



Université de Montréal

***Séparation d'acides carboxyliques et d'acides humiques
dans la liqueur Bayer par électrophorèse capillaire.***

Par
François Doucet
Département de chimie
Faculté d'Arts et Sciences

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures
En vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M. Sc.)
En chimie

octobre 1999

©François Doucet, 1999



QD

3

N54

2000

N, 028





Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

***Séparation d'acides carboxyliques et d'acides humiques
dans la liqueur Bayer par électrophorèse capillaire.***

Présenté par

François Doucet

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Professeur Thomas Ellis..... président-rapporteur
Professeur Joseph Hubert.....directeur de recherche
Professeure Karen C. Waldron.....codirectrice de recherche
Professeur Michel Lafleur..... membre du jury

Table des matières

TABLE DES MATIÈRES.....	III
LISTE DES FIGURES.....	VI
LISTE DES TABLEAUX.....	X
REMERCIEMENTS.....	XII
SOMMAIRE.....	XIII
1. INTRODUCTION.....	1
1.1 L'INDUSTRIE DE L'ALUMINIUM.....	1
1.1.1. <i>Le procédé Bayer</i>	1
1.1.2. <i>Origines et effets des impuretés organiques dans le procédé Bayer</i>	5
1.1.3. <i>Méthodes de séparation des organiques dans la liqueur Bayer</i>	7
1.1.4. <i>Électrophorèse capillaire et produits organiques présents dans la liqueur Bayer</i>	8
1.2. ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE.....	9
1.2.1. <i>Principes à la base de l'électrophorèse capillaire</i>	10
Électrophorèse.....	10
Électro-osmose.....	12
Électrophorèse capillaire.....	14
1.2.2. <i>Modes de séparations en électrophorèse capillaire</i>	16

a) Électrophorèse en solution libre.....	16
b) Chromatographie électrocinétique capillaire	19
c) Isotachophorèse capillaire.....	21
d) Électrophorèse capillaire sur gel.....	23
e) Focalisation isoélectrique capillaire.....	24
1.3. CHOIX DU MODE DE SÉPARATIONS SELON LES ORGANIQUES	27
1.3.1. <i>Acides carboxyliques : aliphatiques et aromatiques</i>	27
Détection	34
Limite de détection.....	35
1.3.2. <i>Macromolécules : substances humiques</i>	35
2. MATÉRIELS ET MÉTHODES	37
2.1. APPAREILLAGES.....	37
2.2. MATÉRIELS	37
2.2.1. <i>Composés organiques étalons</i>	37
2.2.2. <i>Focalisation isoélectrique capillaire</i>	38
2.2.3. <i>Électrophorèse capillaire en solution libre et chromatographie</i> <i>électrocinétique capillaire</i>	38
2.3. MANIPULATIONS	40
2.3.1. <i>Séparation des composés aliphatiques</i>	40
2.3.2. <i>Focalisation isoélectrique capillaire des acides humiques</i>	44
2.3.3. <i>Séparation des composés aromatiques</i>	46
Extraction liquide-liquide.....	47
3. RÉSULTATS ET DISCUSSION	48

3.1. EMPREINTE DES DIFFÉRENTES FAMILLES D'ORGANIQUES	48
3.2. ACIDES CARBOXYLIQUES ALIPHATIQUES	51
3.2.1. <i>Spectrophotométrie indirecte</i>	55
3.2.2. <i>Performances obtenues pour la séparation des acides carboxyliques aliphatiques</i>	56
3.3. ACIDES HUMIQUES	57
3.3.1. <i>Focalisation isoélectrique capillaire</i>	57
3.4. ACIDES CARBOXYLIQUES AROMATIQUES	62
3.4.1. <i>Choix du tampon</i>	62
3.4.2. <i>Empreinte d'acides aromatiques dans la liqueur Bayer</i>	64
3.4.3. <i>Élaboration d'une méthode de séparation</i>	67
3.4.3. <i>Analyse quantitative</i>	75
3.4.5. <i>Étude de la mobilité en fonction du rapport charge sur masse</i>	81
4. CONCLUSION	84
5. BIBLIOGRAPHIE	89

Liste des figures

Figure 1 Diagramme du procédé Bayer.	2
Figure 2 Comportement électrophorétique de particules cationique, anionique et neutre sous l'influence d'un champ électrique.....	11
Figure 3 Formation de la double couche électrique à l'interface capillaire/solution.	13
Figure 4 Schéma du montage en électrophorèse capillaire.	15
Figure 5 Représentation schématique de l'électrophorèse capillaire en solution libre A) en mode cathodique, et B) de l'électrophorèse capillaire en solution libre en mode anodique.	18
Figure 6 Représentation schématique de l'isotachophorèse capillaire, où Q est l'électrolyte de « queue », A ₁ et A ₂ sont les analytes et T est l'électrolyte de « tête ».	21
Figure 7 Isotachophérogramme représentant la séparation illustrée à la figure 6.....	23
Figure 8 Focalisation et séparation de trois différentes molécules A, B et C au a) stade initial, b) pendant la focalisation, et c) lorsque les trois molécules sont focalisées. ..	25
Figure 9 Formation d'hémimicelles à l'aide de surfactant de type bromure d'alkyle-triméthyle ammonium.	29
Figure 10 Structure hypothétique proposée pour les acides humiques (22)	30
Figure 11 Structure du bromure d'hexadiméthrine.	32
Figure 12 Comparaison des équilibres impliqués entre deux différents type de modificateurs de débit électro-osmotique et la cyclodextrine; A : surfactant cationique, B : surfactant polycationique.	33

- Figure 13** Montage pour la détection par conductivité ionique après suppression. 40
- Figure 14** Schéma de construction du supprimeur. 42
- Figure 15** Schéma de construction de la cellule de conductivité ionique. 43
- Figure 16** Empreinte obtenue par spectrophotométrie indirecte de liqueur Bayer en électrophorèse capillaire en solution libre en mode inversé (bleu Vaudreuil, rouge Q.A.L.). Électrolyte de support : 5 mM CrO₃, 0,5 mM bromure de dodécyl-triméthylammonium, 10 % (v/v) CH₃CN, 5 M urée, pH 8,63; capillaire de silice : 50 µm de diamètre interne, 24 cm de longueur et 16 cm de longueur effective; Voltage de séparation : - 30 kV; longueur d'onde de détection : 265 nm. 50
- Figure 17** Électrophérogramme d'un mélange étalon de 7 acides carboxyliques aliphatique obtenu pour une séparation en électrophorèse capillaire en solution libre en mode cathodique avec détection par conductivité ionique après suppression. Électrolyte de support : 2 mM Na₂B₄O₇, pH 9,01; capillaire de silice : 75 µm de diamètre interne, 60 cm de longueur; Solution de suppression : 5 mM H₂SO₄; Voltage de séparation : + 24 kV..... 52
- Figure 18 a** Structure et propriétés (95) des acides carboxyliques aliphatiques séparés à la figure 18 b. 54
- Figure 18 b** Séparation rapide d'une solution étalon d'acides carboxyliques aliphatiques. Électrolyte de support : 5 mM Na₂CrO₄, 0,001 % (m/v) HDB, 10 % (v/v) CH₃CN, pH 9,03; capillaire de silice : 50 µm de diamètre interne, 24 cm de longueur et 16 cm de longueur effective; Voltage de séparation : - 30 kV; longueur d'onde de détection : 265 nm..... 56

Figure 19 Focalisation isoélectrique capillaire du mélange étalon d'humates de sodium étalons.....	59
Figure 20 Agrandissement de la séparation des acides humiques de la solution étalon d'acides humiques à 380 nm.....	59
Figure 21 Focalisation isoélectrique capillaire d'acides humiques extraits dans la liqueur Bayer provenant de l'usine Q.A.L.	61
Figure 22 Agrandissement de la séparation de l'extrait d'acides humiques sur la liqueur de Q.A.L à 380 nm.	61
Figure 23 Formation de complexes bidentates d'acides organiques avec le borate.	63
Figure 24 Empreinte de deux liqueurs Bayers obtenue pour l'injection directe de liqueur. Électrolyte de support : 50 mM Na ₂ B ₄ O ₇ , 0,001 % (m/v) HDB, pH 10,01; capillaire de silice : 50 µm de diamètre interne, 57 cm de longueur et 50 cm de longueur effective; Voltage de séparation : - 7 kV; longueur d'onde de détection : 214 nm.....	65
Figure 25 Empreinte de liqueur Bayer obtenu pour l'injection directe de liqueur II. Électrolyte de support : 50 mM Na ₂ B ₄ O ₇ , 0,001 % (m/v) HDB, pH 10,01; capillaire de silice : 50 µm de diamètre interne, 57 cm de longueur et 50 cm de longueur effective; Voltage de séparation : - 7 kV; longueur d'onde de détection : 214 nm.....	66
Figure 26 Structures des acides carboxyliques aromatiques, les acides sont classés selon leur ordre de migration à la figure 29.....	68
Figure 27 Effet du pH sur la mobilité des différents acides carboxyliques aromatique.	70
Figure 28 Effet de la concentration en 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrine sur la mobilité électrophorétique.....	71

Figure 29 Électrophérogramme du mélange étalon d'acides carboxyliques aromatiques.

Électrolyte de support : 25 mM Na₂B₄O₇, 25 mM Na₂HPO₄, 0,001 % (m/v) HDB, 2 mM HP-β-CD, pH 10,00; capillaire de silice : 50 μm de diamètre interne, 57 cm de longueur et 50 cm de longueur effective; Voltage de séparation : - 24 kV; longueur d'onde de détection : 214 nm. 73

Figure 30 Électrophérogramme pour la séparation des acides carboxyliques aromatiques

dans la liqueur Bayer provenant de deux différentes usines. Électrolyte de support : 25 mM Na₂B₄O₇, 25 mM Na₂HPO₄, 0,001 % (m/v) HDB, 2 mM HP-β-CD, pH 10,00; capillaire de silice : 50 μm de diamètre interne, 57 cm de longueur et 50 cm de longueur effective; Voltage de séparation : - 24 kV; longueur d'onde de détection : 214 nm..... 74

Figure 31 Tracé de la mobilité électrophorétique en fonction du rapport charge sur

masse pour les acides carboxyliques aromatiques monochargés étudiés. Équation de la droite $\mu_{ep} = -338 (Z/M) - 0,211$, $R^2 = 0,987$ 81

Liste des tableaux

Tableau I Temps de migration et efficacité de séparation du mélange étalon de 22 acides carboxyliques aromatiques.....	76
Tableau II Comparaison entre les différentes méthodes de calibration pour un domaine de concentration allant du blanc à 400 ^{mg} / _L	78
Tableau III Analyse quantitative des différents acides carboxyliques aromatiques dans la liqueur Bayer de différentes usines.	80
Tableau IV Charge estimée pour les différents acides carboxyliques aromatiques	82

À Clorinthe,

Remerciements

Je tiens à remercier les professeurs Karen C. Waldron et Joseph Hubert pour leur support et leurs judicieux conseils tout au long du projet.

Je tiens à remercier particulièrement le département de chimie et de biochimie de l'Université du Québec à Montréal pour m'avoir permis d'utiliser leur appareil d'électrophorèse capillaire afin de réaliser la majorité de mes travaux.

Je veux remercier également Frank Kimmerle, Stéphane Paré, Luc Noël du groupe technologie analytique et Hélène Louise Boily du groupe Matières premières du Centre de recherche et développement Arvida pour les nombreuses discussions et conseils sur l'analyse des organiques dans la liqueur Bayer.

Je veux également souligner la contribution financière d'Alcan International Ltée ainsi que la Fondation Asselin du CEGEP de Jonquière. De plus, l'excellent travail des gens de l'atelier mécanique et électronique mérite d'être souligné. De même que les dons de professeur Purnendu K. Dasgupta de Texas Tech University (fil bifilaire) et de David Leighty de Perma-Pure Products, Tom's River, NJ, USA (membrane de Nafion) qui ont servi à la construction du détecteur à conductivité après suppression.

J'aimerais manifester, par la même occasion, ma reconnaissance à tous les personnes qui me sont chères.

Sommaire

Depuis quelques années, les alumineries remarquent que la matière première (bauxite) contient de plus en plus de composés organiques. L'accumulation de ceux-ci dans la liqueur Bayer par son recyclage dans le procédé amène une augmentation de la concentration des organiques dans celle-ci. Les problèmes reliés à la présence de ces composés organiques dans la liqueur Bayer ont été longtemps négligés. Par contre, avec l'augmentation de la teneur en organique dans la matière première, ces composés suscitent de plus en plus l'attention de la part des alumineries à travers le monde. Plusieurs méthodes dites « classique » ont été appliquées à la caractérisation et la quantification de ces composés dans la liqueur, mais les coûts, le temps d'analyse et les performances obtenues demandent d'être réévalués constamment dans un contexte d'amélioration continue. C'est à ce moment qu'une « jeune » méthode comme l'électrophorèse capillaire doit être évaluée pour la séparation des organiques dans la liqueur Bayer.

Le présent projet de maîtrise vise à explorer l'utilisation de l'électrophorèse capillaire afin de séparer différents composés organiques qui sont contenus dans la liqueur Bayer. Principalement trois familles de composés organiques sont visées soit : les acides carboxyliques aliphatiques, les acides carboxyliques aromatiques et les matières humiques. Ce n'est qu'un échantillon des différentes familles d'organiques qui se retrouvent dans la liqueur. Par contre, ces familles de produits attirent particulièrement l'attention des alumineries.

La séparation des acides carboxyliques aromatiques a été réalisée par électrophorèse capillaire en solution libre en mode anodique pour les aliphatiques et les aromatiques. L'investigation qui fut réalisée montre l'utilité de l'électrophorèse capillaire pour la séparation rapide de ces composés (moins de 10 minutes). Une série d'acides carboxyliques aliphatiques a été séparée en moins de 30 secondes. Différentes empreintes effectuées sur différentes liqueurs avec un mode de détection universel ont montré la possibilité d'identifier rapidement plusieurs familles de composés dans une seule séparation. L'utilisation d'un détecteur sélectif dans le cas des acides carboxyliques aromatiques permet d'obtenir une évaluation rapide de l'aromaticité de différentes liqueurs. Une méthode a également été élaborée pour la quantification des acides carboxyliques aromatiques après une extraction liquide/liquide afin de simplifier la matrice. Les résultats obtenus sont très convenables. De plus, cette méthode a permis de relier la mobilité électrophorétique des acides carboxyliques aromatiques à leur rapport charge sur masse pour permettre l'évaluation de la charge effective de certains polyacides et/ou polyalcools.

Les essais effectués pour la séparation des acides humiques par focalisation isoélectrique capillaire semblent très encourageants. Les analystes modernes ne parviennent qu'à obtenir une empreinte de cette famille de composés, les résultats obtenus laissent présumer qu'un jour, il sera possible de les séparer en espèce individuelle. Mais le gros du travail reste à faire.

1. Introduction

1.1 L'industrie de l'aluminium

L'aluminium est produit par deux procédés : 1) le procédé Bayer, breveté en 1888 par un australien du nom de Karl Joseph Bayer, qui consiste en l'extraction sélective de l'hydrate d'alumine dans une solution d'hydroxyde de sodium concentrée, l'hydrate est ensuite précipité, et finalement calciné pour la déshydratation (1), et 2) le procédé Hall et Héroult, découvert simultanément, mais indépendamment en 1886, par ces deux chercheurs, consiste en la transformation de l'alumine en aluminium par une réduction électrolytique dans une solution de sels fondus d'alumine et de cryolithe (Na_3AlF_6) (2).

1.1.1. Le procédé Bayer

Le procédé Bayer comporte cinq étapes principales tel qu'illustré à la figure 1 (1). Ces étapes sont : le broyage, la digestion, la décantation, la précipitation et la calcination (1). La digestion consiste en la solubilisation du trihydrate d'alumine dans une solution caustique (hydroxyde de sodium concentré à environ 4 M) à l'intérieur d'autoclaves opérés à des températures comprises entre 135 et 143 °C et à une pression de 4 atm (1). Les principales impuretés inorganiques contenues dans la bauxite tels les composés de fer, de titane, de silicium sont insolubles dans ces conditions, et elles restent dans la liqueur sous forme de résidus solides formant la boue rouge.

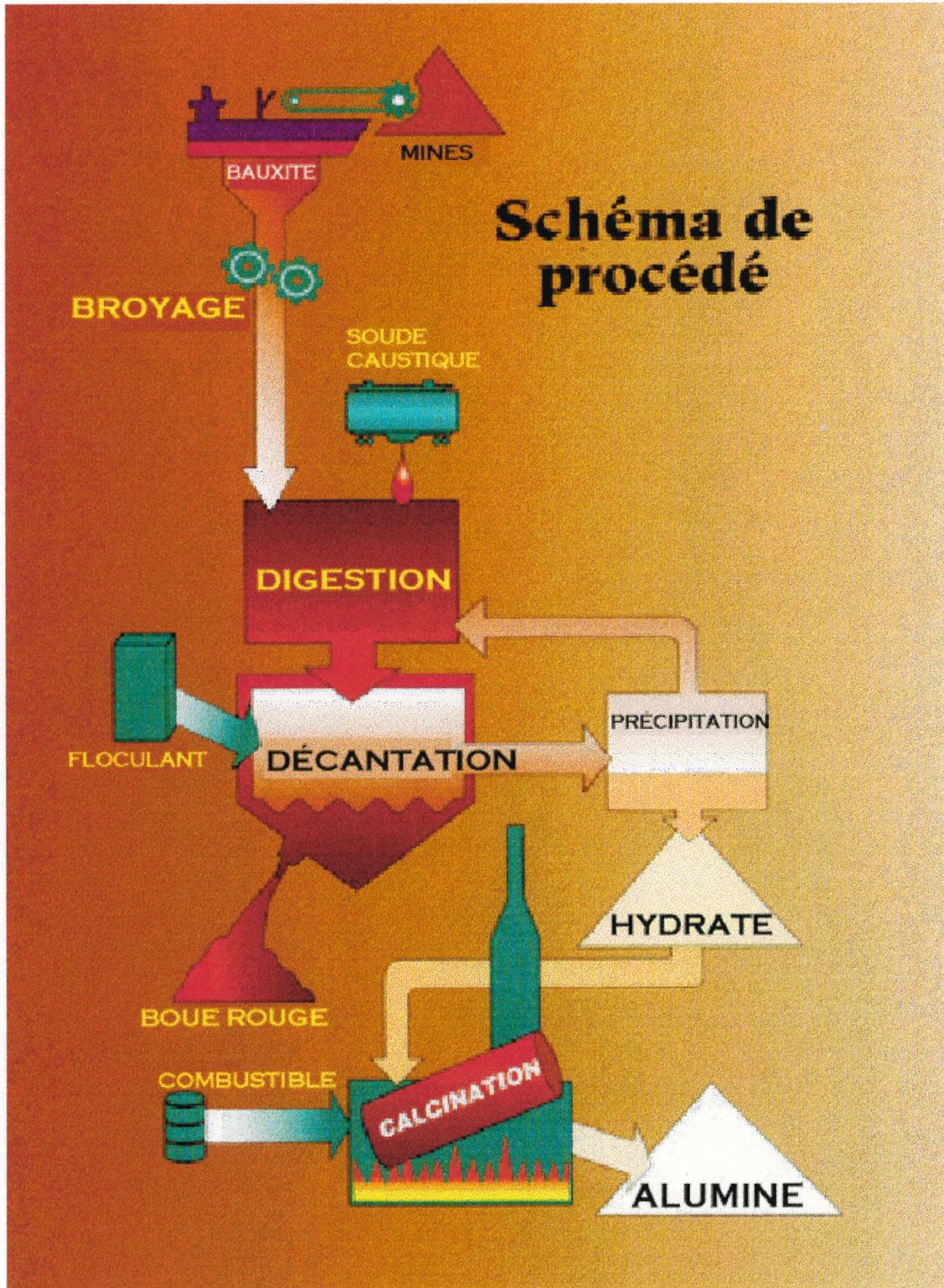
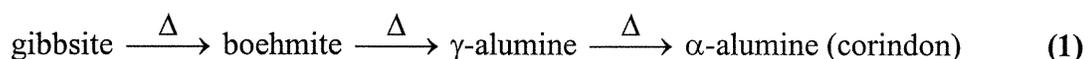


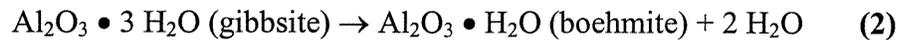
Figure 1. Diagramme du procédé Bayer.

L'étape suivante consiste en la séparation de la liqueur Bayer et de la boue rouge par un décanteur à haute performance. Anciennement, cette étape était réalisée par des filtres et cette opération était l'étape déterminante de la productivité d'une usine en raison des multiples arrêts de production nécessités pour la vidange et le nettoyage des filtres. Les boues rouges, qui sortent de l'étape de décantation, sont ensuite nettoyées pour récupérer l'hydroxyde de sodium et permettre de disposer de celle-ci dans le respect de l'environnement. Par la suite, la précipitation (souvent appelée la décomposition par les ingénieurs de procédés) consiste en la recristallisation du trihydrate d'alumine à partir de la liqueur-mère. De nombreux facteurs affectent cette précipitation : la concentration d'hydroxyde de sodium, le rapport pondéral (alumine (Al_2O_3) / caustique (Na_2O) (i. e. : $\text{Na}_2\text{O} = 2\text{NaOH} - \text{H}_2\text{O}$)), la dilution, la température, la surface de l'amorce, *les impuretés organiques (facteur qui sera discuté à la section 1.1.2)*, les impuretés inorganiques, ainsi que le temps de précipitation (2). Compte tenu du grand nombre de paramètres à considérer, la chimie de la précipitation est considérée comme un art. Les impuretés organiques posent ainsi plusieurs problèmes de production dans cette étape.

L'étape qui suit est la calcination, cette dernière consiste en la déshydratation du trihydrate d'alumine ($\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$) en alumine de qualité électrolytique (sans molécule d'hydrate, i. e. Al_2O_3). En 1925, Haber démontra que la gibbsite ($\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$), lorsqu'elle est chauffée suivra différentes phases de transformation qui se terminent par la formation du corindon selon les réactions suivantes (2):



Le trihydrate d'alumine, qui est introduit dans les fours rotatifs, contient 12 à 15 % d'humidité et subit une transformation en cinq étapes (2). La première, le séchage du trihydrate d'alumine à 200 °C pour amorcer la déshydratation, est suivie d'un chauffage à environ 300 °C où la gibbsite est transformée en boehmite selon la réaction :



Par la suite, le chauffage est poursuivi jusqu'à 600 °C afin que l'alumine perde sa dernière molécule d'eau pour donner la γ -alumine (2). Finalement, l'alumine subit un chauffage à environ 1 000 °C pour la désactiver et l'empêcher d'absorber de l'eau. À noter que toutes les réactions de déshydratation décrites jusqu'à présent sont endothermiques (2). Pour obtenir le corindon ou α -alumine, il faut poursuivre le séchage jusqu'à 1 300 °C pour que cette réaction exothermique se produise (2). L'alumine, qui est utilisée pour l'alimentation du procédé Hall-Héroult, est la γ -alumine (calcinée à 1 000 °C) qui possède une perte de feu de 1 à 2 %. Il existe plusieurs formes commerciales d'alumines, elles sont appelées alumines spéciales. À titre d'exemple, l'alumine est utilisée dans plusieurs domaines tels que : la chromatographie, la fabrication de briques réfractaires, les isolateurs pour le transport d'énergie électrique, les meules d'aiguisage, la vaisselle, les poteries en céramique, les bougies automobiles, les catalyseurs, les pièces d'ordinateur, etc. Les alumines spéciales sont très dispendieuses, car elles demandent un contrôle de qualité accrue dans leur fabrication.

1.1.2. Origines et effets des impuretés organiques dans le procédé Bayer

La matière première qui alimente le procédé Bayer est la bauxite. Grâce à une histoire géologique particulière aux régions chaudes du globe (tropicque), la bauxite s'est formée lentement, pendant des millions d'années, sous l'alternance répétée de l'action de la saison sèche et des lavages de la saison des pluies (1). Il existe trois types de bauxites : la gibbsite, celle dont l'alumine est le plus facile à extraire, qui est majoritairement composée de trihydrate d'alumine ($\text{Al}_2\text{O}_3 \bullet 3 \text{H}_2\text{O}$); la boehmite un peu plus riche en alumine, mais principalement composée de monohydrate d'alumine ($\text{Al}_2\text{O}_3 \bullet \text{H}_2\text{O}$) plus difficile à traiter (conditions d'extractions plus dures en terme de pression et température); et finalement le diaspore majoritairement composé d'alumine monohydrate, mais qui ne peut pas être extrait de façon rentable (3). La bauxite est un minerai qui se retrouve entre 2 et 10 mètres de profondeur reposant sur un lit de kaolinite (aluminosilicate, argile) (4). Habituellement, deux couches recouvrent le minerai : i) le sol qui est constitué de silice (quartz) et de nombreux composés organiques issus de l'activité cellulaires de surface; ii) d'une croûte dure qui est généralement dynamitée afin d'accéder à la bauxite (4). Une certaine quantité de composés organiques se retrouvent ainsi dans la bauxite par l'infiltration de l'eau de surface dans le minerai. La liqueur Bayer accumule ceux-ci durant son recyclage dans le procédé, ce qui entraîne de sévères problèmes de production telle la baisse de rendement de précipitation (5). Les acides humiques, les acides fulviques, les lignines, les celluloses, des hydrates de carbonnes et certaines protéines se retrouvent dans la liqueur Bayer (5). Cela montre bien la diversité de composés organiques qui

se retrouvent dans la liqueur, mais surtout l'ampleur du problème analytique que demande leur séparation et leur détection.

La gibbsite a toujours eu la réputation d'être pauvre en composés organiques, de l'ordre de 0,1 % (m/m), mais depuis quelques années les compositions que l'on rencontre sont plus riches en matières organiques et on peut trouver jusqu'à 0,6 % (m/m). La teneur et la nature en impuretés organiques qui composent la matière première affecteront directement la chimie de précipitation de la liqueur. Par son recyclage dans le procédé (après la précipitation du trihydrate d'alumine), la liqueur accumulera ces impuretés jusqu'à ce qu'une concentration d'équilibre soit atteinte (environ 25 g/L) (12). Par exemple, l'ion oxalate cause des problèmes au procédé Bayer qui sont connus depuis longtemps, il va coprécipiter avec le trihydrate d'alumine en formant des ponts entre les cristaux d'hydrate et augmentera ainsi la quantité de fins cristaux. Ce phénomène crée des interférences dans la classification granulométrique de l'hydrate d'alumine (5-7). Un autre problème relié à la présence de l'oxalate dans la liqueur Bayer est la formation d'écailles (7). Ce dernier problème est particulièrement coûteux pour les alumineries car la formation d'écailles à l'intérieur des décomposeurs et de la tuyauterie de l'usine entraîne des coûts très importants en terme de main d'œuvre et d'équipement. Plusieurs autres impuretés organiques peuvent avoir d'autres effets sur la chimie de la liqueur comme une contribution à la précipitation du trihydrate d'alumine ou au contraire son inhibition. Il devient alors primordial de caractériser ces impuretés afin de mieux comprendre leurs effets sur la chimie de la liqueur.

1.1.3. Méthodes de séparation des organiques dans la liqueur Bayer

Jusqu'à présent, la chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire couplée à la spectrométrie de masse permet d'analyser environ 30 % des composés organiques contenus dans la liqueur (surtout des composés de faible masse moléculaire < 300 D) (13). Les composés organiques restant (70 %) doivent être séparés en phase liquide (13) en raison des points d'ébullitions élevés associés à ces molécules de plus fortes masses moléculaires. La chromatographie en phase liquide à haute performance sur colonne non-polaire permet de séparer une bonne quantité de produits non-polaires tels les acides organiques aromatiques et les hydrates de carbones (11). La chromatographie ionique permet de séparer et de détecter une bonne quantité de composés organiques de faibles masses moléculaires. Toutefois, compte tenu de la composition complexe de la liqueur Bayer, l'échantillon doit être extrait avant séparation par chromatographie liquide à haute performance sur colonne non-polaire (13) et doit être dilué au moins 50 fois pour la chromatographie ionique afin d'éviter les effets de matrice (14). En chromatographie ionique avec une détection par conductivité ionique, l'alumine tend à précipiter dans le suppresseur ce qui pourrait expliquer en partie le court temps de vie de ce dernier. De plus, les essais effectués pour la détection des hydrates de carbones dans la liqueur Bayer par chromatographie ionique avec détection ampérométrique ne sont pas très prometteurs (14). Le problème réside donc surtout dans la séparation et la détection des molécules de fortes masses moléculaires tels les acides humiques, les acides fulviques, les lignines et les protéines. Les chimistes qui analysent les sols ont montré qu'ils pouvaient obtenir une empreinte des acides humiques et des acides fulviques par électrophorèse

capillaire en solution (15-25). En plus de la séparation difficile de ces molécules, la disponibilité d'étalons de ces espèces individuelles pose un problème de taille. D'autres outils permettent de séparer de telles molécules : la chromatographie d'exclusion (24), la filtration sur gel (8, 9), l'ultrafiltration (8), l'électrophorèse « classique » sur gel (18), la focalisation isoélectrique « classique » (18) et plus récemment plusieurs modes de séparation en électrophorèse capillaire semblent très prometteurs pour la séparation de ces macromolécules. Gordon Lever en 1978, fut le premier à séparer et quantifier ce genre de molécules dans la liqueur Bayer par filtration sur gel. Il arrivait à la conclusion que 2,1 g/L d'acides humiques (ou environ 25 % de la teneur total en carbone organique) entre 1 000 et 5 000 de masse moléculaire se retrouvent dans la liqueur et que cette concentration augmente avec la température de digestion, mais le pourcentage en matière organique reste le même (8).

1.1.4. Électrophorèse capillaire et produits organiques présents dans la liqueur Bayer

Présentement des protocoles d'analyses par chromatographie en phase gazeuse (8,9), par chromatographie liquide à haute pression couplée à un spectromètre de masse et par chromatographie ionique (10,11) sont utilisés pour la caractérisation et la quantification de quelques composés organiques contenus dans la liqueur Bayer. Cependant, de sévères inconvénients sont associés à ces méthodes: i) le temps de préparation de l'échantillon, ii) le temps d'analyse pour la chromatographie en phase

gazeuse et pour la chromatographie liquide à haute performance, et iii) les coûts élevés associés à l'entretien de l'appareil de chromatographie ionique. Il devient donc important de rechercher une nouvelle méthode analytique en phase liquide qui pourrait permettre de caractériser les molécules organiques contenues dans la liqueur Bayer. L'électrophorèse capillaire figure parmi les méthodes analytiques en phase liquide. Elle possède un avantage marqué par rapport aux méthodes traditionnelles de séparation, en effet, plusieurs modes de séparation peuvent être effectués avec le même appareil en changeant seulement les conditions expérimentales (i.e. composition de l'électrolyte de support, phase stationnaire, pseudo-stationnaire (additif), modification de la paroi du capillaire, etc.). Cela donne à l'électrophorèse la possibilité d'attaquer la séparation de plusieurs classes de composés dans la liqueur Bayer ce que ne permettent pas les méthodes chromatographiques conventionnelles. De plus, les performances obtenues en électrophorèses capillaire pour la séparation de plusieurs types de molécules qui ne sont pas ou qui sont mal séparées par les méthodes plus traditionnelles (i.e. petits ions, petites molécules, peptides, protéines, acides désoxyribonucléiques, etc.), semblent pleines de promesses pour son application à la résolution du mélange complexe qu'est la liqueur Bayer.

1.2. Électrophorèse capillaire

La première expérience d'électrophorèse de zone « classique » fut décrite en 1930 par Arne Tiselius et publiée en 1937 (25). Les premières expériences d'électrophorèse capillaire ont été réalisées sur des appareils d'isotachophorèse capillaire, le seul

appareil commercialement disponible à ce moment. L'électrophorèse capillaire fut développée dans les années 80 par Jorgenson qui en élaborer les bases théoriques (26). Avant d'énumérer les différents modes de séparation, nous allons énoncer les principes de base de cette technique de séparation.

1.2.1. Principes à la base de l'électrophorèse capillaire

Il y a deux principes à la base de la séparation en électrophorèse capillaire : l'électrophorèse elle-même et l'électro-osmose. Avant de les combiner, il est préférable de les traiter séparément.

Électrophorèse

L'électrophorèse est la migration d'une particule chargée sous l'influence d'un champ électrique (figure 2). Cette particule possédera une vitesse électrophorétique, v_{ep} proportionnelle à sa mobilité électrophorétique μ_{ep} et à l'intensité du champ électrique E ($E = V/L$, où V est le voltage appliqué sur la longueur totale, L , du capillaire) selon

l'équation suivante :

$$v_{ep} = \mu_{ep} E \quad (3)$$

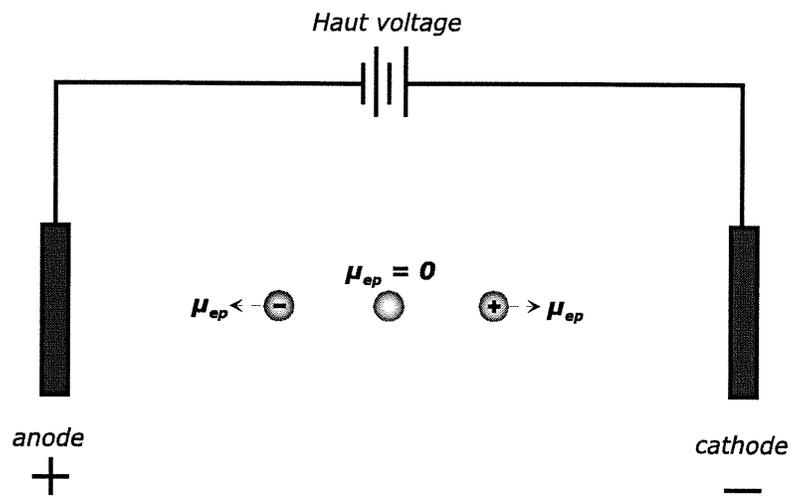


Figure 2 Comportement électrophorétique de particules cationique, anionique et neutre sous l'influence d'un champ électrique.

Si l'intensité du champ électrique est constante la mobilité électrophorétique définit la vitesse de migration d'une particule. La mobilité électrophorétique est régie par la loi de Stoke :

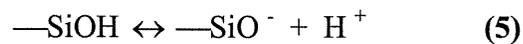
$$\mu_{ep} = \frac{Z e}{6 \pi \eta r} \quad (4)$$

où μ_{ep} est la mobilité électrophorétique, Z est la charge de la particule, e est la charge d'un électron, η est la viscosité du milieu, r le rayon hydrodynamique; c'est-à-dire r est le rayon hydratée que la particule possédera dans un milieu donné. La charge Z de la particule affectera la grandeur et l'orientation de la mobilité électrophorétique de celle-ci comme illustré à la figure 2. Les particules neutres ayant une charge égale à zéro auront une mobilité et une vitesse électrophorétique égale à zéro. Dans une expérience donnée, comme la viscosité du milieu, η , est constante, la mobilité

électrophorétique d'un ion est proportionnelle à son rapport charge sur rayon hydrodynamique $\left(\frac{Z}{r}\right)$.

Électro-osmose

L'électro-osmose est le déplacement libre d'un liquide électrolytique à l'intérieur d'un capillaire de silice fondue (quartz). Lorsqu'une solution aqueuse est en contact avec la silice, il y aura ionisation des groupements silanols (SiOH) à l'interface silice/solution selon la réaction suivante :



Le point isoélectrique, pI, des groupements silanols est de 1,5, c'est-à-dire qu'à un pH de 1,5, tous les silanols seront protonés (—SiOH). La constante d'équilibre pour cette réaction de dissociation acide exprimée en pK_a est d'environ 6, ce qui revient à dire qu'à un pH de 6, il y aura 50 % des silanols qui seront protonés. Lorsque une solution aqueuse possédant un pH plus grand que 1,5 est mise en contact avec de la silice à l'intérieur d'un capillaire, il y aura formation d'un potentiel de double couche électrique à l'interface silice/solution par l'adsorption de cation provenant de la solution électrolyte comme illustré à la figure 3.

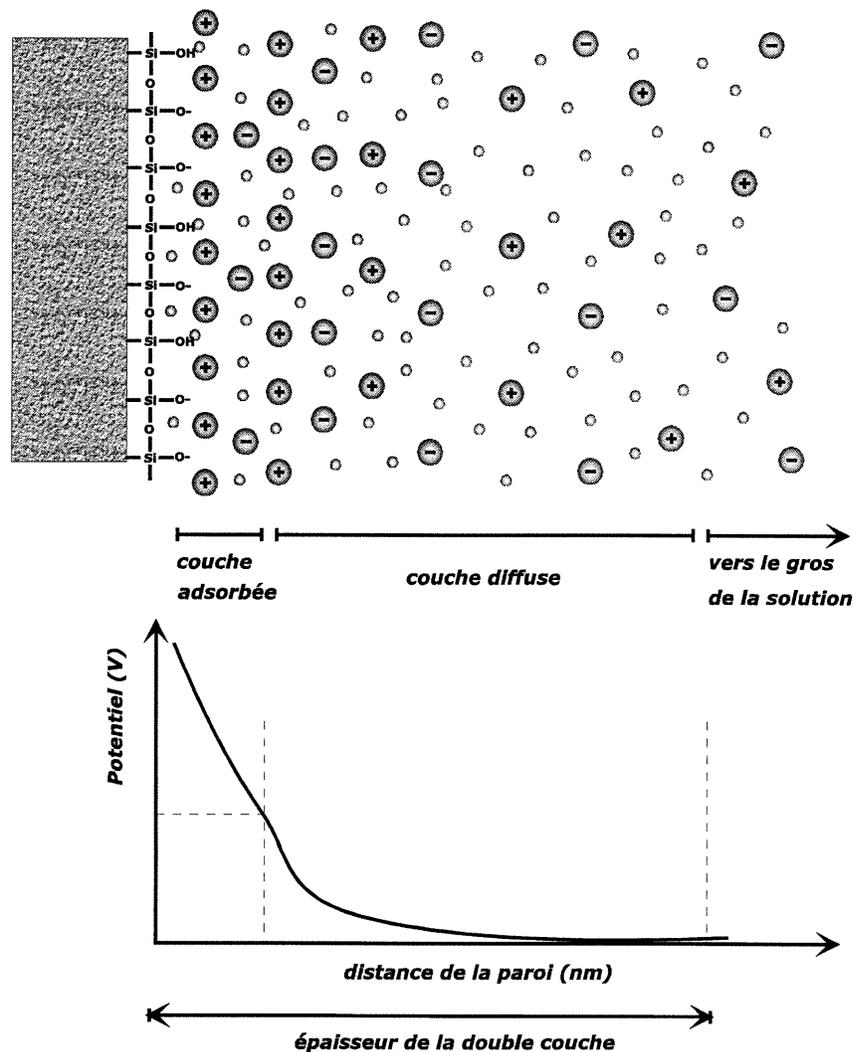


Figure 3 Formation de la double couche électrique à l'interface capillaire/solution.

La couche de cations adsorbés crée ainsi un potentiel électrique, ce potentiel est appelé le potentiel zêta ζ . Au moment où un potentiel électrique est appliqué entre les deux extrémités du capillaire, les cations près de la surface du capillaire (dans la couche diffuse, figure 3) se mettent en mouvement vers l'électrode négative (cathode) entraînant avec eux le liquide contenu dans le capillaire, c'est le phénomène

d'électro-osmose. Le mouvement du liquide dans le capillaire est appelé le débit électro-osmotique. La vitesse du débit électro-osmotique $v_{\text{déto}}$ est affectée par l'intensité du champ électrique et par la mobilité de la solution électrolytique selon l'équation :

$$v_{\text{déto}} = \mu_{\text{déto}} E \quad (6)$$

où $\mu_{\text{déto}}$ est la mobilité du débit électro-osmotique et E est l'intensité du champ électrique. La mobilité électro-osmotique sera fonction des paramètres de l'équation suivante :

$$\mu_{\text{déto}} = \frac{\varepsilon \zeta}{4 \pi \eta} \quad (7)$$

où ε est la constante diélectrique du milieu, ζ est le potentiel zêta à la paroi du capillaire, et η la viscosité du milieu. Le pH, la force ionique et la nature du milieu affecteront la mobilité électro-osmotique et donc le débit électro-osmotique.

Électrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire est la combinaison de l'électrophorèse et de l'électro-osmose. La figure 4 illustre le montage requis pour effectuer une expérience d'électrophorèse capillaire : un capillaire de silice fondue rempli d'une solution électrolyte est immergé dans deux réservoirs remplis de cette même solution où baignent deux électrodes de platine. L'injection de l'échantillon peut être effectuée du côté anodique de plusieurs manières. Les modes d'injections possibles sont de deux types : i) électrocinétique (application d'un voltage pendant un temps donné) ou bien ii) hydrodynamique (application d'une pression positive, négative ou par gravité).

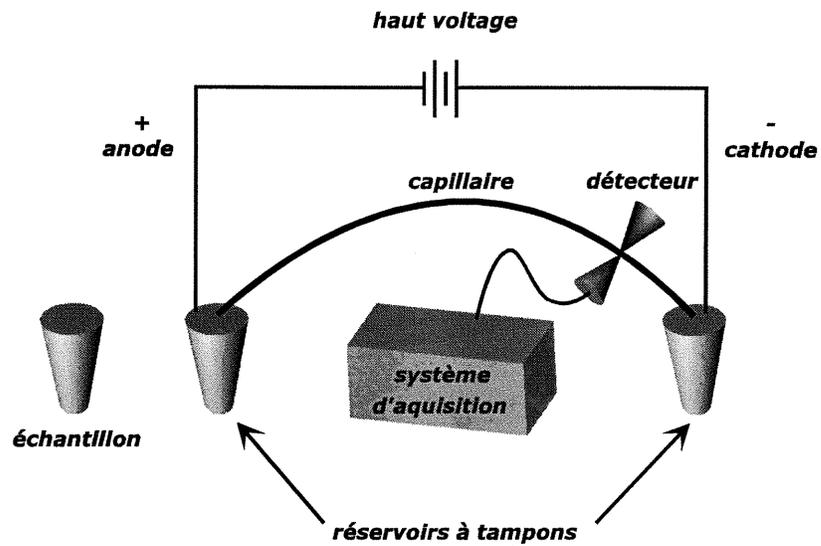


Figure 4 Schéma du montage en électrophorèse capillaire.

La vitesse avec laquelle un analyte se déplace est donnée par l'équation :

$$v_{ap} = v_{déo} + v_{ép} \quad (8)$$

1.2.2. Modes de séparations en électrophorèse capillaire

Il existe plusieurs modes de séparation possibles avec un appareil d'électrophorèse capillaire :

- a) Électrophorèse capillaire en solution libre
- b) Chromatographie électrocinétique capillaire
 - ▲ en milieu micellaire
 - ▲ avec une phase pseudo-stationnaire autre que les micelles
 - ▲ avec un support solide conventionnel (électrochromatographie capillaire)
- c) Isotachophorèse capillaire
- d) Électrophorèse capillaire sur gel
- e) Focalisation isoélectrique capillaire

a) Électrophorèse en solution libre

L'électrophorèse en solution libre est le premier mode qui a été décrit en électrophorèse capillaire dans les années 80 par Jorgensen. Il est possible de distinguer deux modes d'électrophorèse capillaire en solution libre : le *mode cathodique (i.e. normal)* et le *mode anodique (i.e. inversé)*. Par convention, le terme électrophorèse capillaire *en mode normal* est utilisé pour définir un débit électro-osmotique cathodique (dirigé de l'anode vers la cathode). Dans ce mode, la mobilité

du débit électro-osmotique $\mu_{\text{déo}}$ est dirigée dans la même direction que la mobilité électrophorétique $\mu_{\text{ép}}$ des cations (vers la cathode, l'électrode négative, figure 5 A) et dans ce cas, nous parlerons de séparation co-électro-osmotique pour les cations. Les anions en *mode normale* auront leur mobilité électrophorétique $\mu_{\text{ép}}$ opposée à celle du débit électro-osmotique $\mu_{\text{déo}}$ (figure 5 A), dans ce cas, nous parlerons d'une séparation à contre courant avec le débit électro-osmotique. Dans une telle expérience, c'est la mobilité apparente μ_{ap} qui est observée, cette dernière est la somme vectorielle de la mobilité du débit électro-osmotique $\mu_{\text{déo}}$ et de la mobilité électrophorétique $\mu_{\text{ép}}$ d'un analyte comme le montre l'équation :

$$\mu_{\text{ap}} = \mu_{\text{déo}} + \mu_{\text{ép}} \quad (9)$$

Il est possible en masquant la charge négative des groupements silanols avec des modificateurs de surface de changer le signe du potentiel zêta (55, 58) ce qui permettra d'inverser la direction du débit électro-osmotique (figure 5 B). Nous parlons maintenant l'électrophorèse capillaire en solution libre en *mode inversé* où la mobilité du débit électro-osmotique $\mu_{\text{déo}}$ est dirigée dans la même direction que la mobilité électrophorétique $\mu_{\text{ép}}$ des anions (vers l'anode) (figure 5 B). En pratique, le capillaire reste en place et seule la polarité des électrodes est permutée comme illustré aux figures 5 A et B. Les anions seront séparés co-électro-osmotiquement et les cations seront séparés à contre-courant. Ce qui permet de diminuer significativement le temps de migration des espèces anioniques. Dans les deux modes décrits précédemment, les ions qui se trouvent à contre-courant par rapport au mouvement du liquide dans le capillaire finiront par passer dans le détecteur, leur temps de migration

sera évidemment plus long. Cependant, certains ions possédant une mobilité électrophorétique plus grande que celle du débit électro-osmotique vont retourner dans la solution.

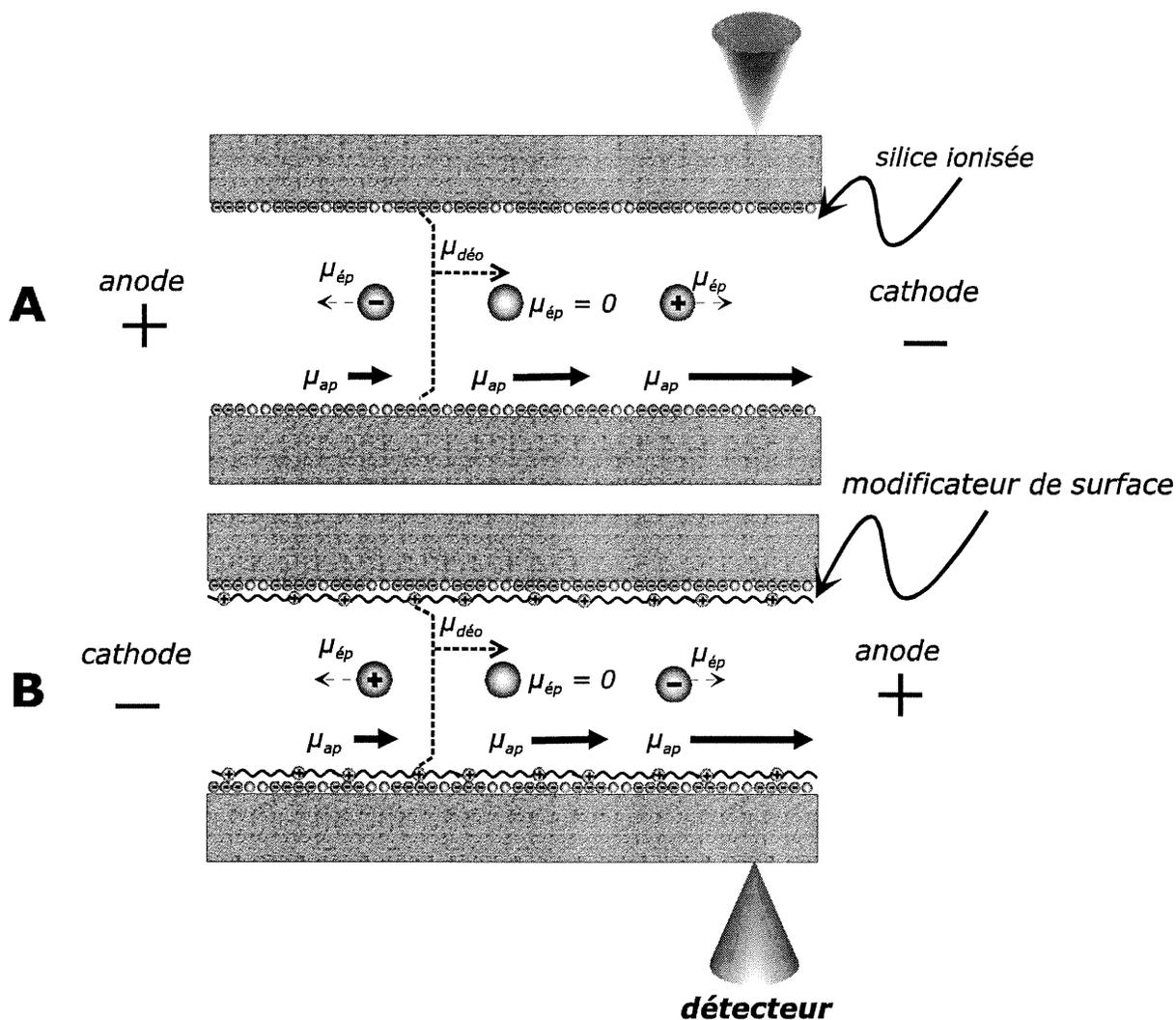


Figure 5 Représentation schématique de l'électrophorèse capillaire en solution libre A) en mode cathodique, et B) de l'électrophorèse capillaire en solution libre en mode anodique.

La sélectivité en électrophorèse capillaire en solution libre est essentiellement obtenue par la variation du pH de la solution tampon. En faisant varier le pH, la vitesse du débit électro-osmotique sera changée, mais surtout la charge partiel ou les charges portées par les analytes seront changées. Il sera possible de trouver un pH ou le rapport charge sur rayon hydrodynamique des analytes est différent d'un analyte à l'autre, ce qui pourra permettre leur séparation. Dans ce mode de séparation les espèces neutres ne peuvent pas être séparées; elles se déplaceront donc à la même vitesse que le débit électro-osmotique (figure 5 A), car elles possèdent une mobilité électrophorétique nulle. L'équation (8) nous indique que leur mobilité apparente sera égale à celle du débit électro-osmotique. En pratique, les espèces neutres servent à marquer la mobilité du débit électro-osmotique. D'autres modes de séparation (e.g. chromatographie électrocinétique capillaire) pourront permettre la séparation des espèces neutres.

b) Chromatographie électrocinétique capillaire

Cette méthode conserve la sélectivité de l'électrophorèse en solution libre tout en y ajoutant une nouvelle sélectivité provenant de la présence d'une phase qui peut retenir certains composés et en permettre leur séparation des autres. Il existe principalement trois types de phases qui participent à la rétention : les micelles, les autres phases pseudo-stationnaires et les phases stationnaires conventionnelles. Dans chacun des cas la technique porte un nom différent et ce nom est la chromatographie

électrocinétique en milieu micellaire, la chromatographie électrocinétique et l'électrochromatographie capillaire.

L'électrochromatographie capillaire est une combinaison entre la chromatographie liquide à haute pression et l'électrophorèse en solution libre. Dans ce mode une phase stationnaire conventionnelle, des billes d'octadécylsilane par exemple, est introduite dans un capillaire, et le déplacement de la « phase mobile » est assuré par le débit électro-osmotique. La rétention ajoutée par la présence de la phase stationnaire permettra d'ajouter un autre moyen d'augmenter la sélectivité de la séparation.

L'ajout de surfactants au tampon (e.g. dodécylsulfate de sodium) à des concentrations supérieures à leur concentration micellaire critique permet la formation de micelles à l'intérieur du capillaire qui agiront comme phase pseudo-stationnaire (phase en mouvement permettant la rétention de certains analytes). L'ajout de micelles permet d'ajouter de la rétention par i) effet hydrophobe à l'intérieur de la micelle et/ou du pairage d'ions avec la tête chargée de la micelle. La séparation des analytes dans ce mode est appelée la chromatographie électrocinétique en milieu micellaire.

Finalement, les analytes peuvent être retenus par la formation de complexes tels : les complexes d'inclusions (cyclodextrine) (58) et les complexes ioniques (49, 64) (pairage d'ion). Ces substances sont introduites dans le tampon et peuvent posséder à peu près toutes les mobilités électrophorétiques possibles (i.e. de négative à positive en passant par zéro).

c) Isotachophorèse capillaire

L'isotachophorèse est une méthode d'électrophorèse utilisant un système de tampon discontinu dans lequel le moyen de séparation est créé par les composants de l'échantillon (figure 6) (65).

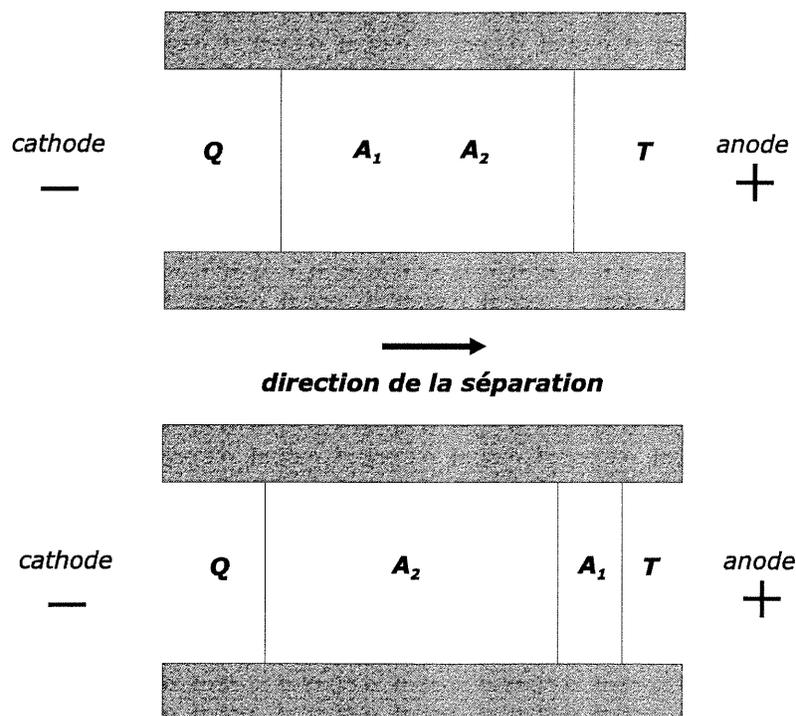


Figure 6 Représentation schématique de l'isotachophorèse capillaire, où Q est l'électrolyte de « queue », A_1 et A_2 sont les analytes et T est l'électrolyte de « tête ».

En isotachophorèse capillaire, tous les ions migrent à la même vitesse lorsque l'état stationnaire est obtenu. La mobilité du contre-ion dans l'électrolyte de tête, T est plus grande que la mobilité de tous les ions contenus dans l'échantillon. Une fois l'électrolyte de tête choisi, l'échantillon est injecté à l'entrée du capillaire, et le

capillaire est plongé dans l'électrolyte de « queue » "tailing electrolyte" (figure 6 en haut). La mobilité du contre-ion dans l'électrolyte de « queue », Q , est plus petite que la mobilité de tous les ions de l'échantillon. La séparation est basée sur la mobilité différentielle des analytes avec un train de bandes d'analytes migrant à travers du capillaire comme illustré au bas de la figure 6. L'analyte A_1 possède une grande mobilité, mais est présent à plus faible concentration (i.e. zone étroite à la figure 6 en bas). Par contre, l'analyte A_2 possède une mobilité plus faible, mais est présent à une concentration plus élevée (i.e zone plus large à la figure 6 en bas). Lorsque que le potentiel est appliqué, l'analyte A_1 migrera devant l'analyte A_2 . L'analyte A_1 , qui est le plus mobile, ne peut pas entrer dans la zone de l'électrolyte de « tête » d'une manière électrophorétique, parce que sa mobilité électrophorétique est plus petite que celle de l'électrolyte de « tête ». Si jamais il entrait dans l'électrolyte de « tête » par diffusion, il ralentirait à cause de la baisse de champ électrique. Au fur et à mesure que l'analyte A_1 enrichit la zone frontale, le champ électrique augmente pendant que l'échantillon se dilue devenant ainsi moins conducteur et l'empilement des analytes « stacking » commence.

Un appareil d'isotachophorèse demande typiquement un détecteur à conductivité ionique. L'isotachophérogramme correspondant à l'exemple illustré à la figure 6 est représenté à la figure 7.

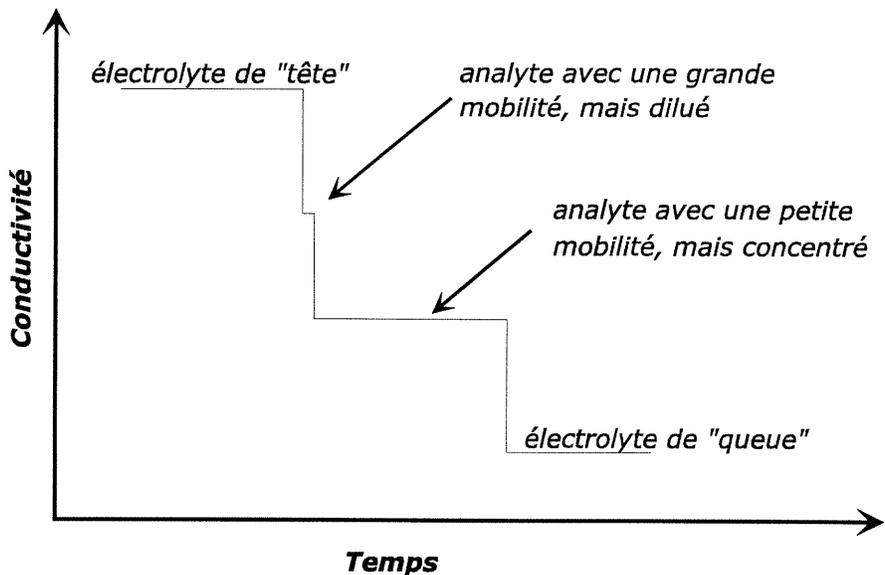


Figure 7 Isotachophérogramme représentant la séparation illustrée à la figure 6.

d) Électrophorèse capillaire sur gel

En électrophorèse capillaire sur gel, l'intérieur du capillaire contient un gel (i.e. matrice de polymère) qui diminuera considérablement le potentiel zêta à la paroi du capillaire ce qui a pour effet de diminuer et même d'éliminer le débit électro-osmotique. Ce mode de séparation est généralement utilisé pour la séparation de macromolécules possédant des charges similaires, mais des masses moléculaires différentes. La sélectivité de la séparation est évidemment basée sur l'électrophorèse, mais la plus grande partie de la sélectivité provient du fait que les molécules sont tamisées par les pores du gel permettant d'obtenir une sélectivité massique.

e) Focalisation isoélectrique capillaire

La focalisation isoélectrique « classique » est une technique de séparation très puissante qui permet d'obtenir une haute résolution pour des mélanges de protéines très complexes (29). La focalisation isoélectrique capillaire combine cette puissance de résolution aux avantages d'automatisation et de quantification qu'offre un instrument d'électrophorèse capillaire (29,30). Hjerten, en 1985, fut le premier à effectuer la focalisation isoélectrique à l'intérieur d'un capillaire (31-36).

L'échantillon est solubilisé dans une solution ampholytique (produits commerciaux pour la focalisation isoélectrique « classique »), et le tout est injecté dans un capillaire, préalablement rempli d'une solution catholytique (typiquement NaOH), jusqu'à la fenêtre de détection (figure 8 a). Il est possible d'injecter jusqu'à quelques microlitres d'échantillon à l'intérieur du capillaire sans que la qualité de la séparation soit affectée. Il faut comparer ceci aux 10 nL que l'on peut injecter dans n'importe quel autre mode de séparation en électrophorèse capillaire. La figure 8 montre, en trois étapes, comment se déroule la focalisation isoélectrique capillaire. Une fois l'injection réalisée, la solution d'échantillons et d'ampholytes est remplacée par l'anolyte (typiquement H_3PO_4). Ensuite, un haut voltage est appliqué entre les deux extrémités du capillaire baignant respectivement dans l'anolyte et le catholyte. Les ions hydroxydes de la solution catholytique se mettent à migrer vers l'anode et les protons de la solution anolytique feront de même vers la cathode. Ils « titreront » chacun de leur côté la solution d'ampholyte et d'échantillon créant ainsi un gradient

de pH à l'intérieur du capillaire. Les ampholytes ont pour rôle de conserver le gradient de pH à l'intérieur du capillaire.

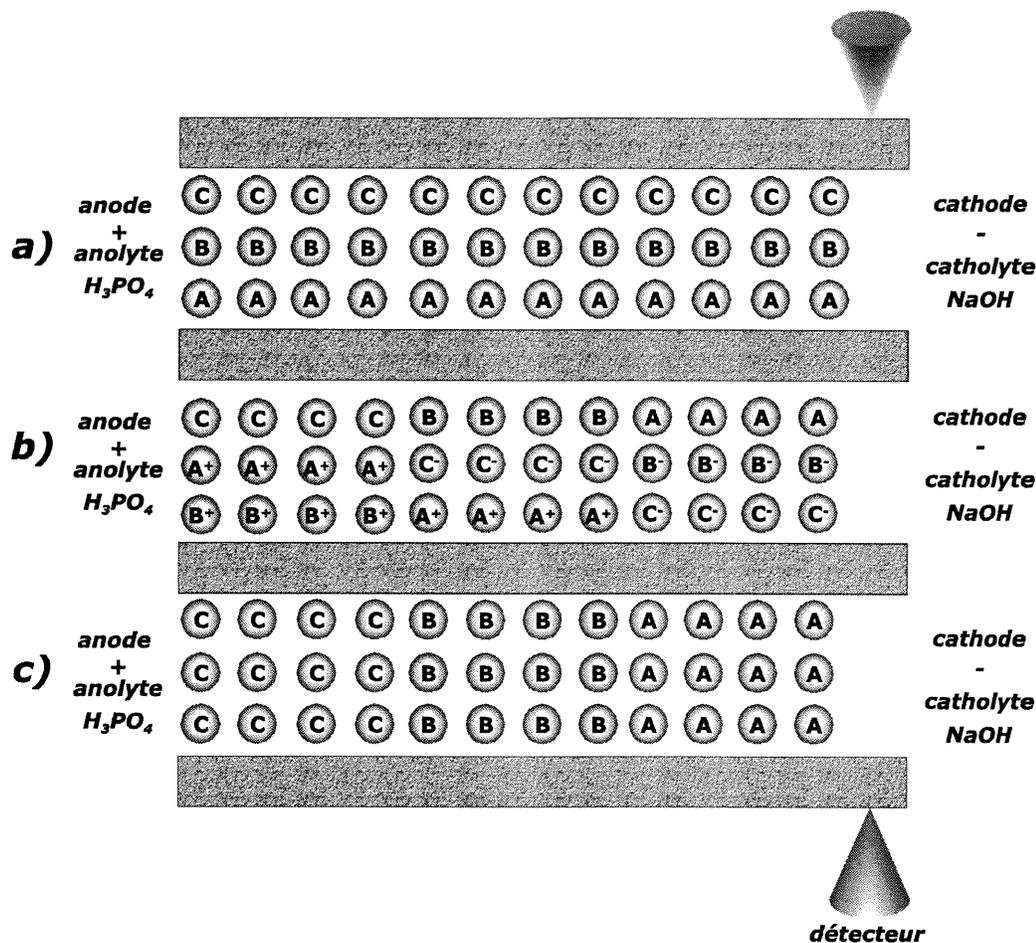


Figure 8 Focalisation et séparation de trois différentes molécules A, B et C au a) stade initial, b) pendant la focalisation, et c) lorsque les trois molécules sont focalisées.

La figure 8 montre la focalisation des analytes A, B et C. L'analyte C étant le plus acide (point isoélectrique bas) sera focalisé dans une zone située près de l'anode, tandis que l'analyte A étant le plus basique sera focalisé dans une zone près de la cathode (figure 8 c). B possédant un point isoélectrique intermédiaire entre A et C

(figure 8 c) aura un comportement intermédiaire. Au début de la focalisation, tous les analytes sont distribués aléatoirement et uniformément dans le capillaire comme illustré à la figure 8 a). Lorsque **A** se situe près de l'anode (région acide, figure 8 b), il porte une charge positive. Au fur et à mesure que la focalisation se déroule, **A** va migrer d'une manière électrophorétique vers la cathode jusqu'à ce que sa charge soit nulle (i.e. son point isoélectrique, pI). À l'opposé **C** possédant une charge négative près de la cathode (région basique) migrera vers l'anode jusqu'à ce que sa charge soit nulle. Durant les premiers moments de la focalisation, le courant est à son maximum cela est dû à la présence de plusieurs charges qui peuvent le porter. Le courant diminuera tout au long de la focalisation jusqu'à ce qu'il atteigne son minimum à la fin de la focalisation. La variation du courant est utilisée comme marqueur de la fin de la focalisation (30).

En théorie, une fois la focalisation terminée, le liquide à l'intérieur du capillaire est immobile. Il faut maintenant mettre le liquide contenant les analytes séparés en mouvement pour les faire passer dans le détecteur. Il existe deux manières de pratiquer la focalisation isoélectrique capillaire : en deux étapes ou en une étape. La focalisation isoélectrique capillaire en deux étapes consiste à utiliser un capillaire revêtu qui permet d'enlever complètement le débit électro-osmotique (i.e. électro-osmose). Dans ce cas, une fois la focalisation terminée (première étape), il ne reste plus qu'à déplacer le liquide vers le détecteur (deuxième étape mobilisation). Il existe deux stratégies pour y parvenir : i) appliquer une pression à l'entrée du capillaire (29, 30), cette méthode induit un profil de vitesse parabolique contribuant à

l'élargissement des pics, ou ii) remplacer l'anolyte par un sel afin de mettre en mouvement le liquide (31-36); un profil de vitesse électro-osmotique est observé dans ce cas. La focalisation isoélectrique capillaire en une seule étape utilise un capillaire de silice fondue conventionnel. L'objectif est de réduire suffisamment le débit électro-osmotique en utilisant un additif au catholyte (tel l'hydroxy-propyle-méthyle-cellulose), pour permettre une focalisation dynamique (38-44) à l'intérieur du capillaire (29, 30).

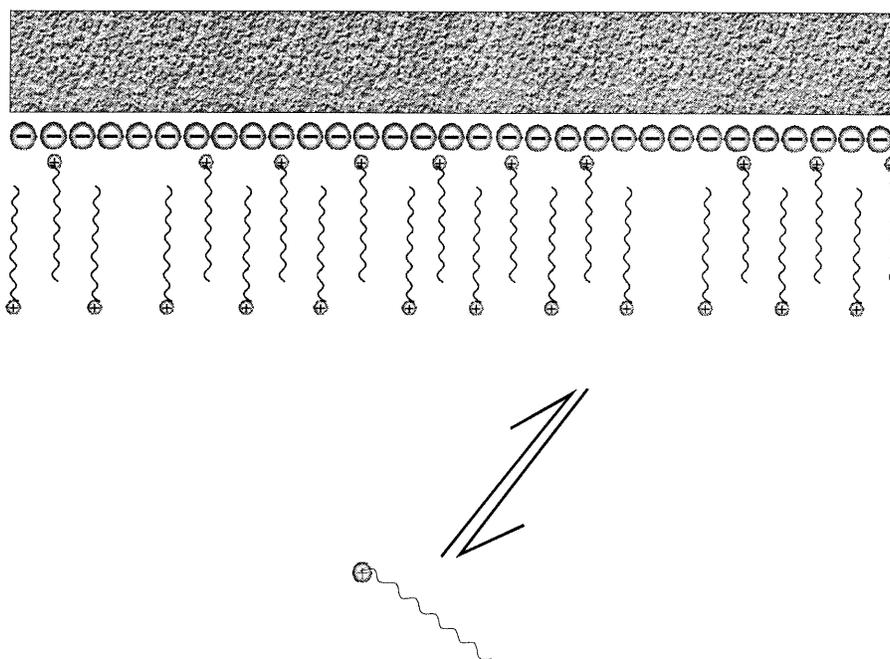
1.3. Choix du mode de séparations selon les organiques

Cette section vise à explorer quels modes de séparation pourraient s'appliquer aux diverses familles de composés organiques contenues dans la liqueur Bayer.

1.3.1. Acides carboxyliques : aliphatiques et aromatiques

La majorité des molécules organiques contenues dans la liqueur Bayer possède au moins une fonction qui peut porter au moins une fraction de charge négative à un pH alcalin, il sera donc possible d'appliquer l'électrophorèse capillaire à la séparation de ce mélange complexe. La stratégie la plus répandue pour la séparation des anions (acides carboxyliques) est l'électrophorèse capillaire en solution libre en mode anodique (45-56, 60, 61). Cette stratégie permet de réduire le temps de migration des anions par rapport au mode cathodique. Pour effectuer une séparation en électrophorèse capillaire en solution libre en mode anodique, il faut d'abord inverser

le débit électro-osmotique. Pour ce faire, la polarité du potentiel zêta ζ à la paroi du capillaire doit être permutée en transformant la charge négative des groupements silanols de la paroi interne du capillaire en une charge positive. Il existe deux manières d'y parvenir : i) en modifiant la surface du capillaire avec une amine quaternaire attachée de manière covalente à la paroi de silice (66, 67) ou bien ii) de manière dynamique (57, 60, 68-70) (ajout de surfactant dans l'électrolyte de support lui-même). La modification du débit électro-osmotique de manière dynamique est la stratégie la plus utilisée, probablement parce que la modification chimique permanente de la surface du capillaire demande une chimie longue et complexe et que la reproductibilité du revêtement n'est pas encore très bonne. La figure 9 illustre la modification de la surface du capillaire de silice avec des surfactants par la formation d'une couche hémimicellaire. Pour réaliser cette couche, un surfactant cationique est ajouté dans l'électrolyte de support en dessous de sa concentration micellaire critique (70). Les surfactants nécessaires pour inverser le débit électro-osmotique de cette manière, sont des bromures d'alkyle-triméthyle ammonium qui possèdent une tête chargée positivement et une longue chaîne alkyle possédant de 12 à 18 carbones.



bromure d'alkyltriméthyle ammonium

Figure 9 Formation d'hémimicelles à l'aide de surfactant de type bromure d'alkyltriméthyle ammonium.

Il existe plusieurs autres moyens dynamiques d'inverser le débit électro-osmotique, entre autre par l'utilisation : i) de métaux (e.g. Ca^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} et Mg^{2+}) (73), ii) de polymères cationiques (e.g. bromure d'hexadiméthrine) (57, 60, 74) et iii) de macrocycles en combinaison avec des alcalins (e.g. éther couronne et K^+) (69).

Les acides carboxyliques aromatiques contenus dans la liqueur Bayer proviennent probablement de la dégradation de la lignine dans le milieu basique qu'est la liqueur, mais pourraient aussi même provenir de produits de dégradation de la matière humique (figure 10). Les acides carboxyliques aliphatiques sont probablement des

produits de dégradation des aromatiques et/ou des chaînes qui permettent l'assemblage des macromolécules.

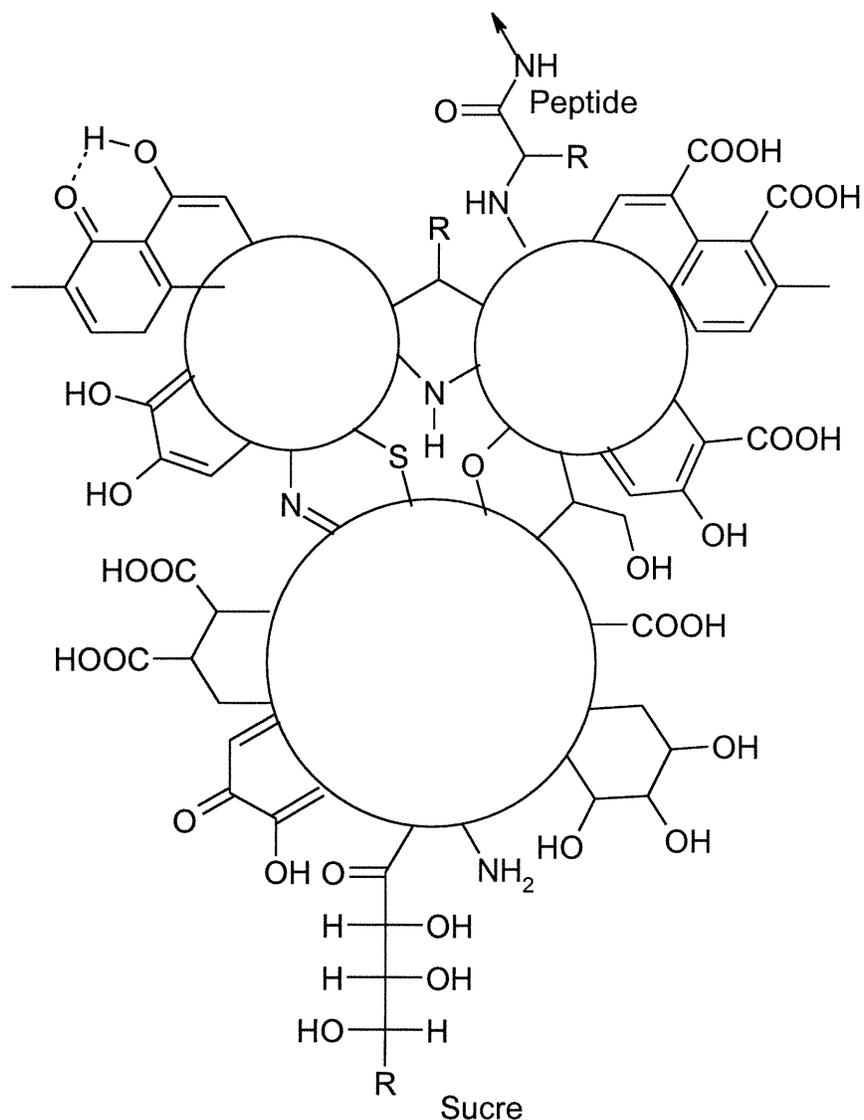


Figure 10 Structure hypothétique proposée pour les acides humiques (22)

Les complexes d'inclusions avec la cavité des cyclodextrines sont très utilisés pour la résolution d'isomères chiraux depuis les travaux de Terabe et *al.* (58). Khaled et *al.* ont appliqué l'utilisation de ces complexes à la séparation d'isomères d'acides mono,

di- et tri- carboxyliques en électrophorèse capillaire en solution libre en mode cathodique (59). Ils ont également essayé d'inverser le débit électro-osmotique avec des surfactants de type bromure d'alkyle-triméthyle ammonium afin de diminuer le temps d'analyse, mais sans grand succès. Buchberger et *al.* ont utilisé la β -cyclodextrine en combinaison avec l'ion barium(II) pour optimiser une méthode de séparation des acides carboxyliques aliphatiques et aromatiques (49). Comme Khaled et *al.*, ils ont proposé que la longue queue hydrophobe de surfactant de type bromure d'alkyle-triméthyle ammonium pouvait entrer compétition avec les analytes pour se loger dans la cavité de la cyclodextrine qui est hydrophobe (49, 59). De plus, Masselter et Zemann ont démontré que la longue queue (C_{12} - C_{18}) des surfactants de type bromure d'alkyle-triméthyle ammonium donne de fortes interactions avec les analytes hydrophobes comparativement à des modificateurs de débit électro-osmotique en matériau de polymère comme le bromure d'hexadiméthrine (figure 11) qui possède des groupes méthyles pour lesquels ces interactions sont réduites au minimum (61).

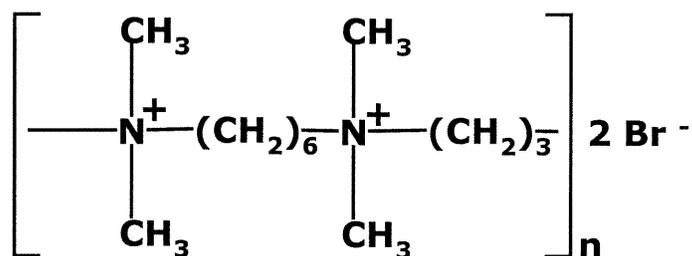


Figure 11 Structure du bromure d'hexadiméthrine.

Le bromure d'hexadiméthrine peut renverser convenablement le débit électro-osmotique à une concentration de 1 à 2 μM soit mille fois plus faible que la concentration nécessaire avec du bromure d'alkyle-triméthyle ammonium (0,28 à 14 mM). Dans la perspective de l'utilisation du bromure d'hexadiméthrine en présence de cyclodextrine, on peut admettre que le modificateur de débit électro-osmotique en matériaux polymère, de par sa taille, ne pourra pas entrer à l'intérieur de la cyclodextrine. La figure 12 compare les équilibres possibles avec l'utilisation de cyclodextrine avec ces deux modificateurs de débit électro-osmotique.

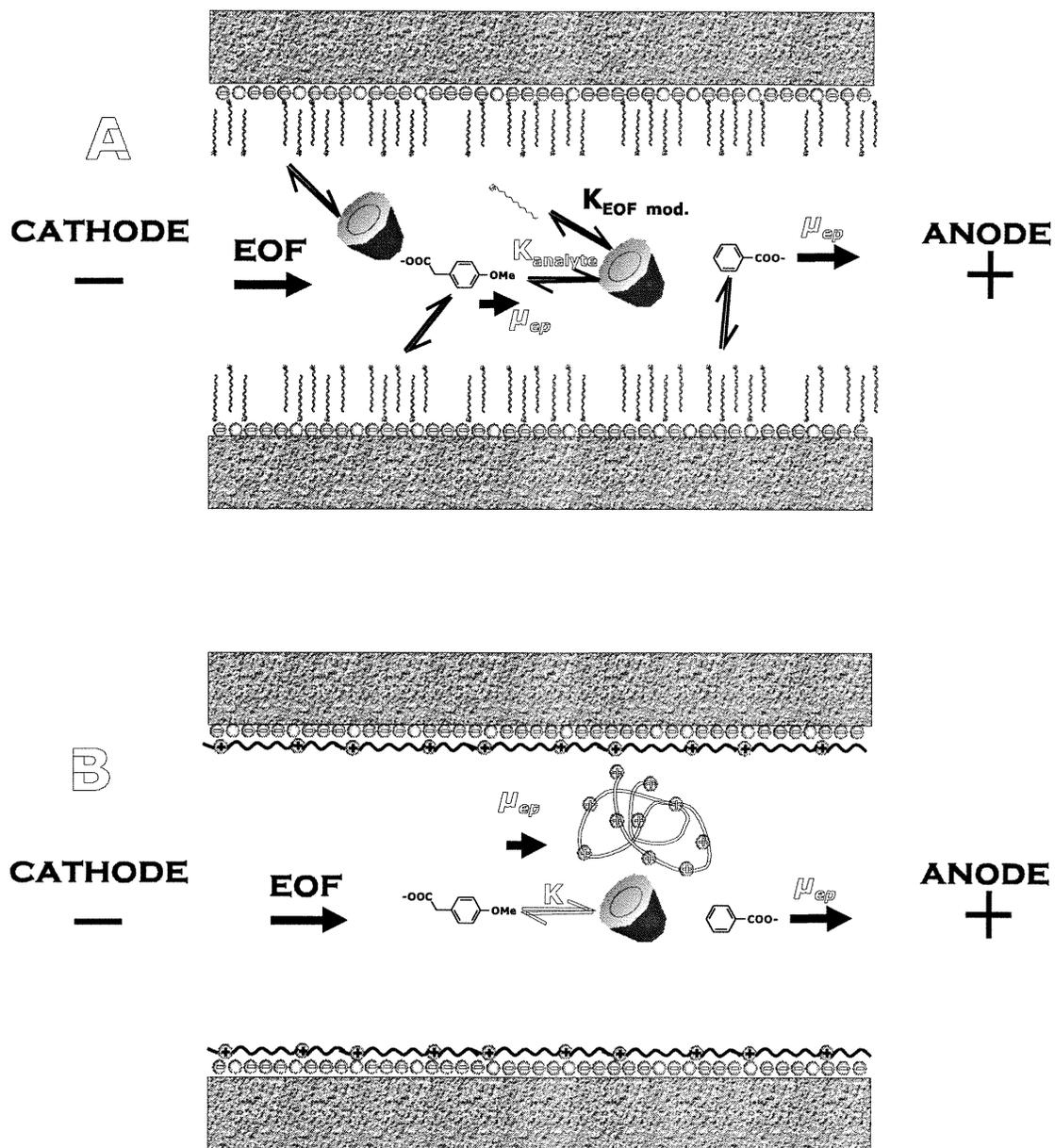


Figure 12 Comparaison des équilibres impliqués entre deux différents type de modificateurs de débit électro-osmotique et la cyclodextrine; *A* : surfactant cationique, *B* : surfactant polycationique.

Détection

Le mode de détection le mieux adapté à l'électrophorèse capillaire, jusqu'à présent, est encore la détection spectrophotométrique d'absorption dans l'ultraviolet et le visible, parce que la détection se fait directement sur le capillaire après l'enlèvement de l'enveloppe protectrice de polyimide. La détection sur colonne a pour avantage de ne pas induire de volume mort comme le ferait une méthode de détection qui demande l'implantation d'une cellule de détection.

La détection des acides carboxyliques aliphatiques par spectrophotométrie directe pose cependant un problème, car ces molécules ne possèdent pas de chromophores assez intenses dans l'ultraviolet et le visible. Il est possible de les détecter de manière indirecte ce qui se fait par ajout au tampon d'une substance-sonde qui absorbe la radiation lumineuse. La diminution de la concentration de cette substance-sonde dans la zone de détection produite par la migration des autres ions, qui n'absorbent pas, entraîne une baisse de l'absorbance de la substance-sonde (i.e. pic négatif) et permet la détection indirecte de ces substances non-absorbantes. Ce tampon chromophorique doit également posséder une bonne capacité tampon et doit posséder une mobilité dans le voisinage de celle des analytes (75).

La détection des acides carboxyliques aromatiques peut par contre être effectuée directement à 214 nm dans un tampon possédant une faible absorbance et avec une bonne sensibilité (61).

La détection des substances humiques peut être réalisée par spectrophotométrie directe dans le visible à environ 400 nm (8, 9).

Limite de détection

La limite de détection est la concentration d'un analyte qui donne un signal équivalent à trois fois l'écart type σ du bruit sur le signal de fond du blanc. Une droite d'étalonnage doit être tracée afin d'évaluer la sensibilité S (i.e. $S \equiv$ pente de la droite d'étalonnage) du détecteur pour cet analyte. La limite de détection (LD) se calcule à l'aide de l'équation suivante :

$$LD = \frac{3\sigma}{S} \quad (10)$$

1.3.2. Macromolécules : substances humiques

Les substances humiques sont un mélange complexe de plusieurs composés organiques formés dans le sol et dans l'eau par la dégradation chimique et biologique de résidus végétal et animal ainsi que par l'activité synthétique de certains micro-organismes. D'un point de vue physico-chimique, ce sont des polymère d'acides organiques de couleur brune avec un grand nombre de fonctions carboxyliques et phénoliques (76). Jusqu'à présent les méthodes de séparations utilisées ne parviennent pas à les séparer entièrement. Deux grandes familles peuvent être distinguées : les acides humiques et les acides fulviques. Les acides humiques

possèdent des masses moléculaires plus importantes que les acides fulviques. Les acides humiques sont insolubles à pH acide, tandis que les acides fulviques le sont peu importe le pH et cette propriété permet de les séparer. Présentement, les chercheurs parviennent seulement à obtenir une empreinte des acides humiques et des acides fulviques que ce soit par une méthode électrophorétique ou par une méthode chromatographique (15-25). Les meilleures séparations ont été réalisées en focalisation isoélectrique « classique » (18, 77) et en isotachophorèse capillaire à deux dimensions (15). Dunkelog et ses collaborateurs, après avoir comparé l'électrophorèse capillaire en solution libre, l'électrophorèse capillaire sur gel, la chromatographie électrocinétique capillaire en milieu micellaire, l'électrophorèse avec gradient de gel et la focalisation isoélectrique « classique », viennent à la conclusion que la focalisation isoélectrique « classique » est la seule méthode qui puisse parvenir à la séparation des acides humiques et fulviques (18). Il serait donc intéressant d'appliquer la focalisation isoélectrique capillaire à la séparation des acides humiques et fulviques vu les nombreux avantages de cette méthode par rapport à la méthode classique. La détection des acides humiques n'est pas compromise par l'absorption des ampholytes, comme c'est le cas pour la détection des protéines. Les protéines possédant des chromophores absorbant plus bas que 280 nm (comme pour les substances ampholytiques de focalisation isoélectrique « classique »). Par contre, dans le cas des acides humiques, la détection se faisant dans le visible, où les substances ampholytiques n'absorbent pas, cela nous permettra d'obtenir des limites de détections inégalées compte tenu du volume d'injection utilisé en focalisation isoélectrique capillaire.

2. Matériels et méthodes

2.1. Appareillages

Deux systèmes d'électrophorèse capillaire ont été utilisés, le premier système est un appareil Beckman P/ACE 5500 (Fullerton, CA, USA) muni de deux détecteurs (spectrophotométrique à longueur d'onde fixe et spectrophotométrique à barrettes de diode). L'acquisition et le traitement des données ont été réalisés grâce au logiciel Beckman P/ACE Station 1.0.

Le deuxième système (appareil « artisanal ») a été réalisé à l'aide d'une source de haut voltage de marque Spellman (modèle : RHR30PN30, Plainview, NY, USA). Un détecteur spectrophotométrique provenant d'un chromatographe ionique (VWD, Dionex Corp., Sunnyvale, CA, USA) ou bien un détecteur à conductivité ionique (CDM-1, Dionex Corp.) ont été modifiés pour les besoins de l'électrophorèse capillaire. Un ordinateur IBM PS/2 (modèle 70) muni d'une interface Waters et du logiciel MAXIMA 820 (Waters, Milford, MA, USA) a été utilisé pour l'acquisition des données sur cet appareil.

2.2. Matériels

2.2.1. Composés organiques étalons

Toutes les solutions étalons ont été préparées par dilution d'une solution mère contenant environ 1 000 mg L⁻¹ de l'analyte. Selon la disponibilité, ces solutions

mères ont été réalisées par dissolution (dans NaOH 100 mM) des sels de sodium ou potassium de l'acide ou même de l'acide lui-même. Tous ces étalons proviennent de plusieurs fournisseurs différents, mais sont tous de qualité supérieure à 99 %.

2.2.2. Focalisation isoélectrique capillaire

La solution d'ampholytes 40 % (m/v) pH 2-11 et l'hydroxyl-propyl-méthyl-cellulose HPMC (viscosité d'une solution 2 % à 20 °C de 80 à 120 centipoises) est commercialisée par Sigma-Aldrich Canada Ltd. (Oakville, ON, Canada). Un capillaire de silice fondue (Polymicro Technologies, Bloomfield, NJ, USA) de 360 μm de diamètre externe, 75 μm de diamètre interne et de 77 cm de longueur, où la fenêtre de détection se trouve à 70 cm, a été utilisé pour effectuer les séparations en focalisation isoélectrique capillaire. L'acide phosphorique provient de BDH (Toronto, ON, Canada)

2.2.3. Électrophorèse capillaire en solution libre et chromatographie électrocinétique capillaire

Un capillaire de silice fondue (Polymicro Technologies) de 360 μm de diamètre externe, 50 μm de diamètre interne et de 57 cm de longueur, où la cellule de détection se trouve à 50 cm, a été utilisé pour effectuer les séparations. Le bromure d'hexadiméthrine (HDB ou 1,5-diméthyl-1,5-diazal-undeca-méthylène polyméthobromure), le tris(hydroxyl-méthyl) aminométhane, l'acétonitrile de qualité

HPLC, le bromure dodécyl-triméthyl-ammonium, le mélange étalon d'humates de sodium, le phosphate de sodium dibasique de qualité électrophorèse capillaire (ÉC), le tétraborate de sodium de qualité ÉC, l'urée, le CrO_3 et la 2-hydroxyl-propyl- β -cyclodextrine sont commercialisés par Aldrich (Milwaukee, WI, USA). L'eau qui a servi à la préparation de toutes les solutions aqueuses est de l'eau purifiée sortant d'un système Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA) possédant une résistivité supérieure à $18 \text{ M}\Omega\text{cm}$.

2.2.4 Conductivité ionique après suppressions

Le fil qui a servi à la construction de la cellule de conductivité ionique est un don du professeur P. K. Dasgupta (Texas Tech University). La membrane de NafionTM qui a servi à construire le supprimeur est un don de D. Leighty de Perma-Pure Products, Tom's River, NJ, USA. Les tubes de polyéthylène sont commercialisés par Chromatographic Specialties Inc. (Brockville, ON, CA), mais sont manufacturés par Intramedic (No. 7405, diamètre interne de $380 \mu\text{m}$, diamètre externe de $1,09 \text{ mm}$).

2.3. Manipulations

2.3.1. Séparation des composés aliphatiques

Détection par conductivité ionique après suppression

Un détecteur à conductivité ionique après suppression fut construit selon les travaux de Dasgupta et *al.* (83, 85) comme illustré à la figure 13.

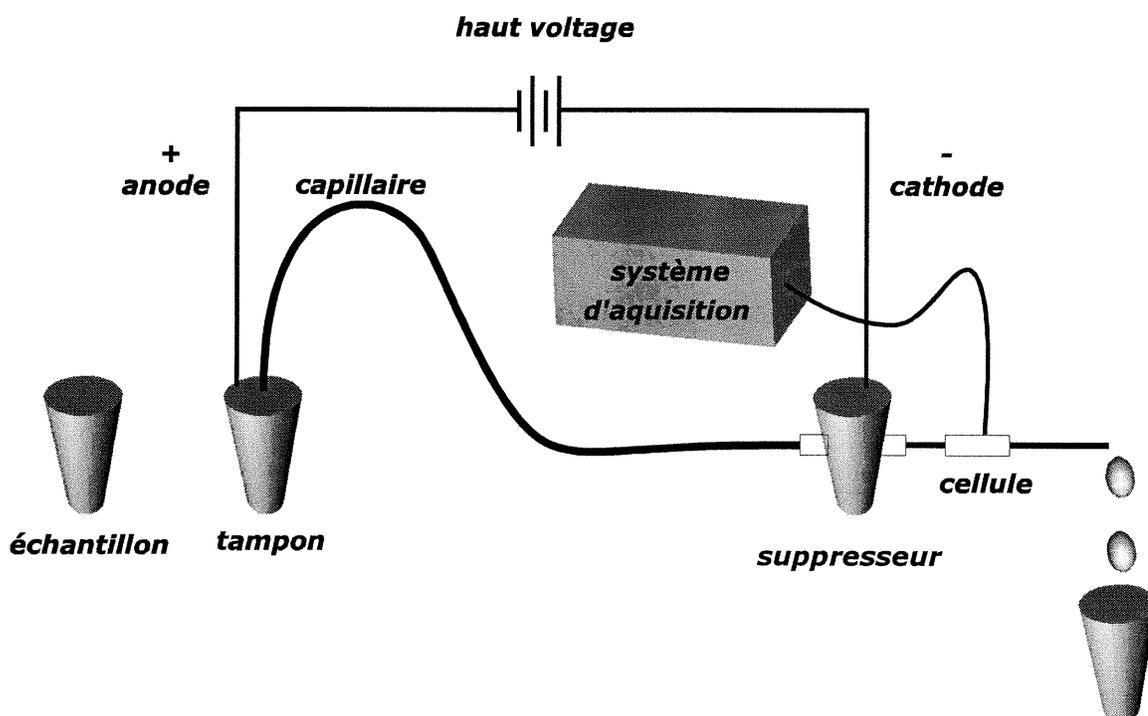


Figure 13 Montage pour la détection par conductivité ionique après suppression.

Le mode de séparation est limité à l'électrophorèse en solution libre en mode cathodique (anions migrant à contre courant avec le débit électro-osmotique) avec un

tel montage. Le supprimeur est constitué d'une membrane échangeuse de cations (Nafion™) qui permet d'échanger les ions hydronium de la solution d'acide sulfurique dilué vers le tampon afin de neutraliser les ions hydroxyde contenus dans le tampon. Cette opération a pour but de diminuer la conductivité du tampon ce qui a pour effet d'augmenter le rapport signal sur fond d'un facteur 100. Pour respecter la loi de l'électroneutralité, les ions sodium feront le chemin inverse. Le contre-ion (Na^+) des analytes chargés négativement sera remplacé par un ion hydronium (H_3O^+), ils permettront d'augmenter la conductivité de l'analyte car le nombre de transport des ions hydronium ($t_{\text{H}_3\text{O}^+} \sim 0,8$) est supérieur à celui des ions Na^+ ($t_{\text{Na}^+} \sim 0,5$) augmentant ainsi la conductivité de l'analyte. Cette opération augmente le rapport signal sur fond.

La construction du supprimeur de conductivité ionique est réalisée à l'aide de tube en polyéthylène de diamètre interne voisin de celui du capillaire de séparation, c'est-à-dire environ 375 μm versus 365 μm pour le capillaire. La figure 14 montre les détails de construction de ce dernier. Un récipient Eppendorf™ de 1 500 μL est utilisé comme réservoir à liquide de suppression (H_2SO_4 5 mM). Deux trous sont percés de part et d'autre du récipient pour permettre aux tubes de polyéthylène d'être fixés à l'aide de colle époxy. Le capillaire est tout simplement maintenu serré dans le tube de polypropylène. La membrane de Nafion de dimensions voisines au capillaire est introduite afin de traverser le récipient sur environ 8 mm.

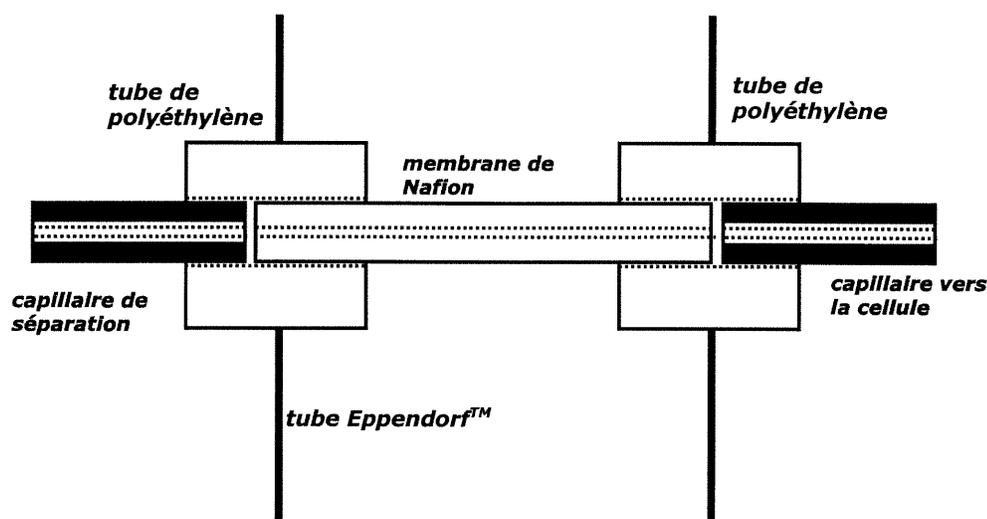


Figure 14 Schéma de construction du supprimeur.

La cellule de détection est construite à partir d'un tube de polyéthylène où un trou de 250 μm de diamètre est percé afin d'introduire deux fils de nickel. Avant d'être introduit dans l'orifice, la couche protectrice de polyimide sur les fils est retirée à l'aide d'acide sulfurique concentré à température de la pièce. Une fois le fil aligné, sous le microscope, comme illustré à la figure 15, de la colle époxy est appliquée avec soin afin de garder l'alignement. Une fois la colle durcie, les deux fils sont reliés via un câble coaxial au module de conductivité Dionex CDM-1 et le montage peut être complété comme illustré à la figure 13.

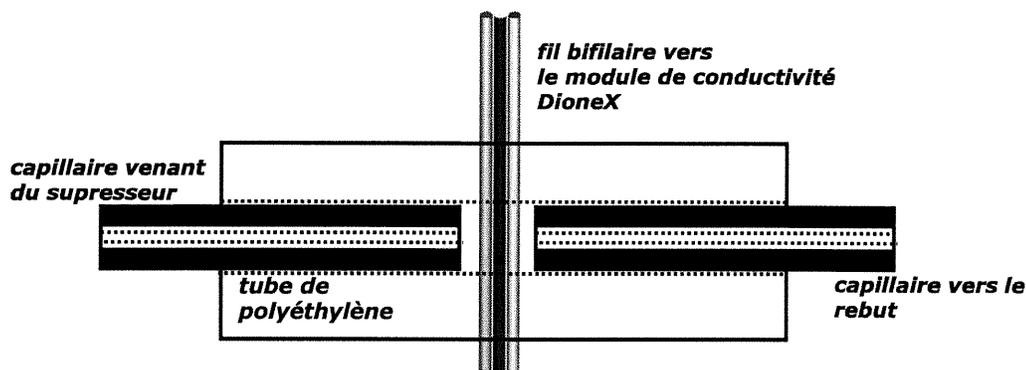


Figure 15 Schéma de construction de la cellule de conductivité ionique.

Les conditions de séparation sont : une solution électrolyte de 2 mM en $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (Borax) à pH 9,01 (pH de la solution de 2 mM), un capillaire de silice fondue de 360 μm de diamètre externe, 75 μm de diamètre interne et de 60 cm de long (Polymicro Technologies). La séparation est réalisée par un voltage de +24 kV. Le module de détection par conductivité ionique CDM-1 de Dionex (provenant d'un chromatographe ionique) a été utilisé pour les mesures.

Détection spectrophotométrique indirecte

Cette dernière est réalisée à 265 nm à l'aide d'un tampon mixte constitué de 5 mM CrO_3 ($\text{CrO}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{CrO}_4$), 20 mM TRIS (tris(hydroxyl-méthyl)aminométhane), 5 M urée, 10 % (v/v) acétonitrile, 0,5 mM bromure dodécyl-triméthyl-ammonium à pH 8,63. Un voltage de -25 kV est appliqué entre les deux extrémités du capillaire. Les liqueurs sont préalablement diluées cinq fois dans un tampon 10 mM CrO_3 et 40 mM TRIS à pH 8,5. L'injection est ensuite réalisée par

gravité en élevant l'échantillon de 100 mm et en submergeant le capillaire dans ce dernier pendant 10 secondes.

La détection spectrophotométrique indirecte effectuée lors de la séparation rapide d'acides carboxyliques aliphatiques a été réalisée à 265 nm. Un tampon composé de 5 mM CrO_4^{2-} , 0,001 % (m/v) HDB (bromure d'hexadiméthrine) ajusté à pH 9,03 (avant ajout d'acétonitrile), 10 % (v/v) acétonitrile. Les dimensions du capillaire sont : 365 μm de diamètre externe, 50 μm de diamètre interne, 24 cm de long, où la fenêtre de détection est à 8 cm de la sortie. Un voltage de -30 kV a été utilisé pour la séparation.

2.3.2. Focalisation isoélectrique capillaire des acides humiques

Les expériences de focalisation isoélectrique ont été réalisées sur un appareil commercial Beckman P/ACE 5500 avec un détecteur à barrettes de diodes. Le domaine de longueur d'onde exploré pendant ces expériences est de 250 à 500 nm sachant que les acides humiques possèdent un maximum d'absorption dans la région de 400 nm (8, 9). Le capillaire est conditionné au début de chaque journée de manipulation par la séquence de rinçage suivante :

Solution	Temps (min)
NaOH 1 M	20
H ₂ O	20
HCl 1 M	20
Catholyte : 20 mM NaOH + 0,06 % (m/v) HPMC	20

Ensuite, entre chaque injection la séquence de rinçage est la suivante :

Solution	Temps (min)
NaOH 100 mM	5
H ₂ O	5
Catholyte : 20 mM NaOH + 0,06 % (m/v) HPMC	5

La solution d'humates de sodium étalon Aldrich est préparée par la dissolution de 4,14 mg d'humates de sodium dans 1 mL de NaOH 150 mM. L'extraction des acides humiques de la liqueur Bayer est effectuée comme suit : 20 mL de liqueur Bayer sont acidifiés à pH 1,5 afin de faire précipiter les acides humiques, et cette solution est agitée jusqu'à ce que la température de cette dernière atteigne celle de la pièce. Une fois les acides humiques précipités, la solution aqueuse est passée sur un filtre Whatman # 42 afin de recueillir le précipité. Le précipité est ensuite dissous dans 2 mL d'une solution de NaOH 150 mM.

Pour chaque échantillon, 140 μL de solution d'humates de sodium sont mélangés avec 60 μL d'ampholyte 40 % (m/v) pH 2-11 avec 300 μL d'eau purifiée afin de diluer l'ampholyte à une concentration de 5 % (m/v) et les analytes à une concentration d'environ 1 mg/mL . Ces solutions sont ensuite injectées pendant 15 secondes à haute pression (20 psi) correspondant à un volume d'injection d'environ 1,1 μL . Un voltage de +24 kV est appliqué entre l'anolyte (10 mM H_3PO_4) et le catholyte (20 mM NaOH + 0,06 % (m/v) hydroxyl-propyl-méthyl-cellulose).

2.3.3. Séparation des composés aromatiques

Pour l'empreinte des différentes liqueurs Bayer, la détection spectrophotométrique est réalisée directement à 214 nm. Le tampon est constitué d'une solution de 50 mM tétraborate de sodium à pH 10,01 avec 0,001 % (m/v) de bromure d'hexadiméthrine. L'injection des liqueurs pures a été réalisée par gravité (5 cm, 2 s). Un voltage de - 7 kV a été appliqué.

Pour le reste des manipulations, un voltage de - 24 kV fut appliqué sur l'appareil Beckman P/ACE 5500 muni du détecteur spectrophotométrique ultraviolet et d'un filtre passe bande permettant de mesurer l'absorbance à 214 nm. Les tampons sont constitués de 25 mM de tétraborate de sodium, 25 mM de Na_2HPO_4 et de 0,001 % (m/v) de bromure d'hexadiméthrine et le pH a été ensuite ajusté avec une solution de NaOH 50 % (m/m) (i.e. 8,794 M). La 2-hydroxyl-propyl- β -cyclodextrine est ajoutée au tampon, lorsque mentionné, à des concentrations 2, 4 ou 6 mM. L'injection est

réalisée hydrodynamiquement par l'application d'une pression de 0,5 psi pendant 5 s, ce qui correspond à l'injection de 4,5 nL d'échantillon.

Extraction liquide-liquide

Un échantillon de 25,00 mL de liqueur est placé dans une ampoule à extraction de 250 mL, on ajoute du HCl 38 % (environ 25 mL) jusqu'à pH 2. Ensuite, 5 g de NaCl sont dissous dans ce mélange encore chaud. La solution est ensuite extraite avec 3 portions de 10 mL de chloroforme. Le chloroforme est ensuite évaporé sous pression réduite, et l'huile odorante est ensuite solubilisée dans 4 mL de NaOH 100 mM et peut maintenant être injectée directement dans l'appareil d'électrophorèse capillaire.

3. Résultats et discussion

Cette section vise à discuter des résultats obtenus pour la séparation des différentes familles de composés organiques contenues dans la liqueur Bayer. En premier lieu, la discussion des résultats portera sur les empreintes obtenus pour les divers familles d'organiques qui se retrouve dans la liqueur Bayer, par la suite les performances de séparations obtenues pour les acides carboxyliques aliphatiques par électrophorèse capillaire en solution libre en mode anodique seront discutées, suivie de la séparation des acides humiques par focalisation isoélectrique capillaire, et pour terminer, de l'élaboration d'une méthode de séparation des acides carboxyliques aromatiques par électrophorèse capillaire en solution libre en mode anodique en combinaison avec la chromatographie électrocinétique capillaire suivie de leur analyse quantitative.

3.1. Empreinte des différentes familles d'organiques

Dans le but de comparer rapidement la composition des différentes familles de composés dans deux différentes liqueurs Bayer, des empreintes obtenues par détection spectrophotométrique ultraviolette indirecte en électrophorèse capillaire en solution libre en mode anodique ont été réalisés. La figure 16 montre deux cas limites obtenus avec les liqueurs provenant de l'usine Vaudreuil (tracé en bleu) et de l'usine Q.A.L. (tracé en rouge). Les autres liqueurs investiguées (Aughinish, Ouro Preto et Alunort) donnent des résultats intermédiaires et ne sont pas présentées à la figure 16 pour simplifier la figure. Les premiers pics (zone A, figure 16) correspondent à la

migration des acides organiques aliphatiques ainsi qu'aux acides inorganiques. Les massifs triangulaires qui suivent (dans la zone B, figure 16) sont des acides carboxyliques aromatiques qui possèdent des interactions avec le modificateur de débit électro-osmotique, le bromure de dodécyltriméthyle ammonium, conformément au résultat obtenu par Masselter et Zemann (61). Les pics négatifs vers 11,5 minutes (frontière de la zone B et C, verte pâle) correspondents probablement à la migration des espèces neutres ou non-ionisées à pH 8,63, elles marquent la mobilité du débit électro-osmotique. Les grands massifs qui se trouvent dans la zone C (figure 16), ont été attribués aux acides humiques par « dopage » avec un mélange étalon d'acides humiques. Si le pic négatif correspond au passage des espèces neutres, les acides humiques sont chargés positivement à ce pH et/ou sont retenus fortement par adsorption sur les parois du capillaire, car ils migrent après le débit électro-osmotique. L'utilisation de modificateur organique comme l'acétonitrile dans le tampon permet d'augmenter l'efficacité de séparation en contribuant à un effet isotachophorétique, l'entassement ou « stacking » (*voir section 1.2.2 c*) pour plus d'information sur l'effet d'entassement). De plus, l'ajout de modificateur organique abaisse la constante de dissociation des acides organiques (62, 108, 109) permettant ainsi d'augmenter la sélectivité de la séparation. Une concentration de 10 % (v/v) en acétonitrile a été retenue après avoir étudié des concentrations de 5, 10, 15, 20, 25 et 30 % (v/v). Cette concentration (10 % (v/v)) a été retenue parce qu'elle est la concentration en acétonitrile où la sélectivité de séparation est la meilleure.

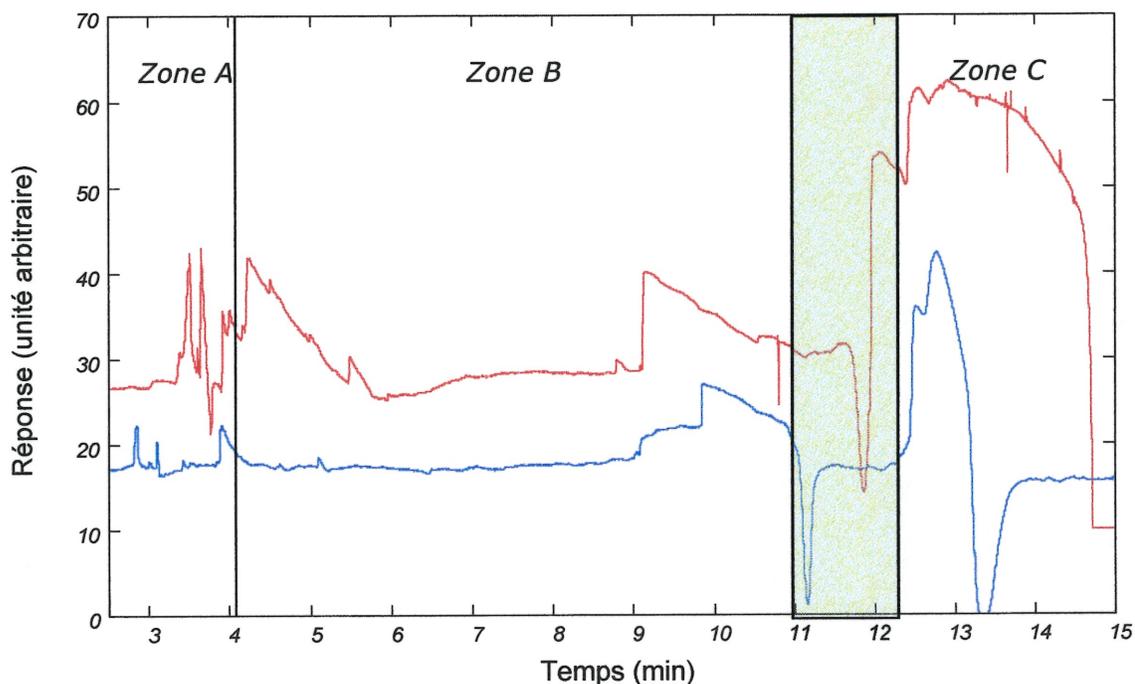


Figure 16 Empreinte obtenue par spectrophotométrie indirecte de liqueur Bayer en électrophorèse capillaire en solution libre en mode inversé (bleu Vaudreuil, rouge Q.A.L.). Électrolyte de support : 5 mM CrO₃, 0,5 mM bromure de dodécyl-triméthylammonium, 10 % (v/v) CH₃CN, 5 M urée, pH 8,63; capillaire de silice : 50 µm de diamètre interne, 24 cm de longueur et 16 cm de longueur effective; Voltage de séparation : - 30 kV; longueur d'onde de détection : 265 nm.

Dans le but de briser les enchevêtrements entre les molécules d'acides humiques (16), de l'urée a été ajoutée dans le tampon. Après avoir étudié des concentrations de 2, 5, 8 et 10 M en urée, une concentration de 5 M a été retenue. Cette concentration en urée permet de faire apparaître plusieurs pics dans la région des acides humiques. En plus de briser les agrégats d'acides humiques, l'urée augmente beaucoup la viscosité du tampon et augmente ainsi la fenêtre de migration.

La figure 16 montre qu'il est possible d'obtenir des empreintes des différentes familles d'organique contenues dans la liqueur Bayer pour évaluer rapidement leur présence. Il serait intéressant de reprendre cette expérience à un pH plus élevé afin de voir si la sélectivité de la séparation s'améliore pour mieux différencier les différentes familles de composés dans les empreintes. Il est également possible de remarquer à la figure 16 que la ligne de base ne revient pas à sa valeur initiale après la migration des acides humiques, ce phénomène est probablement dû à l'adsorption de ceux-ci sur la couche hémimicellaire. En appliquant une séquence de lavage de 2 minutes avec du NaOH 100 mM, 2 minutes H₂O et de 2 minutes tampon, on retrouve la ligne de base d'origine. Cela appuie l'hypothèse de l'existence d'interactions hydrophobes entre les acides humiques et le modificateur de débit électro-osmotique. Les résultats de ces expériences montrent la difficulté de séparer toutes les composés organiques en utilisant seulement la sélectivité de l'électrophorèse capillaire en solution libre en mode inversé.

3.2. Acides carboxyliques aliphatiques

La littérature est relativement bien documentée sur la séparation et la détection des acides carboxyliques aliphatiques dans la liqueur Bayer par spectrophotométrie ultraviolet indirecte (96-108). Ce mode de détection n'est généralement pas très sensible et donne une limite de détection d'environ 10^{-5} M ($3\sigma/s$). Comme nous souhaitons une meilleure limite de détection, la construction d'un détecteur à conductivité ionique après suppression a été réalisée (83, 85). Ce type de détecteur

donne une limite de détection de 10^{-8} M ($^3\sigma/s$) (83). La figure 17 montre l'électrophérogramme de la séparation d'un mélange de 7 acides carboxyliques aliphatiques (figure 18 a) réalisée en électrophorèse capillaire en solution libre en mode cathodique (i.e. la mobilité électrophorétique des anions est à contre-courant du débit électro-osmotique). La conductivité très élevée au début (pas visible entre 0 et 2 minutes sur la figure 17 à cause de l'échelle), est due à présence de tampon, dont la conductivité n'a pas été supprimée dans la cellule de détection. Cette situation peut être évitée par un préconditionnement à haut voltage qui permet de supprimer la conductivité due au tampon et remplacer le tampon de rinçage dans la cellule, mais cette opération n'est pas nécessaire si l'analyse des cations n'est pas requise.

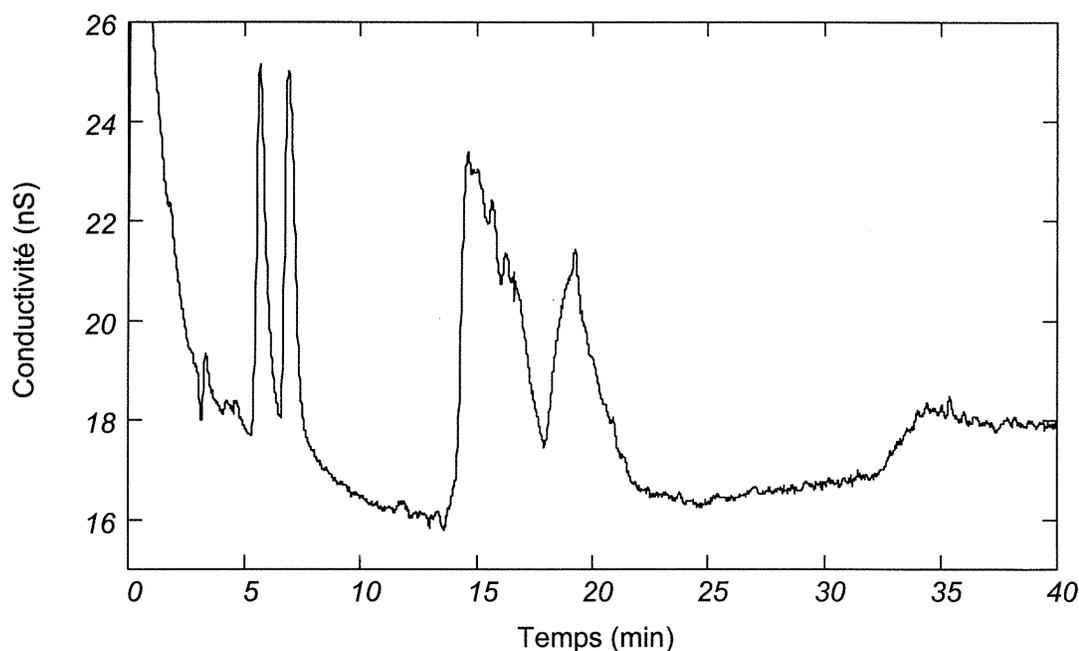
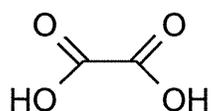


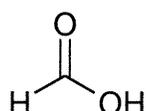
Figure 17 *Électrophérogramme d'un mélange étalon de 7 acides carboxyliques aliphatique obtenu pour une séparation en électrophorèse capillaire en solution libre en mode cathodique avec détection par conductivité ionique après suppression. Électrolyte de support : 2 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, pH 9,01; capillaire de silice : 75 μm de diamètre interne, 60 cm de longueur; Solution de suppression : 5 mM H_2SO_4 ; Voltage de séparation : + 24 kV.*

La suppression de la conductivité du tampon est très efficace; la conductivité observée au début est environ 1 000 μS (pas visible entre 0 et 2 minutes sur la figure 17 à cause de l'échelle) tandis qu'après la suppression, elle est d'environ 16 nS soit deux décades plus basses. Au début de 1998, Zemmann et *al.* ont mis au point un détecteur à conductivité ionique capacitif sur colonne sans contact (93), c'est-à-dire sans cellule de détection (i.e. sans volume mort). La limite de détection est de 5×10^{-6} M ($^3\sigma/s$), mais pourrait être améliorée en utilisant une meilleure électronique (93) ou par l'utilisation d'un supprimeur de conductivité ionique. Ce type de cellule devient particulièrement intéressant pour la détection en électrophorèse capillaire sur colonne, car il n'exclut pas l'utilisation simultanée de la détection spectrophotométrique. Une telle combinaison pourrait être intéressante car elle combinerait un détecteur universel (i.e. conductivité ionique) à un détecteur sélectif (i.e. spectrophotométrique).

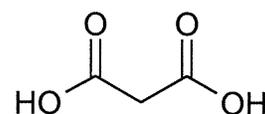
L'efficacité de séparation des pics à 5,50 min ($N = 1435$ N/m) et à 6,87 min ($N = 1434$ N/m) n'est pas très bonne par rapport à ce à l'efficacité de séparation normalement observée pour une détection sur colonne ($> 100\ 000$ N/m). Un grand volume mort induit par le supprimeur avant le détecteur est probablement responsable de cette piètre efficacité de séparation. Le problème pourrait être réglé en utilisant une membrane échangeuse de cations de diamètre plus proche à celui du capillaire de séparation. Les travaux sur ce système ont été abandonnés à cause du manque de disponibilité de membranes échangeuses de cations de dimensions compatibles avec la cellule.



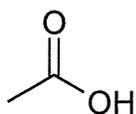
1 acide oxalique
 $Z/M = -22,72 \times 10^{-3} \text{ mol/g}$
 $pK_{a1} = 1,271$
 $pK_{a2} = 4,276$



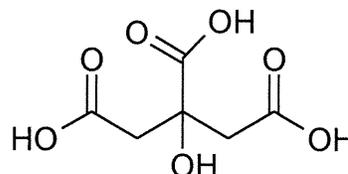
2 acide formique
 $Z/M = -22,22 \times 10^{-3} \text{ mol/g}$
 $pK_a = 3,739$



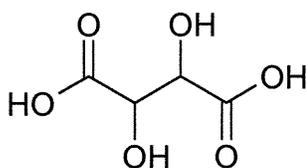
3 acide malonique
 $Z/M = -19,60 \times 10^{-3} \text{ mol/g}$



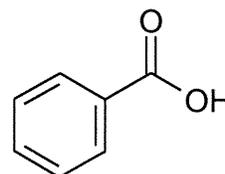
4 acide acétique
 $Z/M = -16,96 \times 10^{-3} \text{ mol/g}$
 $pK_a = 4,74$



5 acide citrique
 $Z/M = -15,86 \times 10^{-3} \text{ mol/g}$
 $pK_{a1} = 3,128$
 $pK_{a2} = 4,761$
 $pK_{a3} = 6,396$



6 acide tartarique
 $Z/M = -13,51 \times 10^{-3} \text{ mol/g}$
 $pK_{a1} = 2,93$
 $pK_{a2} = 4,23$



7 acide benzoïque
 $Z/M = -8,257 \times 10^{-3} \text{ mol/g}$
 $pK_a = 4,194$

Figure 18 a Structure et propriétés (95) des acides carboxyliques aliphatiques séparés à la figure 18 b.

3.2.1. Spectrophotométrie indirecte

Une séparation rapide d'une série d'acides carboxyliques aliphatiques réalisée par mesure spectrophotométrique indirecte à 265 nm avec un tampon chromate (pH 9,03) est présentée à la figure 18 b. Les sept acides carboxyliques ont été séparés avec une résolution supérieure à 1,5 en 30 secondes. Il est à noter que la valeur de l'ordonnée a été inversée dans l'électrophérogramme présenté à la figure 18 b (pratique fréquente dans la littérature pour présenter un électrophérogramme obtenu par détection indirecte). L'attribution des pics est présentée à la figure 18 a. Les acides carboxyliques deviennent anioniques lorsqu'ils sont injectés dans le tampon basique. Comme les acides carboxyliques aliphatiques ne possèdent pas de chromophore absorbant à 265 nm, leur passage dans le détecteur amène une baisse de l'absorbance parce qu'ils déplacent la substance sonde (chromate) contenue dans le tampon. Par contre, l'anion benzoate possède un chromophore plus intense que le chromate à cette longueur d'onde, produisant une inversion du pic par rapport aux pics des aliphatiques. À pH 9,03 tous les acides carboxyliques aliphatiques ($pK_a < 6,4$ figure 18 a) contenus dans le mélange possèdent le maximum de charge négative qu'ils peuvent porter. L'attribution des pics faite par « dopage » confirme l'ordre de migration selon le rapport charge sur masse (figure 18 a). Ce dernier diminue lorsque le temps de migration augmente.

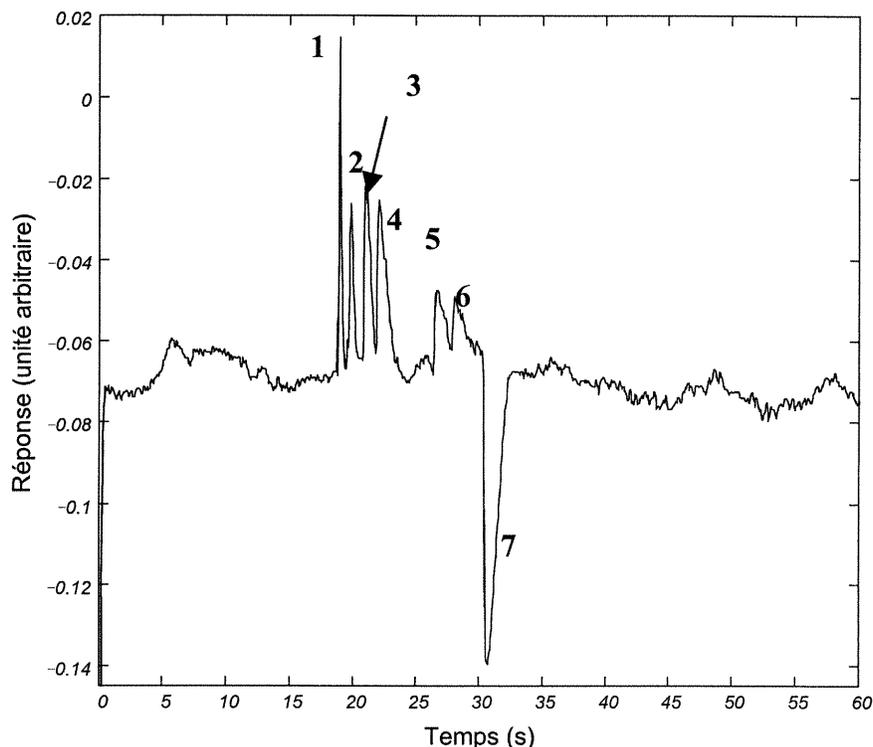


Figure 18 b Séparation rapide d'une solution étalon d'acides carboxyliques aliphatiques. Électrolyte de support : 5 mM Na_2CrO_4 , 0,001 % (m/v) HDB, 10 % (v/v) CH_3CN , pH 9,03; capillaire de silice : 50 μm de diamètre interne, 24 cm de longueur et 16 cm de longueur effective; Voltage de séparation : - 30 kV; longueur d'onde de détection : 265 nm.

3.2.2. Performances obtenues pour la séparation des acides carboxyliques aliphatiques

La séparation rapide des acides carboxyliques aliphatiques est possible en moins de 30 secondes comme le montre la figure 18 b. De plus, l'ordre de migration est relié au rapport charge sur masse. À pH 9,03, les acides carboxyliques portent le maximum de charge négative pour la fonction acide, ce qui porte à croire que les fonctions alcool des acides tartarique et citrique ne sont pas ou peu ionisées à ce pH.

3.3. Acides humiques

Cette section vise à explorer la possibilité d'appliquer la focalisation isoélectrique capillaire dynamique pour la séparation des acides humiques.

3.3.1. Focalisation isoélectrique capillaire

La séparation des acides humiques a été réalisée par focalisation isoélectrique capillaire. Les acides humiques possèdent un maximum d'absorption dans le visible à 400 nm (8, 9) et les ampholytes absorbent fortement dans l'ultraviolet sous 280 nm (30). Un domaine de longueur d'onde allant de 250 à 500 nm a été choisi afin de suivre la progression des ampholytes et de détecter les acides humiques. Dans cette expérience, la détection des acides humiques n'est pas compromise par l'absorbance des ampholytes, comme c'est le cas avec la détection des protéines (chromophore souvent sous 280 nm), en focalisation isoélectrique capillaire. Cette différence fait de la focalisation isoélectrique capillaire une méthode de choix pour la séparation et la détection des acides humiques. De plus, dans cette méthode, la grande quantité d'échantillon pouvant être injectée ne pourra qu'aider à la détection de cette famille de composés organiques présente dans la liqueur Bayer à une concentration de quelques grammes par litre.

Une des premières étapes dans l'élaboration d'une méthode de focalisation isoélectrique est d'explorer la plus grande gamme de points isoélectriques possible afin de situer le domaine de points isoélectriques entre lesquels les analytes sont focalisés. L'utilisation d'étalons, dont les points isoélectriques sont connus avec

précision et couvrant le gradient de pH, permet de relier le temps de séparation au point isoélectrique. Une fois cette étape exploratoire effectuée, le domaine de points isoélectriques couverts par les ampholytes peut être restreint afin d'augmenter la résolution. Les ampholytes qui couvrent le plus grand domaine de points isoélectriques (pI compris entre 2 et 11), sont ceux qui ont été utilisés dans le présent travail. L'utilisation de 0,06 % (m/v) d'hydroxy-propyl-méthyl-cellulose dans le catholyte constitué de 20 mM NaOH permet de réduire la vitesse du débit électro-osmotique afin de laisser le temps à la focalisation de se terminer avant le passage du détecteur (40, 42).

La figure 19 montre la séparation obtenue pour les acides humiques contenus dans le mélange étalon par focalisation isoélectrique capillaire par mobilisation dynamique (en une étape). Il est possible de remarquer à la figure 19 en arrière plan « un mur » qui correspond à la grande absorption des ampholytes (< 280 nm), l'apparition de ce « mur » vers 10 minutes correspond au remplacement du catholyte dans le détecteur par les ampholytes. De plus, un changement d'indice de réfraction dû au remplacement de la solution catholytique très visqueuse par les ampholytes dilués dans l'eau, peut être à l'origine de l'absorption sur le domaine de longueur d'onde étudié à ce temps de séparation. L'ordre temporelle de focalisation sera le suivant : les substances possédant un point isoélectrique basique jusqu'au pI le plus acide. Les acides humiques sont focalisés entre 25 et 50 minutes, ils possèdent un maximum d'absorption à 380 nm conformément aux travaux qui ont déjà été réalisés par Gordon Lever (8).

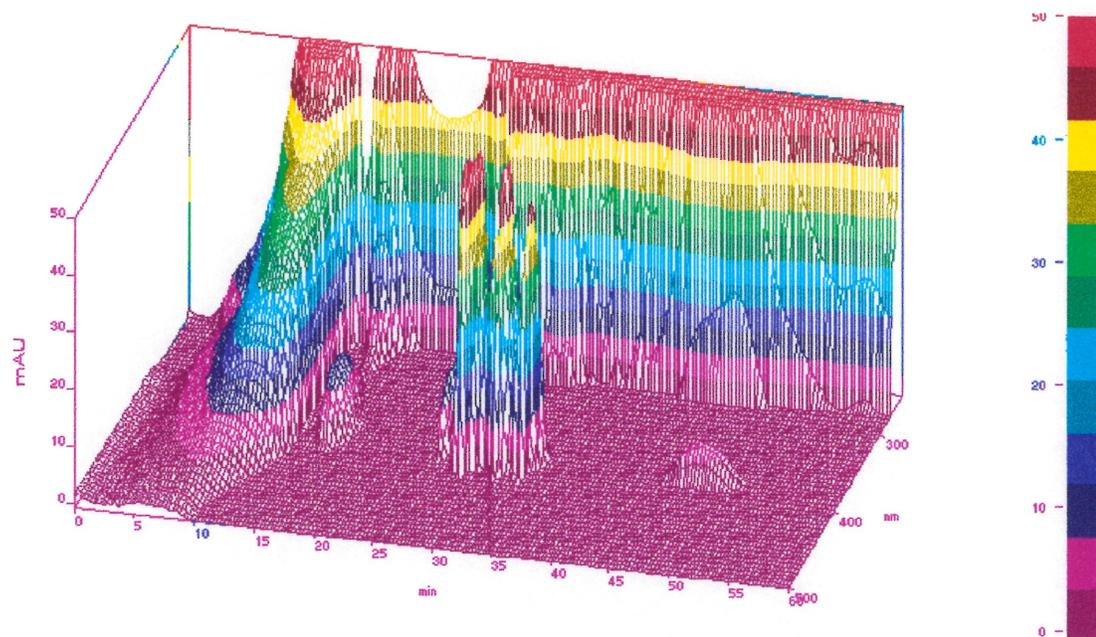


Figure 19 Focalisation isoélectrique capillaire du mélange étalon d'humates de sodium étalons.

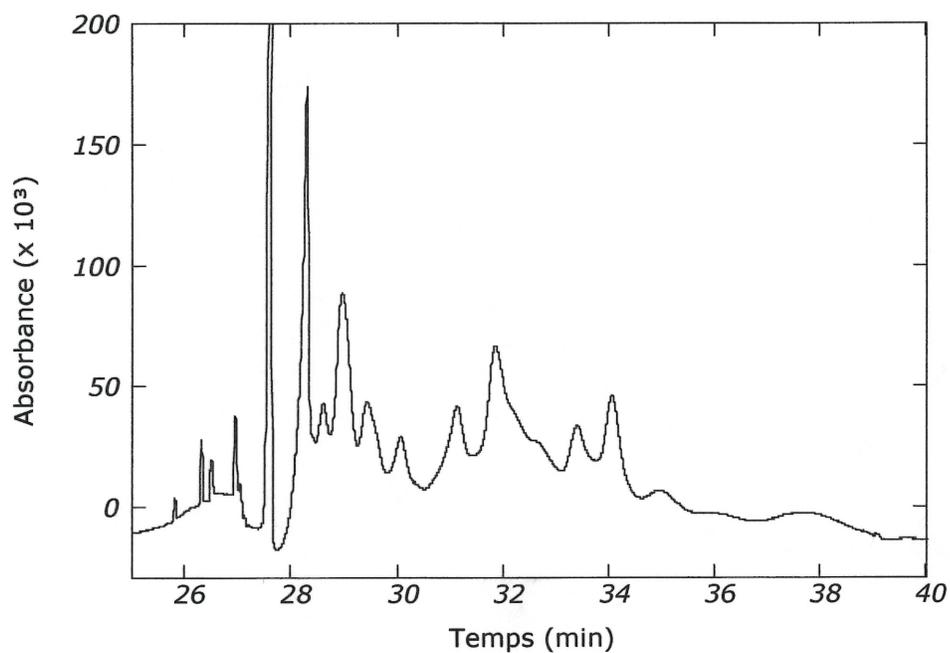


Figure 20 Agrandissement de la séparation des acides humiques de la solution étalon d'acides humiques à 380 nm.

La figure 20 présente un agrandissement de la focalisation isoélectrique capillaire entre 25 et 40 minutes pour 380 nm, il est possible de remarquer qu'une quinzaine de pics sont présents. Ces résultats se comparent bien aux résultats obtenus par Dunkelog et ses collaborateurs en focalisation isoélectrique « classique », ils ont obtenu une vingtaine de pics avec des ampholytes couvrant un domaine de pI plus étroit soit 3 à 6. L'utilisation d'un gradient de pH plus étroit (qui englobent les points isoélectriques des substances séparées à la figure 20) permettra d'obtenir une meilleure résolution entre les différents points isoélectriques ce qui améliorera la qualité de la séparation et permettra d'effectuer une meilleure comparaison avec la méthode « classique ».

La figure 21 montre la séparation obtenue pour l'extrait d'acides humiques provenant de la liqueur Bayer de l'usine Q. A. L.. Il est possible de remarquer des différences marquées par rapport au mélange étalon d'acides humiques. Tout d'abord la distribution des substances semble couvrir à peu près tout le domaine de pH étudié, ce qui porte à croire que nous sommes en présence d'autres substances plus basiques qui auraient pu coprécipiter à pH 1,5 ou être piégées par les acides humiques lors de l'extraction. De plus, plusieurs substances plus acides (temps de focalisation plus grand que 35 min) semblent être présentes, elles possèdent un maximum d'absorption vers 380 nm et elles absorbent dans l'ultraviolet contrairement aux acides humiques étalons, cela laissant présager que des acides carboxyliques aromatiques ont été trappés dans les acides humiques et ont été extraits avec les acides humiques. La figure 22 montre l'agrandissement à 380 nm entre 10 et 60 minutes pour la focalisation de la figure 21. Plusieurs pics sont observés, mais plusieurs massifs également.

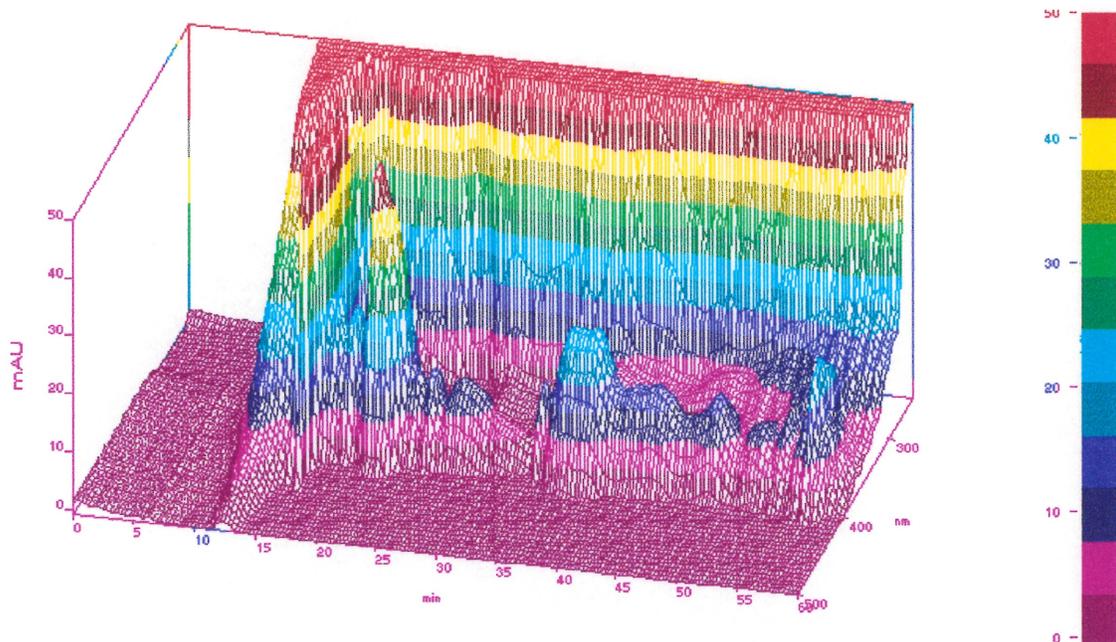


Figure 21 Focalisation isoélectrique capillaire d'acides humiques extraits dans la liqueur Bayer provenant de l'usine Q.A.L.

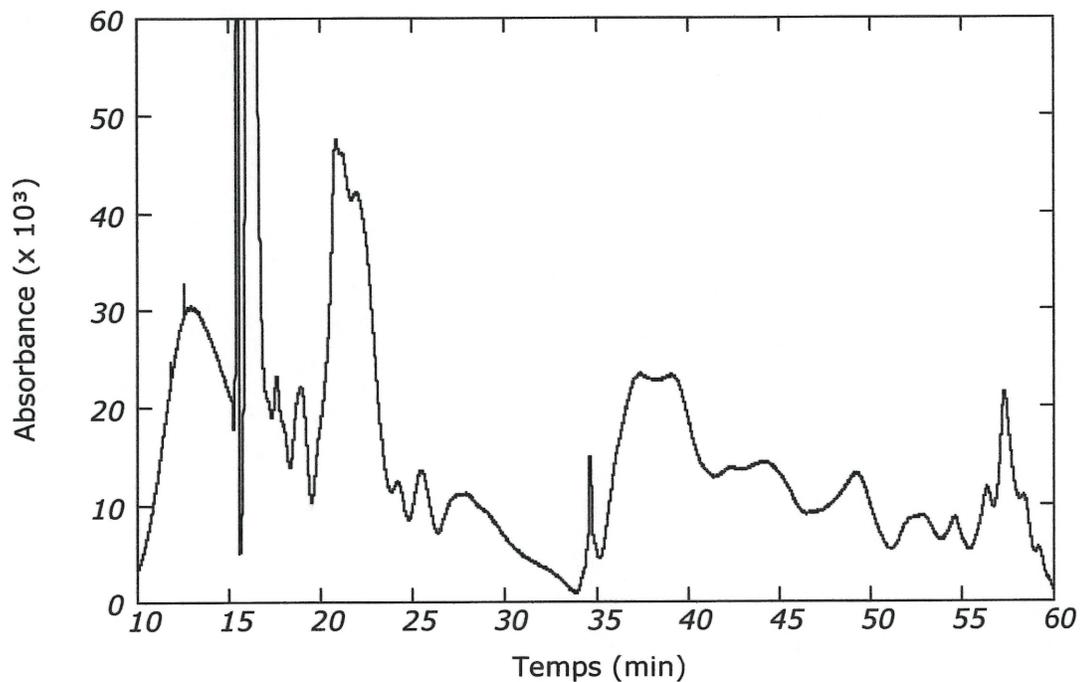


Figure 22 Agrandissement de la séparation de l'extrait d'acides humiques sur la liqueur de Q.A.L à 380 nm.

Il aurait été intéressant d'ajouter le mélange étalon d'acides humiques dans l'extrait de Q.A.L. afin d'essayer d'identifier la position des acides humiques dans cet isoélectrophérogramme. Les résultats obtenus pour la focalisation isoélectrique capillaire dynamique sont satisfaisants, compte tenu que nous voulions que voir le potentiel de séparation de cette approche sur la liqueur Bayer. Une étude plus poussée devrait être considérée pour aider notre compréhension de cette famille de composés organiques contenue dans la liqueur Bayer. Une méthode en tandem, comme la focalisation isoélectrique capillaire couplée à la spectrométrie de masse, très utilisée pour la séparation de paire de base de l'ADN et ARN, serait probablement la voie à explorer. La séparation des substances humiques serait représentée deux dimensions : i) par leur point isoélectrique (focalisation isoélectrique capillaire), ii) les différentes masses qui se trouvent à ce point isoélectrique (spectromètre de masse).

3.4. Acides carboxyliques aromatiques

Les acides carboxyliques aromatiques sont considérés par plusieurs chercheurs comme les « blocs d'assemblages » des substances humiques et de la lignine (8, 9, 45, 46). La séparation de cette famille de composés n'est pas très bien documentée, malgré leur facilité de détection par spectrophotométrie directe dans l'ultraviolet.

3.4.1. Choix du tampon

Un tampon acide borique / borate de sodium est souvent utilisé en électrophorèse capillaire à cause de sa faible conductivité électrique permettant l'utilisation de plus

fortes intensités de champs électriques sans trop produire de chaleur par effet Joule, et ce pour une grande force ionique. Il y a déjà 120 ans que Jahn a démontré les interactions entre les catéchols et l'acide « boronic » (acide borique) (115).

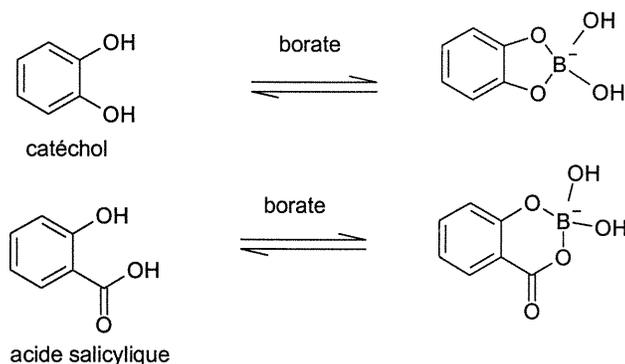


Figure 23 Formation de complexes bidentates d'acides organiques avec le borate.

Depuis le début des années 50, il est bien connu que l'acide borique et le borate possèdent l'habileté de complexer les hydrates de carbones induisant ainsi un changement du rapport charge sur masse (111-113). Böeseken a montré que l'ion borate peut complexer l'acide salicylique et le catéchol (111) (figure 23). Lerch et *al.* ont utilisé cette propriété pour améliorer la résolution obtenue entre différentes protéines par électrophorèse sur gel (114). Les molécules « blocs » qui sont à la base des substances humiques possèdent des fonctions acides carboxyliques et des fonctions alcools, et le borate pourra donc induire un changement dans le rapport charge sur masse de celles-ci pour ainsi aider à leurs séparations.

3.4.2. Empreinte d'acides aromatiques dans la liqueur Bayer

Les acides organiques aromatiques possèdent un chromophore à 254 nm (45) et un autre plus sensible à 214 nm (46). Il devient alors intéressant d'utiliser la sélectivité de la détection spectrophotométrique à cette longueur d'onde (7-11). Parce que les acides organiques aliphatiques ne possèdent pas de chromophore à 214 nm. Les électrophérogrammes présentés à la figure 24 et 25 montrent les empreintes de différentes liqueurs pures obtenues avec une détection spectrophotométrique directe à 214 nm en électrophorèse capillaire en solution libre et en mode anodique. Le temps de migration sera inversement proportionnel au rapport charge sur masse des analytes. En admettant que la masse des différents acides carboxyliques aromatiques est à peu près constante, il est possible d'affirmer que les substances migrant en premier possèdent plusieurs charges négatives, ce qui revient à dire plusieurs fonctions acides carboxyliques et ou fonctions alcools.

Comparativement aux empreintes obtenues par détection spectrophotométrique indirecte (figure 18, à pH = 8,63, pic large et triangulaire, entre 4 et 11 minutes) celle obtenues directement pour les acides carboxyliques aromatiques (figure 24 et 25, pH = 10,01, pic plus fin) montrent des différences significatives entre les différentes liqueurs Bayer. D'une part ces différences peuvent être attribuables à l'augmentation de la sélectivité de séparation avec l'augmentation du pH de l'électrolyte de support, par l'augmentation de l'ionisation des fonctions acides. Et d'autre part, l'utilisation d'un électrolyte de support composé de borate de sodium permet de changer le

rapport charge sur masse des analytes (comme expliqué à la section 3.4.1.) permettant d'obtenir une meilleure sélectivité de séparation.

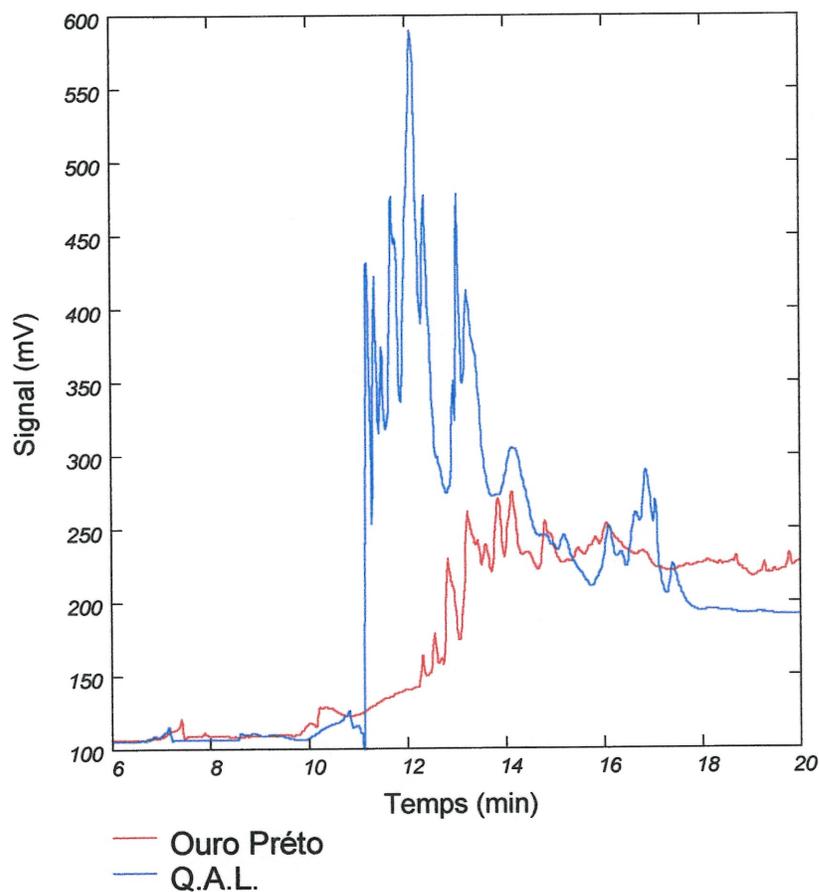


Figure 24 Empreinte de deux liqueurs Bayers obtenue pour l'injection directe de liqueur. Électrolyte de support : 50 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 0,001 % (m/v) HDB, pH 10,01; capillaire de silice : 50 μm de diamètre interne, 57 cm de longueur et 50 cm de longueur effective; Voltage de séparation : - 7 kV; longueur d'onde de détection : 214 nm.

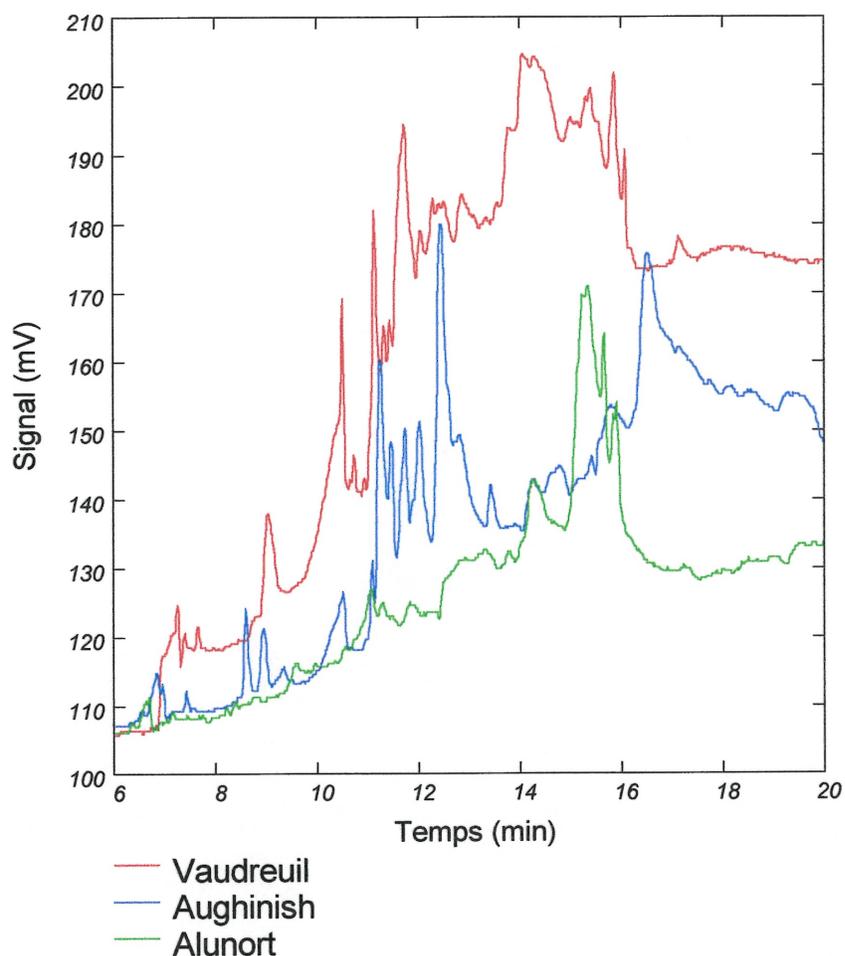


Figure 25 Empreinte de liqueur Bayer obtenu pour l'injection directe de liqueur II. Électrolyte de support : 50 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 0,001 % (m/v) HDB, pH 10,01; capillaire de silice : 50 μm de diamètre interne, 57 cm de longueur et 50 cm de longueur effective; Voltage de séparation : - 7 kV; longueur d'onde de détection : 214 nm.

On peut également remarquer que la ligne de base après 18 minute ne revient pas à sa valeur initiale et ce peu importe la provenance de la liqueur. La présence de substances humiques, qui s'adsorbent de manière irréversible sur les parois du capillaire, est probablement à l'origine de ce phénomène. Une extraction liquide / liquide préalable des acides carboxyliques aromatiques permettra probablement de régler ce problème.

3.4.3. *Élaboration d'une méthode de séparation.*

Bullock et ses collaborateurs ont montré que l'utilisation de tampons mixtes pouvait améliorer la symétrie des pics, la résolution et la sensibilité (116). C'est pour cette raison que le mélange de tétraborate de sodium et de phosphate dibasique de sodium a été utilisé pour la réalisation du tampon. Des mélanges de ces deux produits dans des proportions de 5 : 5, 15 : 15, 25 : 25, et 50 : 50 mM ont été réalisés afin d'étudier l'influence de la composition du tampon. Le mélange de borate et de phosphate dibasique en proportion équimolaire donne un pH d'environ 8,7, alors qu'un mélange d'acide borique et de phosphate tribasique en proportion équimolaire donne un pH d'environ 11,5 ce qui est trop élevé pour le pH visé (10,0). Vu la sélectivité que nous avons obtenue pour les acides carboxyliques aromatiques à pH 10,01, le pH de toutes ces solutions a été ajusté à pH 10,00 à l'aide de NaOH 50 % (m/m). Après l'étude de l'influence de ces différentes compositions sur la séparation d'un mélange étalon de différents acides carboxyliques aromatiques, nous avons retenu une composition de 25 mM borate et 25 mM phosphate dibasique pour la suite des études d'optimisation. Le mélange de composition 50 : 50 a occasionné une coupure de courant sur notre appareil, probablement à cause d'un trop grand dégagement de chaleur portant ainsi l'électrolyte de support au dessus de sa température d'ébullition.

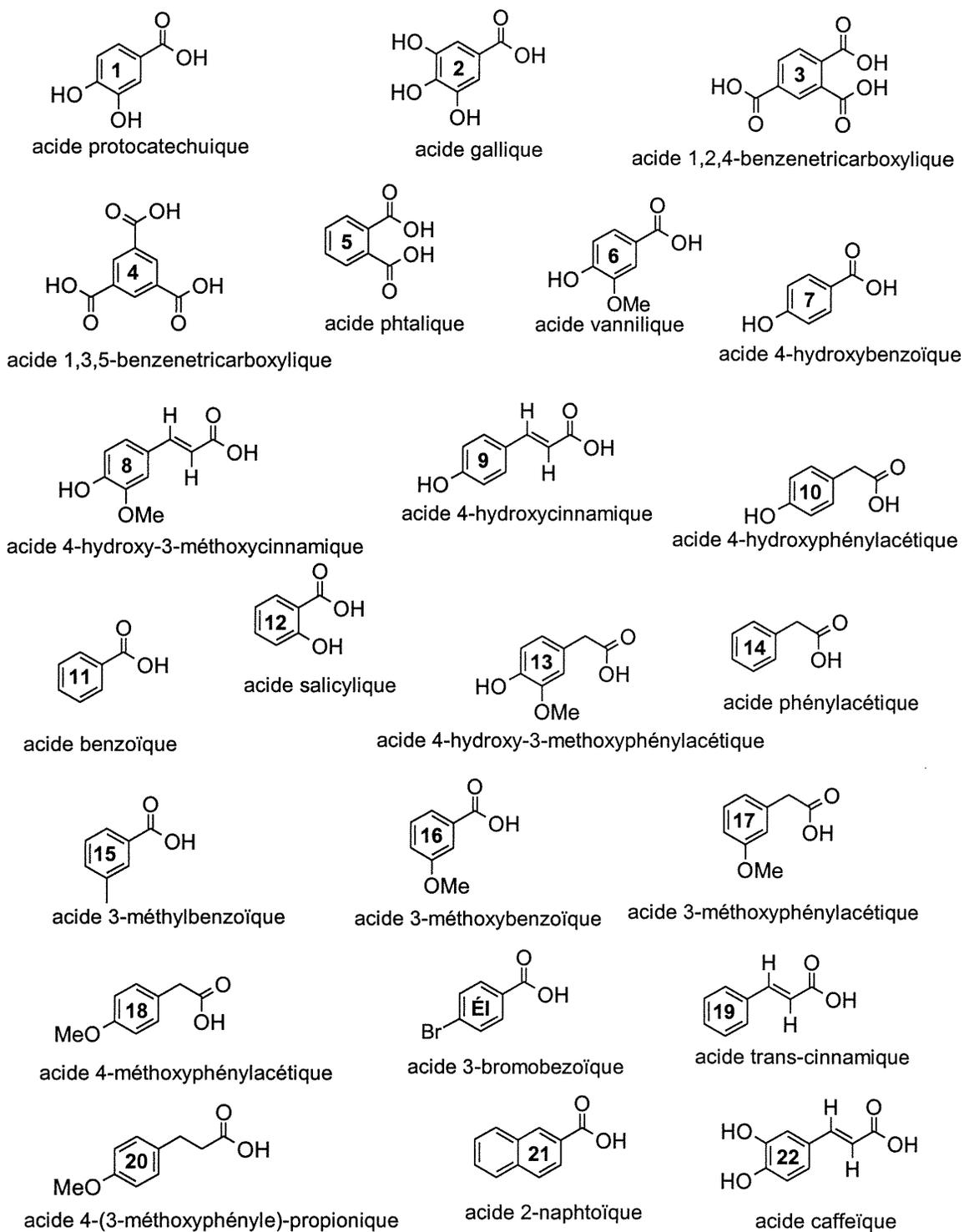


Figure 26 Structures des acides carboxyliques aromatiques, les acides sont classés selon leur ordre de migration à la figure 29.

Pour la suite du travail, notre appareil « maison » a été délaissé au profit d'un appareil commercial Beckman P/ACE 5500.

Les acides carboxyliques aromatiques, qui ont été étudiés, sont présentés à la figure 26. L'étude de l'influence de la variation du pH du tampon 25 mM borate et 25 mM phosphate dibasique sur la mobilité électrophorétique des différents acides est montrée à la figure 27. Pour des raisons de clarté de présentation, seulement quelques courbes ont été présentées à la figure 27, les courbes absentes étant des courbes intermédiaires. Les études de pH ont été réalisées à des valeurs de 8,74, 9,50, 10,00, 10,50, 11,00 et 11,50. À la figure 27 on constate, en observant la mobilité électrophorétique des différents acides carboxyliques aromatiques de la solution étalon, que la sélectivité de la séparation est améliorée par une augmentation du pH. Également, on peut observer qu'à des pH plus grands que 10, le modificateur de surface (bromure d'hexadiméthrine) commence à se détacher des parois, car la mobilité du débit électro-osmotique diminue significativement à des pH supérieurs à 10. Des valeurs de pH de 10,00 et 11,25 ont été retenues pour poursuivre la maximisation de la séparation, à cause d'une part de la qualité de la séparation obtenue et d'autre part de la forme des pics obtenus.

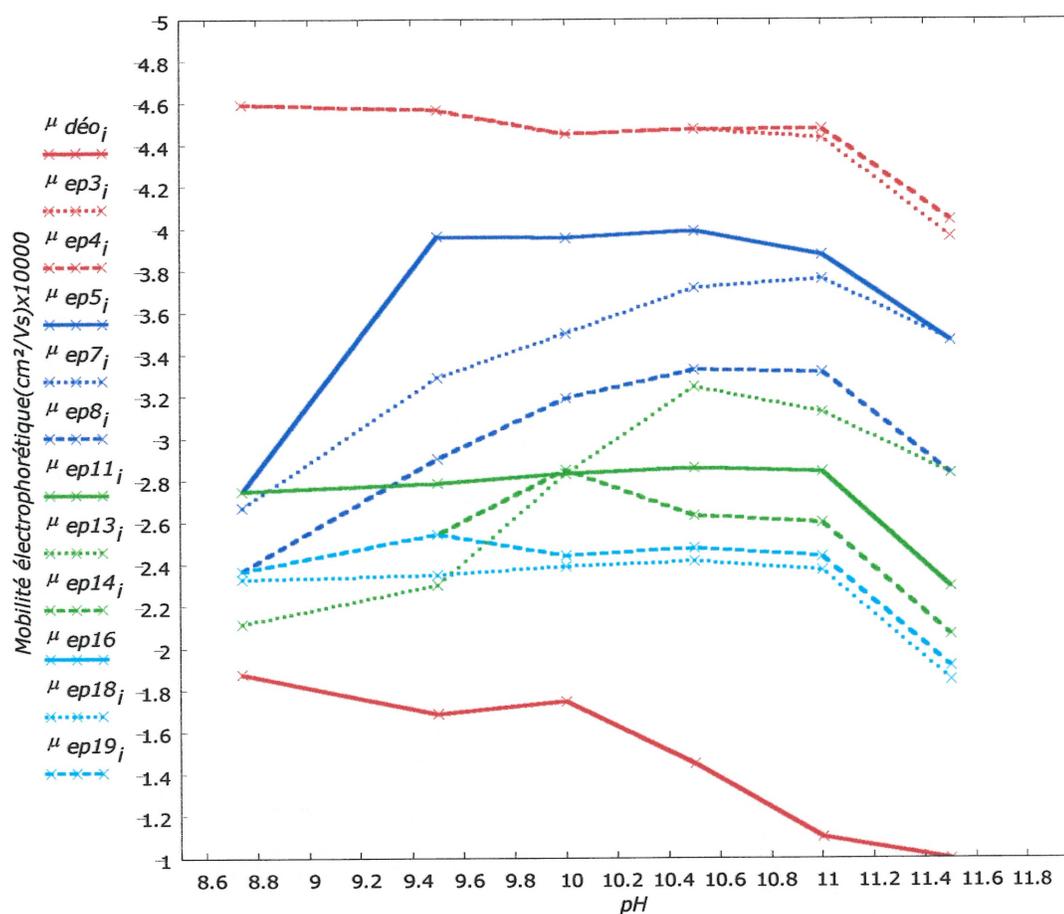


Figure 27 Effet du pH sur la mobilité des différents acides carboxyliques aromatique.

À la figure 27, il est possible de remarquer que quelques acides possèdent la des mobilités électrophorétiques identiques à pH 10,00, les acides # 11, # 13 et # 14 ainsi que les acides # 3 et # 4 (voir figure 27). Les travaux de Khaled et *al.* ont montré que la β -cyclodextrine permet de résoudre plusieurs isomères d'acides carboxyliques aromatiques par rapport aux formes α et γ de cyclodextrine (59), la cavité de la β -cyclodextrine sera donc retenue pour tenter de changer sélectivement la mobilité

électrophorétique des acides plus petits par rapport aux acides plus gros permettant ainsi leur résolution.

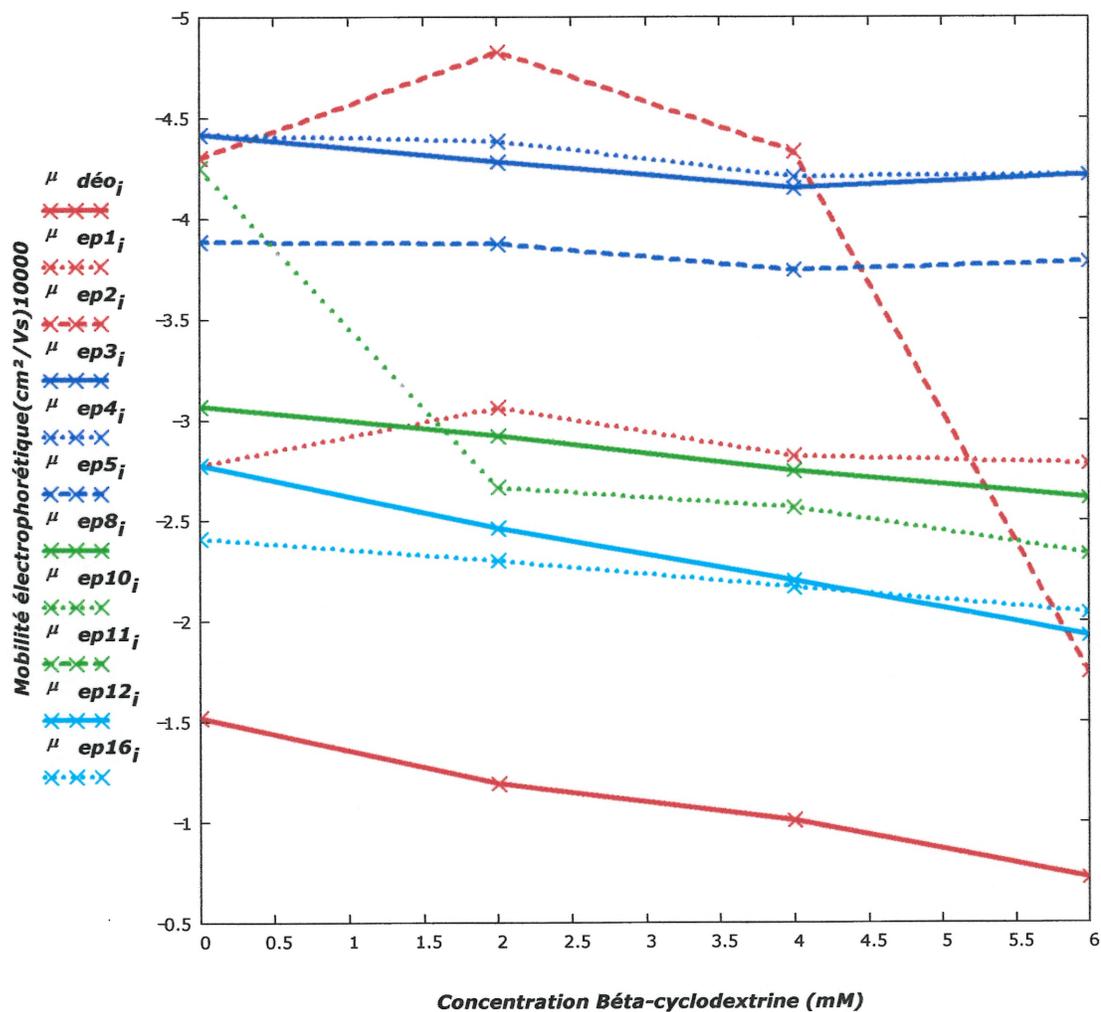


Figure 28 Effet de la concentration en 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrine sur la mobilité électrophorétique.

La figure 28 montre l'effet de la concentration en 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrine sur la mobilité électrophorétique des acides carboxyliques aromatiques qui composent la solution étalon à pH 10,00 pour des concentrations de 0, 2, 4 et 6 mM. On

remarque que la migration de l'acide # 1 ne semble pas trop être influencée par la présence de 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrine, par contre la mobilité électrophorétique de l'acide # 12 est significativement influencée permettant maintenant de résoudre ces deux acides. De la même manière, la mobilité électrophorétique des acides # 2 et # 10 peut être sélectivement changée pour permettre leur séparation. Une concentration de 2 mM en 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrine est retenue pour la suite du travail, une concentration entre 1 et 4 mM pourrait tout aussi bien faire l'affaire. La même étude de mobilité électrophorétique par rapport à la concentration en 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrine a été faite pour un pH de 11,25, mais la séparation obtenue est moins bonne et ce pH a été rejeté.

L'électrophérogramme correspondant aux conditions maximisées en fonction du pH (pH 10,00) et de la concentration en 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrine (2 mM) est présenté à la figure 29 pour la solution étalon (~50 mg/L de chaque analyte de la figure 26). Le chiffre en gras représente le numéro de l'acide selon la nomenclature de la figure 26 et le nombre entre crochet correspond au nombre maximum de charges qui peuvent être portées par l'acide. Il est possible de voir que l'acide 1,2,4-benzènetricarboxylique # 3 et l'acide 1,3,5-benzènetricarboxylique # 4, deux isomères de position, ne sont pas résolus contrairement à la différence de mobilité électrophorétique qui avait été montré à la figure 28.

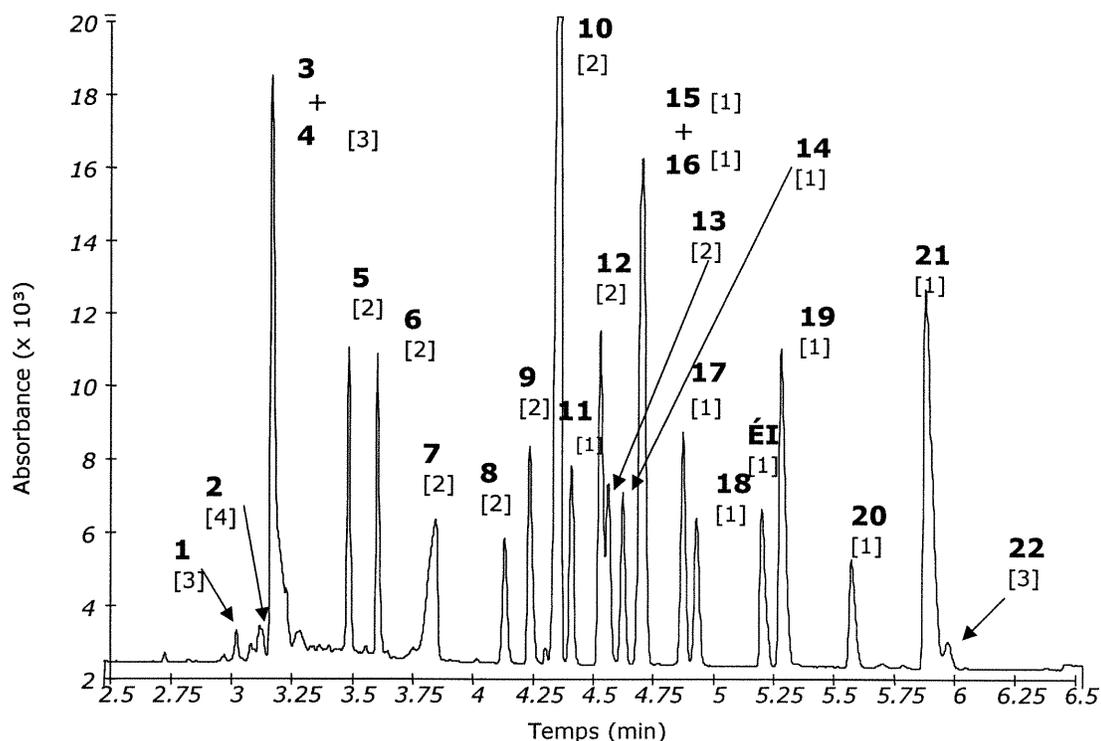


Figure 29 Électrophérogramme du mélange étalon d'acides carboxyliques aromatiques. Électrolyte de support : 25 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 25 mM Na_2HPO_4 , 0,001 % (m/v) HDB, 2 mM HP- β -CD, pH 10,00; capillaire de silice : 50 μm de diamètre interne, 57 cm de longueur et 50 cm de longueur effective; Voltage de séparation : - 24 kV; longueur d'onde de détection : 214 nm.

La figure 30 montre l'électrophérogramme obtenu pour la liqueur Bayer provenant de deux usines différentes en utilisant le meilleur tampon (i.e. 25 mM borate, 25 mM phosphate dibasique, 0,001 % (m/v), pH 10,00). Le tracé en bleu correspond à la liqueur provenant de l'usine Vaudreuil, une usine à basse température, et le tracé en rouge correspond à celle de l'usine Alunorte, une usine à haute température.

Il est possible de remarquer que les acides carboxyliques aromatiques identifiés à la figure 30 sont présents dans les liqueurs Bayer des deux différentes usines, mais à des concentrations différentes. Il est possible également de remarquer la grande reproductibilité des temps de migrations des différents acides et ce pour des échantillons provenant de deux usines différentes. Contrairement, à l'injection directe de la liqueur pure (figure 24 et 25) la ligne de base revient à sa valeur initiale, ce qui semble confirmer l'hypothèse que des substances humiques restaient agrippées sur les parois du capillaire dans le cas de l'injection de la liqueur pure. Les acides organiques aromatiques qui ont été identifiés par « dopage » dans les extraits des différentes usines ont de bonne chance de correspondre aux composés qui migrent au même temps, mais leur identification n'est pas absolue.

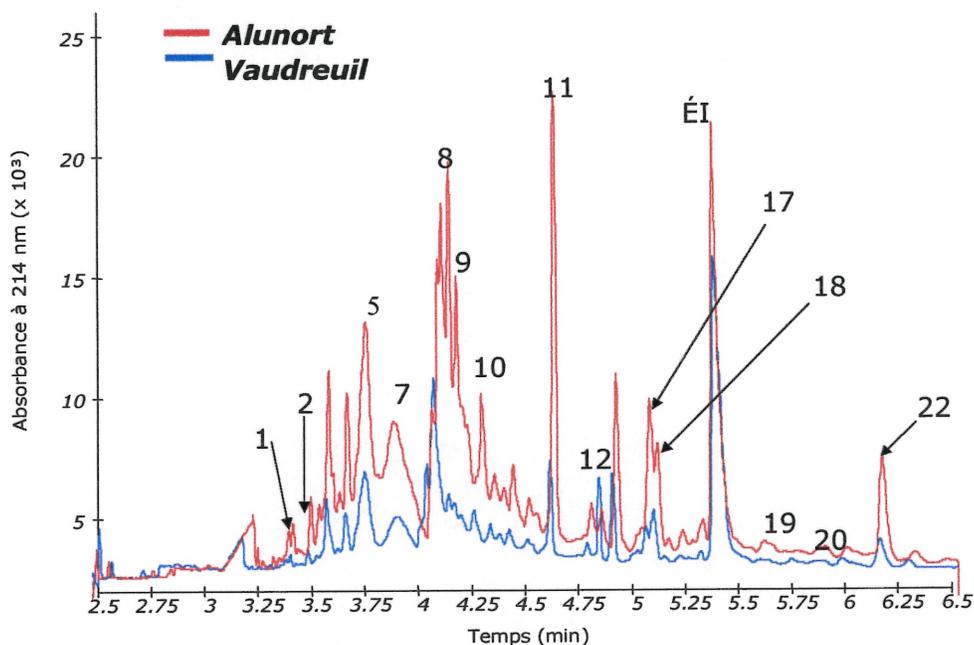


Figure 30 Électrophérogramme pour la séparation des acides carboxyliques aromatiques dans la liqueur Bayer provenant de deux différentes usines. Électrolyte de support : 25 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 25 mM Na_2HPO_4 , 0,001 % (m/v) HDB, 2 mM HP- β -CD, pH 10,00; capillaire de silice : 50 μm de diamètre interne, 57 cm de longueur et 50 cm de longueur effective; Voltage de séparation : - 24 kV; longueur d'onde de détection : 214 nm.

3.4.3. Analyse quantitative

Le tableau I montre les données sur les temps de migrations des différents acides carboxyliques aromatiques, la reproductibilité du temps de migration, l'efficacité de la séparation et la mobilité électrophorétique. On peut remarquer que la reproductibilité sur le temps de migration est presque toujours meilleure que 1 % en terme d'écart-type relatif. L'efficacité de séparation pour les différents acides est supérieure à 100 000 plateaux théoriques par mètre. Cette efficacité de séparation peut être attribuable à i) l'utilisation d'un modificateur de débit électro-osmotique en matériau de polymère qui réduit l'effet hydrophobe entre lui et les analytes et ii) à la simplicité des équilibres impliqués dans le tampon en présence d'un modificateur de débit électro-osmotique en matériau de polymère et de cyclodextrine comparativement à l'utilisation de surfactant (figure 12).

Tableau I Temps de migration et efficacité de séparation du mélange étalon de 22 acides carboxyliques aromatiques.

#	Temps de migration moyen * (min)	Écart type* (min)	Écart type relatif * (%)	Efficacité de la séparation (N/m)	Mobilité électrophorétique ($\text{cm}^2/\text{V}\cdot\text{s}$)
1	3,125	★		135 400	
2	3,254	★		32 800	
3	3,265	0,026	0,81	27 800	-4,558
4	3,265	0,026	0,81	27 764	-4,558
5	3,612	0,028	0,79	63 050	-3,978
6	3,972	0,011	0,27	119 700	-3,482
7	3,776	0,010	0,26	46 050	-3,741
8	4,309	0,010	0,23	135 000	-3,092
9	4,387	0,026	0,58	154 000	-3,011
10	4,409	0,045	1,0	210 400	-3,988
11	4,608	0,062	1,3	149 600	-2,795
12	4,826	0,016	0,33	149 100	-2,600
13	4,716	0,038	0,80	149 600	-2,696
14	4,946	0,021	0,42	166 700	-2,501
15	5,034	0,022	0,44	139 000	-2,430
16	5,034	0,022	0,44	139 000	-2,430
17	5,227	0,022	0,41	173 000	-2,286
18	5,287	0,019	0,36	162 600	-2,243
19	5,680	0,020	0,35	146 600	-1,983
20	5,735	0,017	0,29	167 100	-1,797
21	5,895	0,022	0,39	169 400	
22	6,002	0,0038	0,11	14 270	-4,434
ÉI	5,588	0,021	0,34	105 000	-2,041

* Pour un nombre de 20 mesures

★ Voir le texte.

Le tableau II montre les équations des droites d'étalonnage direct obtenues avec la hauteur et l'aire du pic, et d'étalonnage interne avec l'aire du pic. La droite d'étalonnage direct selon la hauteur du pic est la moins linéaire ($R^2 > 0,921$), de plus, l'ordonnée à l'origine ne passe pas par zéro. L'étalonnage direct selon l'aire du pic améliore beaucoup la linéarité ($R^2 > 0,997$), mais surtout la qualité de l'ordonnée à l'origine. L'étalonnage interne améliore la linéarité ($R^2 > 0,9991$) tout en gardant la même qualité d'ordonnée à l'origine qu'avec l'étalonnage direct par l'aire du pic. L'analyse des acides # 1 et # 2 fut rejetée, car l'analyse des solutions mères a révélé la décomposition de ces acides. Les piètres coefficients de corrélations multiples par étalonnage interne (0,9553 et 0,9898) de ces deux substances ont permis de détecter la décomposition des solutions mères. L'étalonnage direct par l'aire du pic est retenu pour la quantification des acides carboxyliques aromatiques dans la liqueur Bayer. L'erreur relative sur la pente de la droite d'étalonnage est inférieure à 1,2 % et l'erreur relative sur l'ordonné à l'origine est inférieure à 2,5 %.

Tableau II Comparaison entre les différentes méthodes de calibration pour un domaine de concentration allant du blanc à 400 mg/L.

#	Équation de la droite pour la hauteur pic	R ²	Équation de la droite pour l'aire du pic	R ²	Équation de la droite par étalonnage interne selon l'aire	R ²
1	$H_1 = 7,36 [1] - 164$	0,9077	$A_1 = 9,58 [1] - 17,2$	0,9617	$A_1/A_{\text{ÉI}} = 0,0003 [1] - 0,0006$	0,9553
2	$H_2 = 7,26 [2] - 48,1$	0,9957	$A_2 = 14,3 [2] - 127$	0,9870	$A_2/A_{\text{ÉI}} = 0,0005 [2] - 0,004$	0,9898
5	$H_5 = 41,7 [5] + 3040$	0,9901	$A_5 = 62,9 [5] - 7,91$	0,9993	$A_5/A_{\text{ÉI}} = 0,0021 [5] + 0,0012$	0,9997
6	$H_6 = 41,2 [6] + 820$	0,9698	$A_6 = 86,6 [6] - 21,4$	0,9997	$A_6/A_{\text{ÉI}} = 0,003 [6] - 0,002$	0,9998
7	$H_7 = 18,5 [7] + 961$	0,9206	$A_7 = 68,7 [7] - 154$	0,9997	$A_7/A_{\text{ÉI}} = 0,0023 [7] - 0,0019$	0,9995
8	$H_8 = 27,8 [8] + 141$	0,9924	$A_8 = 39,7 [8] - 70,5$	0,9982	$A_8/A_{\text{ÉI}} = 0,001 [8] - 0,003$	0,9996
9	$H_9 = 41,0 [9] + 574$	0,9929	$A_9 = 46,2 [9] + 67,3$	0,9993	$A_9/A_{\text{ÉI}} = 0,0016[9] + 0,0016$	0,9998
10	$H_{10} = 56,5 [10] + 539$	0,9961	$A_{10} = 63,9 [10] + 28,8$	0,9992	$A_{10}/A_{\text{ÉI}} = 0,0021 [10] + 0,00011$	0,9997
11	$H_{11} = 45,3 [11] + 269$	0,9953	$A_{11} = 56,6 [11] + 22,7$	0,9996	$A_{11}/A_{\text{ÉI}} = 0,0019 [11] - 0,00004$	0,9998
12	$H_{12} = 77,8 [12] + 899$	0,9883	$A_{12} = 111 [12] + 160$	0,9991	$A_{12}/A_{\text{ÉI}} = 0,0038 [12] + 0,0038$	0,9998
13	$H_{13} = 34,5 [13] + 156$	0,9861	$A_{13} = 46,5 [13] - 106$	0,9969	$A_{13}/A_{\text{ÉI}} = 0,002 [13] - 0,004$	0,9994
14	$H_{14} = 44,7 [14] - 10,8$	0,9998	$A_{14} = 52,4 [14] - 14,1$	0,9983	$A_{14}/A_{\text{ÉI}} = 0,0018 [14] + 0,0012$	0,9992
17	$H_{17} = 50,6 [17] + 106$	0,9986	$A_{17} = 65,1 [17] + 238$	0,9978	$A_{17}/A_{\text{ÉI}} = 0,0022 [17] + 0,007$	0,9992
18	$H_{18} = 29,3 [18] + 139$	0,9882	$A_{18} = 51,2 [18] - 83,3$	0,9971	$A_{18}/A_{\text{ÉI}} = 0,002 [18] - 0,004$	0,9995
19	$H_{19} = 62,5 [19] + 1060$	0,9868	$A_{19} = 134 [19] + 200$	0,9978	$A_{19}/A_{\text{ÉI}} = 0,0046 [19] + 0,005$	0,9991
20	$H_{20} = 18,3 [20] + 268$	0,9754	$A_{20} = 49,0 [20] - 41,5$	0,9973	$A_{20}/A_{\text{ÉI}} = 0,002 [20] - 0,002$	0,9995
22	$H_{22} = 5,19 [22] + 65,1$	0,9717	$A_{22} = 13,2 [22] - 144$	0,9953	$A_{22}/A_{\text{ÉI}} = 0,0004 [22] - 0,005$	0,9991

Légende : H : hauteur du pic, A : aire du pic, [#] : concentration de l'acide carboxylique aromatique selon figure 26 en mg/L.

Le tableau III montre l'analyse quantitative des différents acides carboxyliques aromatiques dans les liqueurs Bayers provenant de différentes usines : l'usine Q.A.L. possède la plus grande concentration en acides carboxyliques aromatiques de toutes les usines étudiées. La liqueur d'Alunorte est la moins concentrée et cela est attribuable au jeune âge de la liqueur qui n'a pas encore eu le temps d'accumuler beaucoup de matières organiques comparativement aux deux autres usines à haute température (Q.A.L. et Aughinish). Il est très difficile de trouver une relation entre la concentration des différents acides dans les usines à hautes et à basses températures. L'utilisation d'un logiciel de chemométrie permettrait possiblement la distinction entre les deux types d'usine. Les limites de détection sont comprises entre 0,50 et 7,5 mg/L . Cette performance peut être expliquée par la très bonne efficacité de séparation obtenue (100 000 plateaux par mètre) avec l'utilisation du modificateur de débit électro-osmotique en matériau de polymère en combinaison avec un champ électrique intense ($- 421 V/cm$). La limite de détection est évaluée avec la hauteur du pic, cela implique en électrophorèse capillaire qu'une meilleure efficacité de séparation permet d'augmenter la hauteur du pic et du même fait abaisser la limite de détection. Ces résultats sont en accord avec les suggestions faites dans l'article de Jorgensen et *al.*(28).

Tableau III Analyse quantitative des différents acides carboxyliques aromatiques dans la liqueur Bayer de différentes usines.

Acide #	LD $3\sigma/s$ (mg/L)	Usine à haute Température			Usine à basse température	
		Q.A.L. (mg/L)	Aughinish (mg/L)	Alunorte (mg/L)	Ouro Preto (mg/L)	Vaudreuil (mg/L)
1	5,3	101	134	5,5	45,1	6,4
2	5,3	593	83,8	6,6	66,3	24,4
5	0,93	1490	31,8	10,1	115	32,5
6	0,94	553	87,9	14,5	288	18,9
7	2,1	945	339	38,5	370	103
8	1,4	389	279	90,8	134	161
9	0,94	249	99,8	15,7	203	87,0
10	0,68	172	43,3	10,8	69,8	31,6
11	0,85	304	40,0	18,0	124	89,3
12	0,50	29,3	11,2	ND	11,4	ND
13	1,1	133	8,0	ND	42,6	ND
14	0,87	45,0	14,5	2,4	23,7	ND
17	0,77	49,8	10,1	10,0	17,0	20,3
18	1,3	300	18,4	1,8	ND	3,8
19	0,62	32,4	0,8	1,83	3,13	0,7
20	2,1	86,6	7,3	ND	9,38	4,85
22	7,5	24,9	32,9	ND	9,86	139

LD : Limite de détection

ND : Non détecté

3.4.5. Étude de la mobilité en fonction du rapport charge sur masse

Dans le but vérifier si la mobilité électrophorétique des acides carboxyliques aromatiques peut être reliée au rapport charge sur masse selon la loi de Stoke modifiée en reliant le rayon hydrodynamique r à la masse M selon l'équation $M = \rho \left(\frac{4}{3} \pi \cdot r^3 \right)$, un tracé de la mobilité électrophorétique des différents acides en fonction d'un rapport charge sur masse estimé a été fait à la figure 31 pour un pH de 10,0.

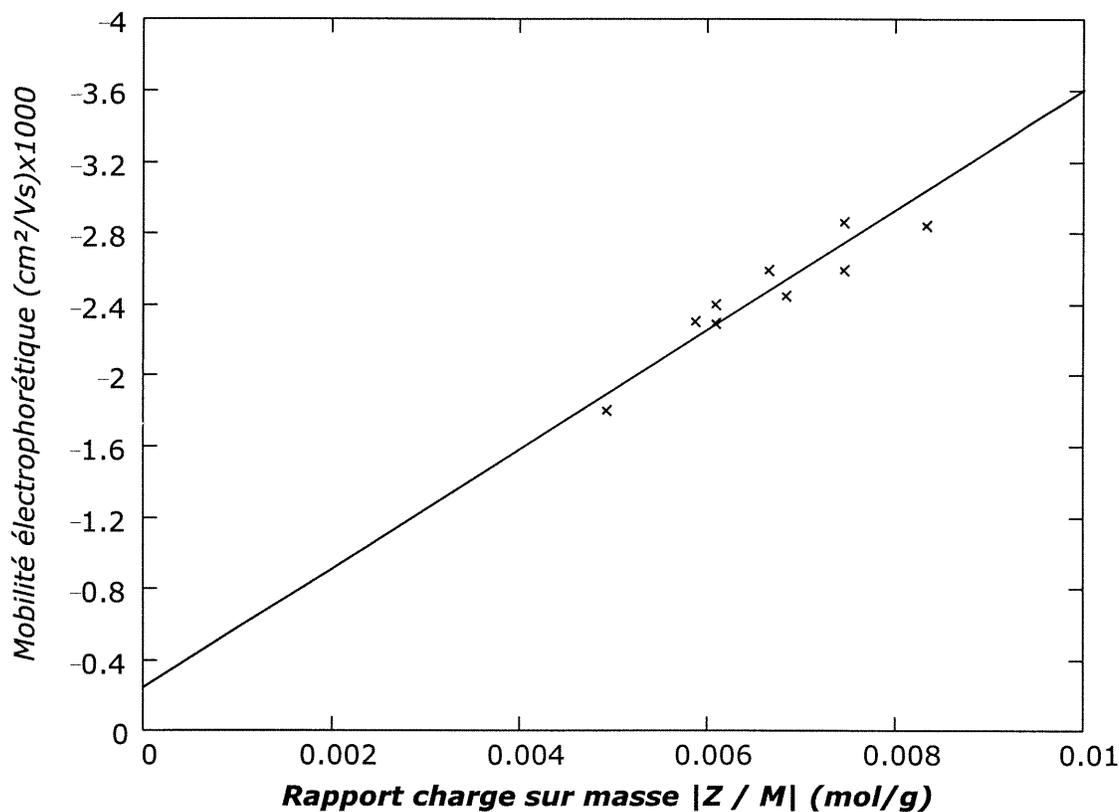


Figure 31 Tracé de la mobilité électrophorétique en fonction du rapport charge sur masse pour les acides carboxyliques aromatiques monochargés étudiés. Équation de la droite $\mu_{ep} = -338 (Z/M) - 0,211$, $R^2 = 0,987$.

La charge a été estimée en faisant de l'hypothèse suivante : les acides carboxyliques aromatiques possédant une seule fonction acide carboxylique porteront une charge négative compte tenu du pH de 10,0 par rapport à leur constante de dissociation acide qui est d'environ 5 (en première approximation, un acide qui se trouve dans une solution dont le pH est de deux unités supérieur à sa constante de dissociation acide (i.e. K_a), nous pouvons considérer qu'il est complètement dissocié). Neuf acides se retrouvent dans cette situation, le tracé de leur mobilité électrophorétique en fonction de leur rapport charge sur masse (figure 31) est linéaire avec un coefficient de corrélation multiple de 0,985. Ce résultat semble appuyer l'hypothèse faite précédemment. En connaissant la pente de cette droite la charge des acides multichargés a pu être estimée. Le nombre de charges estimées est présenté au tableau IV.

Tableau IV Charge estimée pour les différents acides carboxyliques aromatiques

#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Z	1.2	2	2.6	2.55	1.8	1.6	1.3	1.7	1.3	1.8	1 *
#	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Z	1.1	1.5	1	1	1	1	1	1	1	1	2.2

: numéro de l'acide carboxylique aromatique selon figure 26.

Z : la charge estimée selon le tracé à la figure 31.

* : charge posée selon l'hypothèse décrite dans le texte.

Les résultats obtenus à la figure 31 semblent s'écarter de ce que suggère la théorie qui dit que : « si la forme des acides carboxyliques aromatiques est considérée comme étant sphérique, la mobilité électrophorétique des acides devrait être proportionnelle au rapport de la charge sur la racine cubique de la masse $\left(\frac{Z}{M^{\frac{1}{3}}}\right)$ ». Les résultats obtenus montrent que la mobilité électrophorétique est proportionnelle au rapport charge sur masse (Z/M) . De plus, l'ordonnée à l'origine semble assez proche de zéro. Cette écart par rapport à la théorie pourrait être expliqué en partie par l'hypothèse sur la forme des petites molécules, mais pourrait également être expliqué par l'habilité du borate à complexer les fonctions acides carboxyliques et les fonctions alcools modifiant ainsi le rapport charge sur masse.

4. Conclusion

L'application de l'électrophorèse capillaire à la séparation des composés organiques dans la liqueur Bayer a permis de réaliser la séparation de plusieurs familles de composés organiques.

Tout d'abord, l'électrophorèse capillaire en solution libre et en mode anodique avec détection spectrophotométrique indirecte a permis d'obtenir une empreinte rapide (en moins de 15 minutes) des familles suivantes : i) les acides inorganiques, ii) les acides organiques aliphatiques, iii) les acides organiques aromatiques et iv) les acides humiques. Les empreintes obtenues permettent une évaluation rapide de la teneur en ces différentes familles de composés par l'injection directe sans aucune préparation préalable de l'échantillon de liqueur dans un système d'électrophorèse capillaire. Ce même mode de séparation a permis de réaliser la résolution de sept acides organiques aliphatiques en moins de 30 secondes en solution synthétique.

L'utilisation de l'électrophorèse capillaire en solution libre et en mode inversé avec détection spectrophotométrique directe permet l'évaluation rapide de l'aromaticité de la liqueur sans aucune préparation d'échantillon préalable en moins de dix minutes.

Par la suite, l'élaboration d'une méthode d'électrophorèse capillaire en solution libre en mode anodique combiné à la chromatographie électrocinétique avec détection

spectrophotométrique directe a permis la séparation et la détection de 22 acides organiques aromatiques en moins de 6 minutes dans la liqueur Bayer.

L'analyse quantitative de ces différents acides carboxyliques aromatiques peut être réalisée par étalonnage direct, toutefois une extraction liquide/liquide est nécessaire pour contrer l'effet de matrice observé lors de l'injection directe de la liqueur. Cette même méthode permet l'évaluation de la charge effective des différents acides organiques aromatiques multichargés.

Finalement, l'utilisation de la focalisation isoélectrique capillaire a permis d'obtenir une quinzaine de pics lors de la séparation des acides humiques après une extraction sur la liqueur.

La détection spectrophotométrique indirecte reste encore le meilleur moyen de détection des acides carboxyliques aliphatiques compte tenu des contraintes inhérentes au tampon qui demande la détection par conductivité ionique. La réalisation d'un détecteur à conductivité ionique après suppression est excessivement difficile vu le manque de disponibilité de membrane échangeuse de cations qui peuvent s'adapter aux faibles dimensions du capillaire. La construction reproductible d'une cellule de détection par conductivité ionique est également très difficile vu la dimension de cette dernière. La détection par conductivité ionique capacitive (sans contact) sera un moyen de détection à considérer dans le futur et l'adaptation d'un

suppresseur de conductivité précédant la cellule de détection permettra possiblement d'améliorer la limite de détection afin d'atteindre environ 10 nM.

Il est possible d'identifier les différentes familles d'organiques dans la liqueur Bayer par électrophorèse capillaire en solution libre et en mode anodique avec une détection spectrophotométrie indirecte. L'utilisation d'urée permet de briser les enchevêtrements entre les différentes substances humiques permettant l'apparition de nouveaux pics dans « l'empreinte » obtenue.

Les résultats obtenus en focalisation isoélectrique capillaire avec mobilisation dynamique sont très encourageants pour la séparation des acides humiques. Ce mode a permis de séparer et de détecter la présence de plusieurs substances humiques dans la liqueur de l'usine Q.A.L.. Pour améliorer la détection, la focalisation isoélectrique capillaire couplée avec la spectrophotométrie de masse pourrait être une méthode de choix pour la caractérisation des substances humiques considérant le fait qu'aucun étalon de substances humiques existe jusqu'à présent. Le centre de recherche et développement Arivida d'Alcan a déjà manifesté son intérêt pour le couplage de cette méthode à un micro-chromatographe en phase liquide à haute performance muni d'un spectromètre de masse.

Il a été possible de trouver un tampon mixte borate / phosphate pour maximiser la séparation d'une vingtaine d'acides carboxyliques aromatiques semblables et d'en identifier plusieurs présents dans la liqueur Bayer. L'utilisation de cyclodextrine

comme phase pseudo-stationnaire a démontré son utilité afin de résoudre un mélange complexe. Les efficacités de séparation obtenues avec le tampon maximisé sont supérieures à 100 000 plateaux par mètre pour tous les acides carboxyliques aromatiques étudiés. La reproductibilité des temps de migration est également très bonne avec une précision de moins de 1 %. L'étalonnage direct par la mesure de l'aire des pics permet de doser les différents acides avec suffisamment de précision dans la liqueur Bayer. Présentement, le manque d'intérêt du Centre de recherche et de développement Arvida pour les acides carboxyliques aromatiques contenus dans la liqueur ne permettra pas l'application de cette méthode dans l'industrie de l'aluminium. Par contre, l'industrie des pâtes et papier semble beaucoup plus intéressée à la séparation et la quantification de ces acides carboxyliques aromatiques en tant que produits de dégradation de la lignine. L'industrie des pâtes et papiers voulant détruire sélectivement la lignine qui maintient les fibres de bois ensemble. La mesure de la concentration de ces composés dans les procédés chimique de pâtes et papier permet de mesurer directement la performance d'une usine. L'évaluation des performances du procédé chimique de pâtes et papier est présentement réalisé de manière indirecte soit par la mesure de la disparition des réactifs.

Les résultats obtenus avec notre méthode pour l'analyse des acides carboxyliques aromatiques ont montré que la mobilité électrophorétique des acides carboxyliques aromatiques varie linéairement avec le rapport charge sur masse. Ces résultats portent à croire que les acides carboxyliques aromatiques ne doivent pas être considérés comme des sphères comme le fait présentement la théorie.

Les résultats obtenus en focalisation isoélectrique capillaire sont sans aucun doute ceux pour lesquels Alcan manifeste le plus d'intérêt. Les études qui ont été faites en focalisation isoélectrique électrique capillaire étaient en fait à titre exploratoire, par contre, l'exploration de cette avenue sort considérablement du cadre de ce projet de maîtrise. Nous suggérons donc de poursuivre l'exploration de ce filon excessivement prometteur, car aucun autre chercheur n'a, jusqu'à présent, réussi une telle qualité de séparation pour les acides humiques.

5. Bibliographie

- 1) Laurier, Gagnon et Keil, Le procédé Bayer partie 1, Document interne de la Société d'électrolyse et de chimie Alcan Ltée (Arvida 1979).
- 2) Caouette, Gaudreault, Bhilotra et Simard, Le procédé Bayer partie 2, Document interne de la Société d'électrolyse et de chimie Alcan Ltée (1980).
- 3) G. MacZura, K. P. Goodboy et J. J. Koenig, *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 3^e, John Wiley & Sons, **2** (1978) 218.
- 4) F. N. Newchurch et K. E. Moretto, *Proceedings of the Second International Alumina Quality Workshop*, Perth, (1990) 3.
- 5) G. P. Power, *Proceedings of the Extractive Metallurgy Conference*, Perth, (1991) 337.
- 6) N. Brown et T. J. Cole, *109th AIME Light Metals* (1980) 105.
- 7) G. P. Power et W. Tichbon, *Proceedings of the Second International Alumina Quality Workshop*, Perth Western Australia (1990) 99.
- 8) G. Lever, *Light Metals*, **2** (1978) 71.
- 9) J.D. Guthrie, P. J. The et W.D. Imbrogno, *AIME Light Metals*, (1986) 127.
- 10) F. Brindel et A. Lectard, *Travaux de l'ICSOBA*, **13**, 18 (1983) 353.
- 11) R. Baziramakenga, R. R. Simard, et G. D. LeRoux, *Soil Biol. Biochem.*, **27**, 3 (1995) 349.
- 12) E. B. Teas et J. J. Kotte, *J. Geol. Soc. Jamaica*, **IV**, June, (1980) 23.
- 13) L. Noël, "Présentation des résultats obtenus avec LC / MSD et LC / FI, Réunion sur l'analyse des organiques", CRDA groupe matière première, 27 mai 1998.

- 14) S. Paré, "Présentation des résultats obtenus avec chromatographie ionique, Réunion sur l'analyse des organiques", CRDA groupe matière première, 27 mai 1998.
- 15) P. Kopacek, D. Kaniansky et J. Hejzlar, *J. Chromatogr. A.*, **545** (1991) 461.
- 16) A. Rigol, J. F. López-Sánchez et G. Rauret, *J. Chromatogr. A*, **664** (1994) 301.
- 17) A. Rigol, M. Vidal et G. Rauret, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **208**, 2 (1996) 617.
- 18) R. Dunkelog, H. H. Rüttinger et K. Peisker, *J. Chromatogr. A*, **777** (1997) 355.
- 19) D. Fetsch et J. Havel, *J. Chromatogr. A*, **802**, 1 (1998) 189.
- 20) P. Schmitt-Kopplin, A. W. Garrison, E. M. Perdue, D. Freitag et A. Kettrup, *J. Chromatogr. A*, **807** (1998) 101.
- 21) A. Rigol, M. Vidal et G. Rauret, *J. Chromatogr. A*, **807** (1998) 275.
- 22) D. Fetsch, M. Hradilová, E. M. Peña Méndez et J. Havel, *J. Chromatogr. A*, **817**, (1998) 313.
- 23) P. Schmitt-Kopplin, N. Hertkorn, A. W. Garrison, D. Freitag et A. Kettrup, *Anal. Chem.*, **70** (1998) 3798.
- 24) U. Keuth, A. Leinenbach, H. P. Beck et H. Wagner, *Electrophoresis*, **19** (1998) 1091.
- 25) M. DeNobili, G. Bragato et A. Mori, *Acta Hydrochim. Hydrobiol*, **26** (1998) 186
- 26) E. S. Olson et J. W. Diehl, *J. Chromatogr. A*, **349** (1985) 337.
- 27) A. Tiselius et H. Z. Kundel, *Physiol. Chem.*, **309** (1937) 219.
- 28) J. W. Jorgensen et K. D. Lukacs, *Anal. Chem.*, **53** (1981) 1298.
- 29) R. Rodriguez-Diaz, T. Wehr et M. Zhu, *Electrophoresis*, **18** (1997) 2134.
- 30) X. Liu, Z. Socic et I. S. Krull, *J. Chromatogr. A*, **735** (1996) 165.

- 31) S. Hjerten et M.-D. Zhu, *J. Chromatogr. A*, **346** (1985) 265.
- 32) S. Hjerten, *J. Chromatogr. A*, **347** (1985) 191.
- 33) S. Hjerten, J.-L. Liao et K. Yao, *J. Chromatogr. A*, **387** (1987) 127.
- 34) S. Hjerten, K. Elenbring, F. Kilar, J.-L. Liao, J. Chen, C. Siebert et M.-D. Zhu, *J. Chromatogr. A*, **403** (1987) 41.
- 35) F. Kilar et S. Hjerten, *J. Chromatogr. A*, **480** (1989) 351.
- 36) F. Kilar et S. Hjerten, *Electrophoresis*, **10** (1989) 23.
- 37) J. R. Mazzeo et I. S. Krull, *Anal. Chem.*, **63** (1991) 2852.
- 38) M. Bier, *Electrophoresis*, **19** (1998) 1057.
- 39) H. G. Lee, *J. Chromatogr.*, **790** (1997) 215.
- 40) W. Thormann, J. Calslavská, S. Molteni et J. Chmelik, *J. Chromatogr. A*, **589** (1992) 321.
- 41) J. R. Mazzeo et I. S. Krull, *J. Chromatogr. A*, **606** (1992) 291.
- 42) S. Molteni et W. Thormann, *J. Chromatogr. A*, **638** (1993) 187.
- 43) J. Chmelik et W. Thormann, *J. Chromatogr. A*, **632** (1993) 229.
- 44) J. Kubach et R. Grimm, *J. Chromatogr. A*, **737** (1996) 281.
- 45) S. Masselter, A. J. Zemmann et O. Bobleter, *Chromatographia*, **40**, ½ (1995) 51.
- 46) D. Volgger, A. Zemmann et G. Bonn, *J. High Resol. Chromatogr.*, **21** (1998) 3.
- 47) A. Hiermann et B. Radl, *J. Chromatogr. A*, **803** (1998) 311.
- 48) J. Minor, *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 3^e, John Wiley & Sons, **19** (1982) 379.
- 49) W. Buchberger et K. Winna, *J. Chromatogr. A*, **739** (1996) 389.
- 50) E. Wada, T. Takayanngi et S. Motomizu, *Analyst*, **123** (1998) 493.

- 51) Y. J. Lee, W. E. Price et M. M. Sheil, *Analyst*, **120** (1995) 2689.
- 52) C. Stathakis et R. M. Cassidy, *Can. J. Chem.*, **76** (1998) 194.
- 53) S. K. Wiedmer, H. Sirén, M.-L. Riekkola et J. H. Jumppanen, *J. Chromatogr. A*, **781** (1997) 239.
- 54) K. Sarmini et E. Kenndler, *J. Chromatogr. A*, **806** (1998) 325.
- 55) M. Chiari, *J. Chromatogr. A*, **805** (1998) 1.
- 56) J. Zemann, *J. Chromatogr. A*, **787** (1997) 243.
- 57) J. E. Wiktorowicz et J. C. Colburn, *Electrophoresis*, **11** (1990) 769.
- 58) S. Terabe, H. Ozaki, K. Otsuka, et T. Ando, *J. Chromatogr. A*, **332** (1985) 211.
- 59) M. Y. Khaled et H. M. McNair, *J. High Resol. Chromatogr.*, **19** (1996) 143.
- 60) C. Stathakis et R. M. Cassidy, *Anal. Chem.*, **66** (1994) 2110.
- 61) S. M. Masselter et A. J. Zemann, *J. Chromatogr. A*, **693** (1995) 359.
- 62) K. Sarmini et E. Kenndler, *J. Chromatogr. A*, **811** (1998) 201.
- 63) J. Tjørnelund, A. Bazzanella, H. Lochmann et K. Bächmann, *J. Chromatogr. A*, **811** (1998) 211.
- 64) M. Chiari, *J. Chromatogr. A*, **805** (1998) 1.
- 65) R. Weinberger, *Am. lab.*, **jully** (1997) 49.
- 66) H. Burt, D. M. Levis et K. N. Tapley, *J. Chromatogr. A*, **739** (1996) 367.
- 67) J.-C. Hsu, W.-H. Chen et C.-Y. Liu, *Analyst*, **122** (1997) 1393.
- 68) S. Honda, K. Yamamoto, S. Suzuki, M. Ueda et K. Kakedi, *J. Chromatogr. A*, **588** (1991) 327.
- 69) J. D. Lamb, B. R. Edwards, R. G. Smith et R. Garrick, *Talanta*, **42** (1985) 109
- 70) Nishi et al., *Anal. Chem.*, **61** (1989) 2434.

- 71) F. E. P. Mikkers, F. M. Everaerts et Th. P. E. M. Verhegggen, *J. Chromatogr. A*, **169** (1979) 11.
- 72) P. Gebauer, M. Deml, P. Bocek et J. Janak, *J. Chromatogr. A*, **267** (1983) 455.
- 73) S. Honda, K. Yamamoto, S. Suzuki, M. Ueda et K. Kakedi, *J. Chromatogr. A*, **588** (1991) 327.
- 74) S. Terabe et T. Isemura, *J. Chromatogr. A*, **515** (1990) 667.
- 75) P. Jandik et W. R. Jones, *J. Chromatogr. A*, **546** (1991) 431.
- 76) M. Schnitzer et S.T. Khan, *Humic substances*, Marcel Dekker Inc., New York (1972) 55-201.
- 77) N. R. Curvetto, N. A. Balmaceda et G. A. Orioli, *Turrialba*, **25** (1975) 365.
- 78) X. Huang, T.-K. J. Pang, M. J. Gordon et R. N. Zare, *Anal. Chem.*, **59** (1987) 2747.
- 79) X. Huang, M. J. Gordon et R. N. Zare, *J. Chromatogr. A*, **425** (1988) 385.
- 80) X. Huang, J. A. Luckey, M. J. Gordon et R. N. Zare, *Anal. Chem.*, **61** (1989) 766.
- 81) X. Huang, M. J. Gordon et R. N. Zare, *J. Chromatogr. A*, **691** (1989) 285.
- 82) X. Huang, R. N. Zare, S. Sloss et A. G. Ewing, *Anal. Chem.*, **63** (1991) 189.
- 83) P. K. Dasgupta et L. Bao, *Anal. Chem.*, **65** (1993) 1003.
- 84) N. Avdalovic, C. A. Pohl, R. D. Rocklin et J. R. Stillian, *Anal. Chem.*, **65** (1993) 1470.
- 85) S. Kar, P. K. Dasgupta, H. Liu et H. Hwang, *Anal. Chem.*, **66** (1994) 2537.
- 86) D. Kaniansky, I. Zelensky, A. Hybenova et F. I. Onuska, *Anal. Chem.*, **66** (1994) 4258.

- 87) M. Harrold, J. Stillian, L. Bao, R. Rocklin et N. Avdalovic, *J. Chromatogr. A*, **717** (1995) 371.
- 88) W. R. Jones, J. Soglia, M. McGlynn, C. Haber, J. Reineck et C. Krstanovic, *Am. Lab.*, **march** (1996) 25.
- 89) D. Kaniansky, V. Zelenska et D. Baluchova, *Electrophoresis*, **17** (1996) 1890.
- 90) S. Valsecchi, G. Tartari et S. Polesello, *J. Chromatogr. A*, **760** (1997) 326.
- 91) K. Govindaraju, E. A. Cowley, D. H. Eidelman et D. K. Lloyd, *Anal. Chem.*, **69** (1997) 2793.
- 92) S. Kar et P. K. Dasgupta, *Am. Lab.*, **august** (1997) 17C.
- 93) A. J. Zemann, E. Schnell, D. Volgger et G. K. Bonn, *Anal. Chem.*, **70** (1998) 563.
- 94) C. W. Klampfl, M. U. Katzmayer, W. Buchberger et N. Basener, *J. Chromatogr. A*, **804** (1998) 357.
- 95) S. Budavari, M. J. O'Neil, A. Smith et P. E. Heckelman, *The Merck Index*, Merck & Co. Inc., **11^e**, Rahway (1972) 55-201.
- 96) P. E. Jackson, *J. Chromatogr. A*, **693** (1995) 155.
- 97) S. C. Grocott, L. P. Jefferies, T. Bowser et J. Carnevale, *J. Chromatogr. A*, **602** (1992) 257.
- 98) P. E. Jackson, *J. Chromatogr. A*, **693** (1995) 155.
- 99) A. H. Harakuwe, P. R. Haddad et P. E. Jackson, *J. Chromatogr. A*, **739** (1996) 399.
- 100) P. R. Haddad, A. H. Harakuwe et W. Buchberger, *J. Chromatogr. A*, **706** (1995) 571.

- 101) P. R. Haddad, A. H. Harakuwe et W. Buchberger, *J. Chromatogr. A*, **685** (1994) 161.
- 102) C. Roy et P. Ferland, *Document interne Alcan International Limitée / CRDA groupe Matières premières, février 1996, 1.*
- 103) P. R. Haddad, *J. Chromatogr. A*, **770** (1997) 281.
- 104) W. R. Jones et P. Jandik, *J. Chromatogr. A*, **608** (1992) 385.
- 105) J. Romano, P. Jandik, W. R. Jones et P. E. Jackson, *J. Chromatogr. A*, **546** (1991) 411.
- 106) F. S. Strover, *Electrophoresis*, **11** (1990) 750.
- 107) C. W. Klampfl et W. Buchberger, *Trends in analytical chemistry*, **16**, 4 (1997) 221.
- 108) P. E. Jackson et P. R. Haddad, *Trends in analytical chemistry*, **12**, 6 (1993) 231.
- 109) K. Sarmini et E. Kenndler, *J. Chromatogr. A*, **806** (1998) 325.
- 110) K. Sarmini et E. Kenndler, *J. Chromatogr. A*, **818** (1998) 209.
- 111) J. Böeseken, *Adv. Carbohydr. Chem.*, **4** (1949) 189.
- 112) A. B. Foster, *Adv. Carbohydr. Chem.*, **12** (1957) 81.
- 113) A. B. Foster et M. Stacey, *J. Chem. Soc.*, (1955) 1778.
- 114) B. Lerch et H. Stegemann, *Anal. Biochem.*, **29** (1969) 76.
- 115) F. Jahn, *Arch. Pharm.*, **12** (1878) 212.
- 116) J. Bullock, J. Strasters et J. Snider, *Anal. Chem.*, **67** (1995) 3246.
- 117) T. Jira, A. Bunke, M. G. Schmid et G. Gübitz, *J. Chromatogr. A*, **761** (1997) 269.