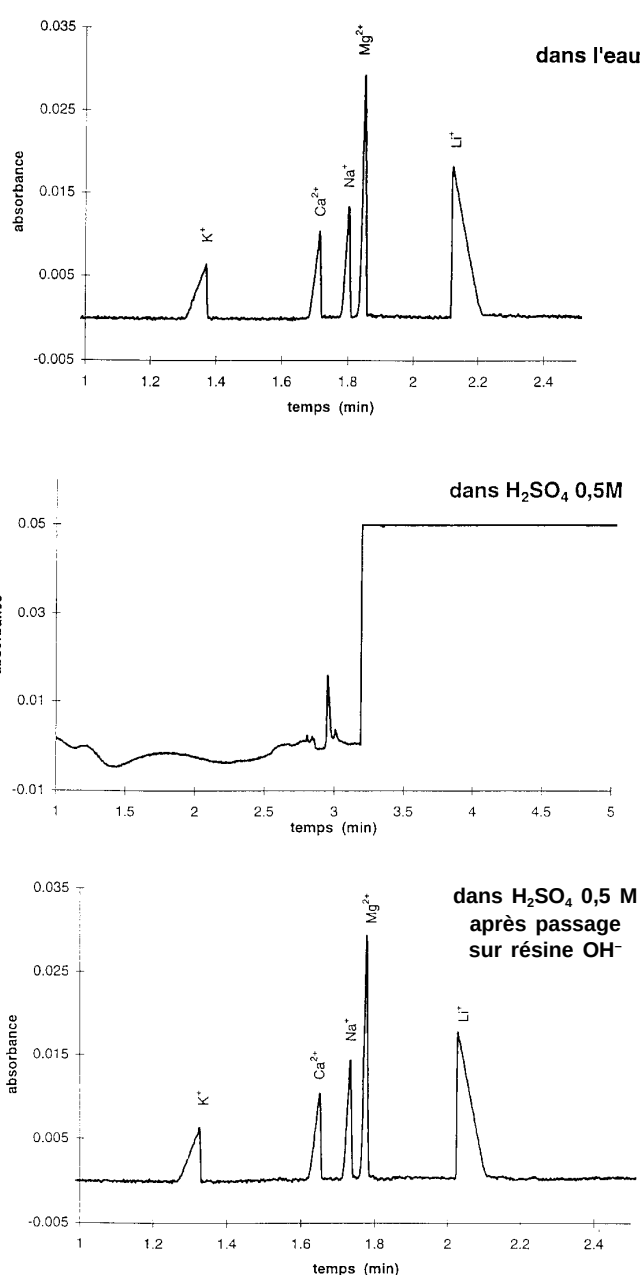


Figure 18. Séparations de cations inorganiques dans H_2SO_4 0,5 M après prétraitement sur résine OH^- [39]. Tampon : 10 mM imidazole, pH 4,5.

6. François, C.; Morin, Ph.; Dreux, M. *J. High. Resol. Chromatogr.* **1996**, 19, 5.
7. Röder, A.; Bächmann, K. *J. Chromatogr. A* **1995**, 689, 305.
8. Cockborne, A.; Sevenier, G. *Spectra Analyse* **1998**, 205, 11.
9. Aupiais, J. *Chromatographia* **1997**, 44, 303.

10. François, C.; Morin, Ph.; Dreux, M. *J. Chromatogr. A* **1995**, 706, 535.
11. François, C.; Morin, Ph.; Dreux, M. *J. Chromatogr. A* **1995**, 717, 393.
12. Morin, Ph.; François, C.; Dreux, M. *J. Liq. Chromatogr.* **1994**, 17, 3869.
13. Yang, Q.; Jimidar, M.; Hamoir, T.; Smeyers-Verbeke, J.; Massart, D. *J. Chromatogr. A* **1994**, 673, 275.
14. Yang, J. *J. Chromatogr. A* **1994**, 673, 275.

15. Schäffer, S.; Gareil, P.; Dezael, C.; Richard, D. *J. Chromatogr. A* **1996**, 740, 151.
16. Haber, C.; Van Saun, R. *Anal. Chem.* **1998**, 70, 2261.
17. Haber, C.; Jones, W.; Soglia, J.; Surve, M.; McGlynn, M.; Caplan, A.; Reineck, J.; Krstanovic, C. *J. Cap. Elect.* **1996**, 3, 1.
18. Soga, T.; Inoue, Y.; Ross, G. *J. Chromatogr. A* **1995**, 718, 421.
19. Friedberg, M.; Hinsdale, M.; Shihabi, Z. *J. Chromatogr. A* **1997**, 781, 491.
20. Desbène, P. L.; Morin, C.; Desbène, A.; Groult, R. *J. Chromatogr. A* **1995**, 689, 135.
21. Desbène, P. L.; Morin, C. *Spectra Analyse* **1994**, 193.
22. Desbène, P. L.; Morin, C.; Desbène, A.; Mofaddel, N.; Groult, R. *J. Chromatogr. A* **1995**, 716, 279.
23. Desbène, P. L.; Morin, C. *Spectra Analyse* **1996**, 193, 15.
24. Ackermans, M.; Everaerts, J.; Beckers, J. *J. Chromatogr.* **1991**, 549, 345.
25. Roldan Assad, R. Thèse Université Paris VI, 1994.
26. Collet, J.; Gareil, P. *J. Chromatogr.* **1995**, 716, 115.
27. Wang, T.; Hartwick, A. *J. Chromatogr.* **1992**, 589, 307.
28. François, C. Thèse Université Orléans, 1996.
29. Romano, J.; Jandik, P.; Jones, W.; Jackson, P. *J. Chromatogr.* **1991**, 546, 411 et 445.
30. Weston, A.; Brown, P.; Jandik, P.; Jones, W.; Heckenberg, A. *J. Chromatogr.* **1992**, 593, 289 et **1992**, 602, 249.
31. Cahours, X.; Morin, Ph.; Dreux, M. *J. Chromatogr. A*, sous presse.
32. Mercier, J. P.; Morin, Ph.; Dreux, M.; Tambuté, A. *Chromatographia* **1998**, 48, 529.
33. Amran, M.; Lakkis, M.; Lagarde, F.; Leroy, L.; Lopez-Sanchez, J.; Rauret, G. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1993**, 345, 420.
34. Albert, M.; Debusschere, L.; Demesmay, C.; Rocca, J. L. *J. Chromatogr. A* **1997**, 757, 281 et 291.
35. Boden, C. *J. Chromatogr. A* **1995**, 716, 311.
36. Ding, W.; Thornton, M.; Fritz, J. *Electrophoresis* **1998**, 19, 2133.
37. Cahours, X.; Morin, Ph.; Dreux, M. *J. Chromatogr. A* **1998**, 810, 209.
38. Yang, J. *J. Chromatogr. A* **1995**, 717, 415.
39. Cahours, X.; Morin, Ph.; Dreux, M. *J. Chromatogr. A*, soumis.
40. Arellano, M.; Andrianary, J.; Dedieu, F.; Couderc, F.; Puig, P. *J. Chromatogr. A* **1997**, 765, 321.
41. Fernandes, I.; Turner, G.; Cahours, X.; Morin, Ph.; Couette, S.; Prie, D.; Biber, J.; Murer, H.; Friedlander, G.; Silve, C. *J. Clinical Investig.* **1997**, 100, 2196.