

Pierre SCRIBE et Sandrine IRACE
Université Pierre et Marie Curie, Paris

ANALYSE DE LA MATIÈRE ORGANIQUE DES MILIEUX AQUATIQUES Prétraitement des échantillons

La caractérisation physique et chimique de la matière organique aquatique intéresse un grand nombre de disciplines scientifiques. Dans les environnements aquatiques marins ou continentaux, la matière organique se présente sous la forme d'un continuum d'espèces de tailles et de masses moléculaires qui donne à toute séparation un caractère opératoire que l'analyse et son interprétation doivent prendre en considération, qu'il s'agisse de ses composantes biogéniques (biogéomarqueurs) ou anthropogéniques (micropolluants organiques). La séparation dissous/particulaire par filtration frontale à $0,45\ \mu\text{m}$ qui présente un grand nombre d'avantages pratiques achoppe dans de très nombreuses situations, en particulier, lors de la présence de colloïdes. Des solutions peuvent être apportées au problème de la séparation granulométrique des phases par des filtrations tangentielles séquentielles (microfiltration, ultrafiltration) qui sont à évaluer selon les objectifs sur le terrain, ou au laboratoire en termes de disponibilité de temps et de matériel. La panoplie des méthodes d'analyse de la matière organique peut se diviser en deux grands types : des méthodes dites « globales » car elles concernent l'ensemble des espèces mono- et polymériques contenues dans le carbone organique (COP ou COD) et des méthodes qualifiées de « moléculaires » qui permettent d'identifier des fractions constituées de molécules ou de familles de molécules. Ces dernières méthodes présentent toutes des contraintes strictes à respecter en fonction des méthodes d'analyses envisagées car elles supposent une succession d'opérations de prétraitement des prélèvements d'eau (filtration, extraction, concentration, séparation) qui peut être réalisée sur le terrain ou dans un laboratoire proche. Il s'agit de la séparation granulométrique par filtration frontale ou tangentielle et l'extraction liquide-liquide par un solvant organique ou l'extraction liquide-solide sur des supports tels que les résines (XAD) que nous illustrerons respectivement par le protocole d'analyse des lipides et celui des substances humiques.

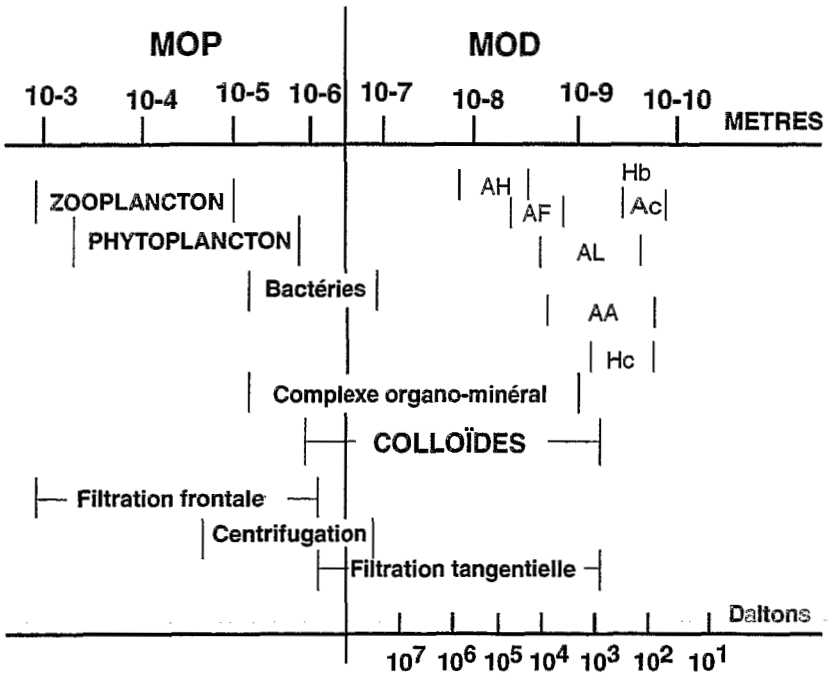
1. Introduction

L'analyse de la matière organique des eaux naturelles intéresse un grand nombre de disciplines allant des sciences de la vie aux sciences de la terre et de l'environnement sur de vastes champs d'investigation à la fois fondamentaux comme le cycle du carbone (HOLMEN 1992) et appliqués et finalisés comme la qualité des eaux par exemple (BRUCHET 1991).

Dans les eaux naturelles, la matière organique se présente sous forme d'un continuum d'espèces de tailles et de masses moléculaires (fig. 1) qui donne à toute séparation granulométrique un caractère opératoire, qu'il s'agisse d'analyser les composantes biogéniques (lipides, acides aminés, sucres, etc.) (SALIOT *et al.* 1988) ou d'identifier les micropolluants organiques dissous (TRONCZYNSKI *et al.* 1987, HENNION et SCRIBE 1993) ou adsorbés sur les particules. Par ailleurs, les teneurs en matière organique dissoute ou particulaire peuvent varier de deux ordres de grandeur selon les types d'eaux naturelles (THURMAN 1985).

Figure 1 : Continuum de tailles et de masses moléculaires de la matière organique dissoute et particulaire dans les eaux naturelles.

AH : acide humique ; AF : acide fulvique ; AL : acides hydrophylques ; Hb : hydrocarbures ; Ac : acides gras ; Aa : acides aminés ; Hc : sucres.



La séparation des phases dissoutes et particulaires par filtration frontale à $0,45\mu\text{m}$ ou $0,7\mu\text{m}$ est une simplification qui présente des avantages pratiques évidents mais qui achoppe et pose de nombreux problèmes interprétatifs en chimie et géochimie des eaux, en particulier lors de la présence de colloïdes minéraux ou organiques dans les échantillons à analyser.

Nous ne parlerons pas ici du prétraitement des échantillons dans le cas des méthodes globales (analyse élémentaire, isotopique, pyrolyse) pour nous limiter au prétraitement des échantillons des méthodes qualifiées de moléculaires car elles procèdent par une séquence de filtration, extraction, et après purification à l'identification de molécules par chromatographie en phase gazeuse (CPG) ou liquide (CPL) couplée à des détecteurs variés tels que l'ionisation de flamme (FID) dont certains sont spécifiques (NPD, capture d'électrons,...) ou encore la spectrométrie de masse (SM). Ces opérations préalables, plutôt banales, demandent un très grand soin et sont cruciales pour le succès de l'analyse.

La première opération succédant au prélèvement est une séparation granulométrique qui peut être une filtration frontale ou tangentielle qui permet en particulier d'accéder par étapes successives au domaine de l'ultrafiltration (jusqu'à 1 000 Daltons). La seconde opération de prétraitement de l'échantillon est une extraction soit liquide-liquide par les solvants organiques, soit liquide-solide par percolation sur une colonne de résine que nous illustrerons respectivement avec les exemples des lipides et des acides humiques et fulviques.

Le prétraitement de l'échantillon est toujours le maillon faible de l'analyse globale qui comprend le prélèvement de l'échantillon, son prétraitement, l'analyse chromatographique et le traitement des données. C'est de loin l'étape la plus longue, puisqu'elle représente en moyenne 60 % environ du temps total d'analyse. C'est également la première source d'erreurs et d'écarts des résultats entre laboratoires. De plus, la plupart des méthodes comportent de nombreuses étapes longues et manuelles. Notre but n'est pas de donner ici des modes opératoires mais plutôt de discuter brièvement les méthodes qui nous paraissent les plus performantes pour préparer des échantillons de matière organique en vue de l'analyse moléculaire ou spectroscopique.

2. Composition et classification chimique de la matière organique

2.1. Un continuum de tailles et de masses moléculaires

La matière organique des eaux naturelles est constituée d'un grand nombre d'espèces chimiques qui s'échelonnent en un continuum de tailles de quelques angströms à quelques millimètres et pour des masses moléculaires de 16 (le méthane) à plusieurs milliers de daltons dans le cas des biopolymères et des

substances humiques (fig. 1). Aux composés organiques d'origine biogénique, il faut ajouter les micropolluants, composés organiques de synthèse ou composés xénobiotiques (de masse moléculaire en général inférieure à 600) résultant de l'activité humaine et des pollutions accidentelles ou diffuses dues aux rejets urbains et industriels.

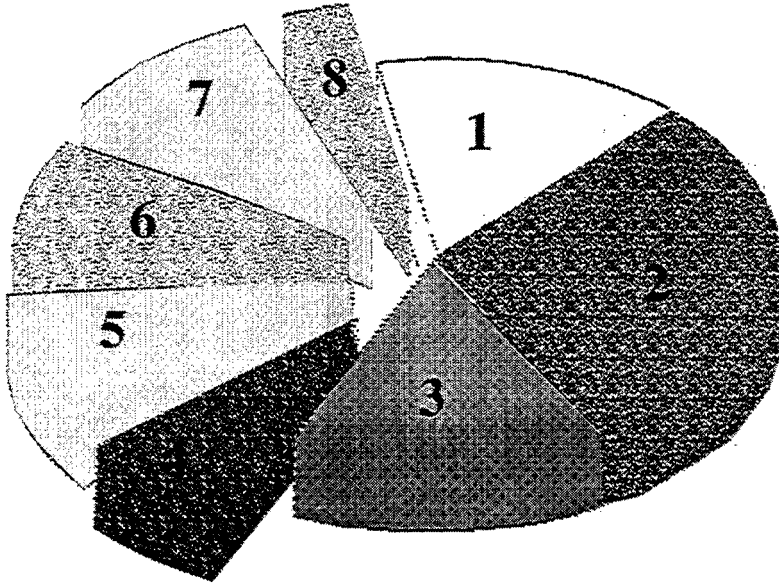
La matière organique des eaux naturelles revêt une multitude de formes physiques : cellules vivantes, sénescences ou à divers stades de leur lyse, microgouttes, films, pellicules adsorbées sur des particules minérales, mycelles, colloïdes, solutés,.... Les géochimistes et chimistes de l'environnement ont l'habitude de distinguer la matière organique dissoute (MOD) de la matière organique particulaire (MOP) et colloïdale (MOC). Ces définitions ont un caractère purement expérimental. La MOD correspond à ce qu'on isole dans la phase aqueuse après filtration de l'eau brute sur une membrane ou un filtre de nature et de porosité variables selon les auteurs et les disciplines. L'analyse moléculaire contraint d'utiliser des filtres extractibles par les solvants organiques. Les filtres en fibre de verre de $0,7\mu\text{m}$ de porosité sont les plus couramment employés (Figure 1). La fraction colloïdale est constituée la plupart du temps par des mélanges de colloïdes minéraux (hydroxydes de fer par exemple) et organiques dont ces derniers représentent des proportions variables de la MOD. Souvent inférieurs à 20 % de la MOD dans les eaux peu productives, les colloïdes organiques peuvent culminer au-dessus de 50 % dans les eaux stagnantes des marais. Les colloïdes organiques dans les eaux lacustres ont pour origine, soit des apports de matière organique allochtone d'environnements acides (marais, lagunes), soit le résultat d'une production autochtone (excrétat, exudat cellulaire). Ils sont en général constitués de polymères insuffisamment chargés pour flocculer ou former des agrégats dans une eau de trop faible conductivité électrique. Actuellement, on ne possède encore que très peu de données sur la fraction colloïdale des eaux naturelles qui se trouve répartie entre la phase dissoute et particulaire selon la porosité des filtres employés. Elle peut être néanmoins isolée par ultracentrifugation ou ultrafiltration à l'aide de membranes permettant le fractionnement entre $1\mu\text{m}$ et 1nm , limite au-delà de laquelle, on considère que les espèces chimiques sont véritablement des solutés.

2.2. Classification chimique

On peut regrouper les différentes familles chimiques qui composent la matière organique en huit classes de proportions variables (Figure 2) selon les diverses contributions (autochtones ou allochtones) et la nature particulaire, dissoute ou colloïdale de la matière organique.

Figure 2 : Classification chimique des composantes de la matière organique

1-acide fulvique ; 2- acide humique ; 3- humine ; 4- lipides : acides gras, alcools gras, stéroïdes ; 5- sucres : polyoses, oses,...; 6- protides : polypeptides, acides aminés,...; 7- lignine : dérivés phénoliques ; 8- composés à l'état de traces : pigments, vitamines, micropolluants,...



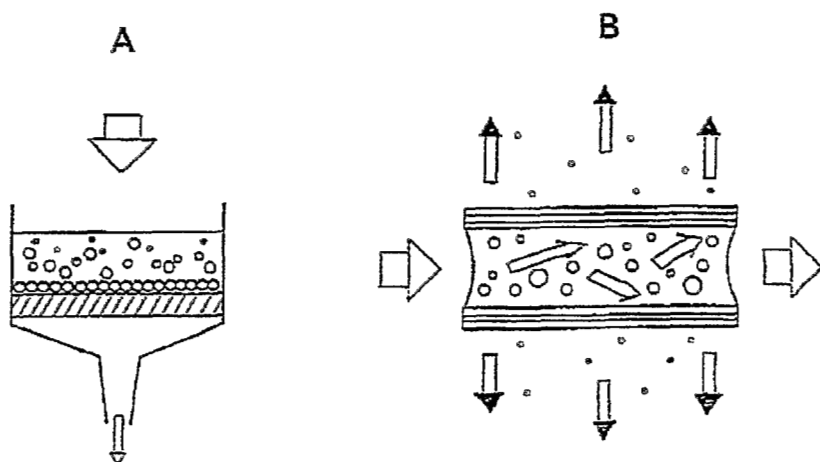
On distingue les classes constitutives de la matière vivante végétale ou animale : lipides, sucres, protides, lignine et leurs constituants car ces composés sont en général des molécules complexes qu'une simple hydrolyse ou un traitement acide ou basique suffit à dégrader en leurs composants initiaux (acides gras et alcools pour les lipides, oses et polyoses pour les sucres, acides aminés pour les protéines et dérivés phénoliques pour les lignines). Les substances humiques sont des acides carboxyliques poly-électrolytes qu'on peut isoler par adsorption sur une résine XAD ou autres procédures comparables. Leur masse moléculaire est comprise entre 500 et 10 000 daltons et sont généralement issus du lessivage des sols. En milieu acide, une partie de ces substances précipite en acide humique, la partie restant en solution constituant l'acide fulvique. Cette dernière partie est plus soluble dans l'eau en raison d'un nombre plus important de groupes hydroxyl et carboxyl et d'une plus faible masse moléculaire (de 800 à 2 000 daltons). Une partie (30 % environ du carbone organique dissous) n'est pas retenue par la résine XAD à pH2, ce sont les acides hydrophiliques. Enfin, on peut rassembler dans une fraction, les composés à l'état de traces comprenant des substances plus ou moins polaires : pigments, vitamines, composés soufrés phosphorés et parfois micropolluants.

3. Séparation granulométrique

Qu'il s'agisse des études biogéochimiques sur l'origine et l'évolution de la matière organique ou le mode de transport des micropolluants en milieu aquatique, il est souvent nécessaire d'opérer des fractionnements dans le continuum de tailles et de masses moléculaires des espèces organiques associées ou non à la matière minérale. Plusieurs dispositifs permettent d'effectuer des séparations granulométriques contrôlées selon les types et les volumes d'eau, leur charge en suspensions (MES) et en colloïdes. On distinguera les filtrations frontales, les filtrations tangentielles (fig. 3).

Figure 3 : Types de filtration.

A : frontale ; B : tangentielle.



Tout d'abord, quelles sont les coupures pertinentes à opérer dans des eaux naturelles ? Il n'y a évidemment pas de règles, les fractionnements dépendront des objectifs poursuivis, et seront choisis en fonction du matériel à recueillir : planctonique pour les biologistes, minérales pour les géologues ou les géochimistes. On peut néanmoins pour l'étude de la matière organique opérer les fractionnements suivants (IRACE et SCRIBE, résultats non publiés) :

Par filtration frontale sur grille d'innox ou de polyamide

- 200 ou 300 μm : préfiltration grossière du prélèvement qui comporte souvent dans les eaux de surface des « accidents » non représentatifs du milieu qui peuvent fausser l'analyse (débris de bois, détritus, zooplancton).
- 50 ou 63 μm : limites empiriques des sables grossiers des géologues et des sédimentologues.

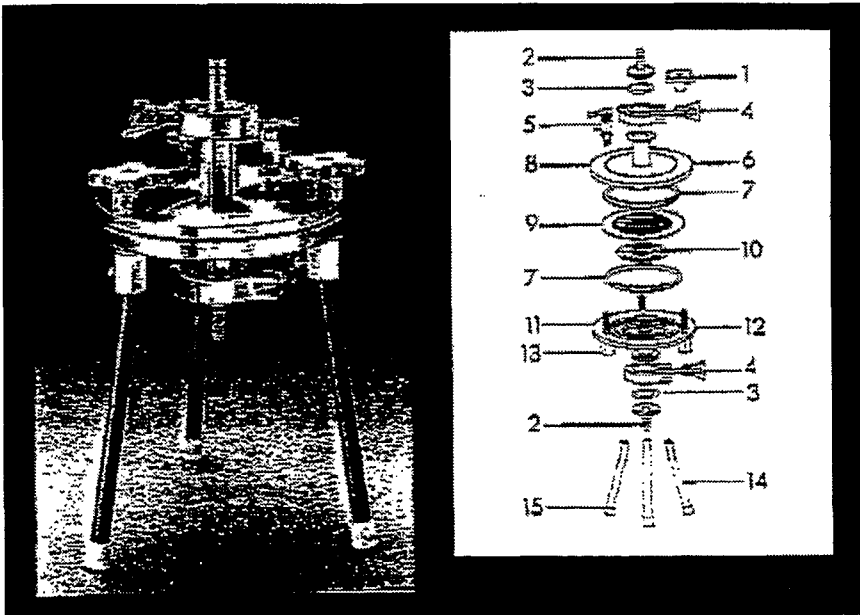
Pour les volumes d'eau peu chargée inférieurs à 5 litres, les grilles de 40mm peuvent être placées à l'intérieur du joint silicone (fig. 4). Pour les volumes plus importants ou pour des eaux très chargées, on utilise un support constitué de deux disques d'acier inoxydable de 140 mm de diamètre de même type que celui montré à la figure 4 et simplement modifié pour recevoir une grille (et non plus un filtre dont le bord pincé entre les deux plateaux d'entrée et de sortie assure l'étanchéité du système).

Par filtration frontale sur filtre de fibre de verre (fig. 4)

- 0,45 ou 0,7 μm : récupération d'une partie des argiles, des organismes phytoplanctoniques et de la biomasse bactérienne qui lui est associée. C'est également la limite empirique du compartiment particulaire/dissous la plus couramment admise.

Figure 4 : Porte-filtre en acier inoxydable (Millipore)

1- écrou de serrage manuel. 2- raccord pour tuyau souple. 3- joint silicone. 4- collier de serrage. 5- vanne de sécurité et de purge. 6 et 12- plateau d'entrée et de sortie en acier inoxydable. 14 et 15- jeu de 3 pieds avec capuchon.

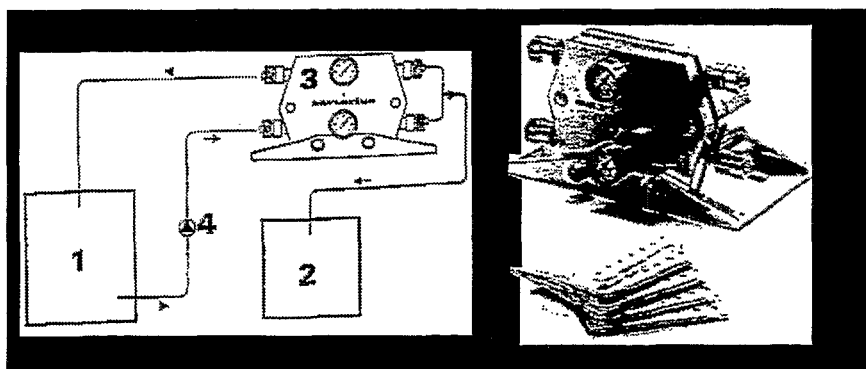


Par filtration tangentielle (fig. 5)

- 0,22 μm : coupure nécessaire pour approcher la limite supérieure de la fraction colloïdale (définie dans la littérature comme la fraction comprise entre 0,1 μm et 1 nm (1 KD)).
- < 0,1 μm : cette fraction est considérée comme le « dissous vrai ». Le seuil inférieur des colloïdes correspond à 2 nm soit environ 10 000 daltons (10 KD).

Qu'il s'agisse d'ultrafiltration (entre 0,01 μm et 1 nm) ou de microfiltration (0,05 μm et 5 μm), la technique du flux continu tangentiel est utilisée pour limiter le colmatage en surface des membranes.

Figure 5 : Schéma de l'appareil de filtration tangentielle (Sartorius) (UltraSart-Mini) et types de membranes utilisées en filtration et ultrafiltration
1- Rétentat, 2- perméat ou ultrafiltrat, 3- bâti support des membranes, 4- pompe d'alimentation



FILTRATION

Porosité (μm)

0,45
0,2
0,2
0,1

Matière

acétate de cellulose
acétate de cellulose
polyoléfine
polyoléfine

ULTRAFILTRATION

Seuil de coupure (Daltons)

300 000
100 000
20 000
10 000
5 000

Matière

Polysulfone
Polysulfone
Polysulfone/triacétate de cellulose
Polysulfone/triacétate de cellulose
Triacétate de cellulose

Les membranes d'ultrafiltration peuvent être considérées comme une collection de pores capillaires compris entre 1 nm et 100 nm de rayon.

Parmi les grandes familles de membranes, nous pouvons distinguer : les membranes copolymères asymétriques formées de polyélectrolytes de charges opposées, mais leur résistance au pH et à la température est limitée, les membranes minérales avec une bonne résistance aux variations de pH et de température pas suffisamment connues et difficiles à trouver. Enfin, il existe un troisième type de membranes asymétriques à base de polyamides, de polymères fluorés ou de polysulfones qui sont mieux adaptées à la séparation de la MO.

Plutôt que par un diamètre de pores, on caractérise une barrière d'ultrafiltration par un seuil de coupure qui est la valeur nominale de la masse moléculaire au-delà de laquelle toute molécule quelle que soit sa conformation stérique sera retenue.

4. Extraction

L'extraction de la matière organique de la phase dissoute (filtrat ou ultrafiltrat) est une nécessité incontournable pour son transport et doit être effectuée dans les heures qui suivent le prélèvement, ce qui pose en général toute une série de problèmes au chimiste sur le terrain. Contrairement aux filtrations qui peuvent être réalisées relativement aisément dans des conditions précaires (abri, bateau,...) l'extraction de la matière organique requiert un matériel (extracteurs, colonnes...), des solvants ultrapurs et peut difficilement être réalisée en dehors d'un laboratoire, même rudimentaire. Par ailleurs, contrairement aux échantillons de particules déposées sur les filtres qui peuvent voyager sans problème à -20°C dans une glacière munie de bloc de congélation, le volume (20 litres ou plus) et le poids des échantillons d'eau filtrée, la vitesse de dégradation de la majeure partie des composés organiques interdisent tout transport au-delà de quelques heures. On aura donc intérêt à extraire le plus rapidement possible, soit par extraction liquide-liquide avec un solvant organique, soit par extraction liquide-solide que nous illustrerons par deux exemples respectivement, les lipides et les substances humiques pour lesquels ces méthodes ont fait leurs preuves et sont particulièrement adaptées.

4.1. Extraction liquide-liquide

L'extraction liquide-liquide est sans doute la méthode de préconcentration la plus ancienne et la plus simple. En particulier, pour les composés organiques dissous dans les eaux naturelles, une large gamme de solvants de polarité et de densité variables est disponible dans le commerce : hexane, éther de pétrole, toluène, chloroforme, dichlorométhane, octanol... L'efficacité d'une extraction dépend en premier lieu de l'affinité du soluté pour le solvant et se

mesure généralement par la valeur du coefficient de partage octanol-eau. La sélection d'un solvant pour l'extraction peut se faire selon la nature des composés recherchés. On choisit, en général un solvant plus ou moins polaire de densité inférieure ou supérieure à l'eau et on augmente le coefficient de partage soit en ajustant le pH pour prévenir l'ionisation des acides ou des bases dans le cas de solutés ionisables, soit en additionnant un sel pour diminuer la solubilité des composés organiques dans l'eau. L'extraction par paires d'ions peut être aussi utilisée pour les composés ionisables, en particulier les acides hydrophylques et plus généralement pour accroître la sélectivité qui reste le point faible de cette méthode. L'extraction peut être réalisée de façon discontinue, en ampoule à décanter jusqu'à l'obtention d'un équilibre entre les deux phases non miscibles ou bien en continu sans nécessairement atteindre l'équilibre.

4.1.1. *Extraction discontinue*

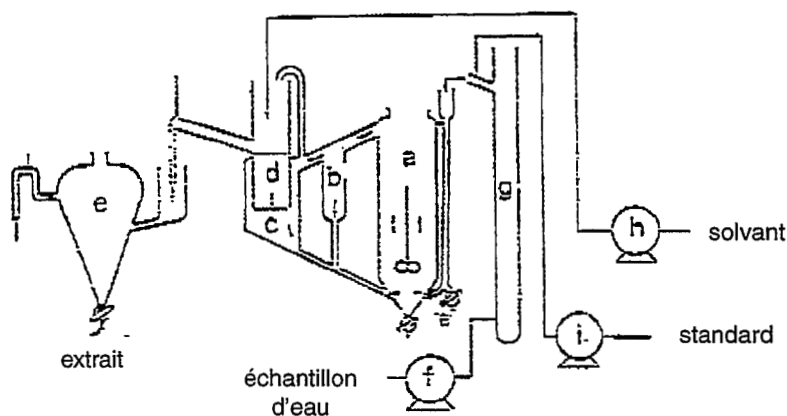
Pour les extractions discontinues, le coefficient de partage doit être suffisamment élevé car les limites pratiques de la méthode sont rapidement atteintes, à savoir : volume d'eau à extraire, volume de solvant à manipuler, nombre et durée des extractions. Les extractions de petits volumes (< 5 litres) sont en général traitées en ampoule à décanter manuellement ou mécaniquement agitée. Pour les volumes supérieurs (5 à 20 litres), à l'échelle du laboratoire, on utilise des enceintes généralement de verre munies d'un robinet de soutirage et d'un agitateur plus ou moins sophistiqué permettant une dispersion maximale du solvant organique dans la phase aqueuse. Dans de rares cas, la sélectivité est suffisante ou du moins compatible avec les exigences de la chromatographie gazeuse (CPG) lorsqu'une détection spécifique est utilisée pour effectuer l'injection après séchage de l'extrait. Les avantages de ce type de méthode sont bien sûr la simplicité de l'appareillage, sa rapidité de mise en œuvre et son faible coût. Néanmoins, la plupart du temps et quel que soit le type de détecteur utilisé en CPG, il est nécessaire de procéder à une purification de l'échantillon (clean-up) par chromatographie liquide sur une mini-colonne de silice ou de florisil. Par ailleurs, cette méthode présente l'inconvénient de former des émulsions que divers moyens permettent de supprimer ou de limiter : filtration, centrifugation, ajout d'un sel ou d'une petite quantité de solvant. En outre, pour l'analyse des composés ubiquistes à l'état de traces comme les acides gras et les hydrocarbures, les risques de contamination par les solvants et la verrerie sont permanents. L'évaporation de grands volumes de solvant d'extraction est aussi une source de pollution supplémentaire.

4.1.2 Extraction continue

L'extraction en continu est utilisée pour de larges volumes d'eau (> 20 litres) et pour des coefficients de partage plus faibles. Il existe plusieurs appareils décrits dans la littérature pour des solvants plus lourds ou plus légers que l'eau. Plusieurs appareils ont été mis au point en particulier au Canada, à l'Institut national de Recherche sur les Eaux (INRE) avec l'objectif d'extraire les micro-polluants organiques à l'état de traces des eaux naturelles.

Figure 6 : Schéma d'un extracteur liquide-liquide en continu (INRE-Canada).

a- mélangeur ; b- 1^{er} décanteur ; c- 2^e décanteur ; d- colonne remplie ; e- séparateur ; f- pompe échantillon ; h- pompe solvant ; pompe d'injection du standard ; (d'après GOULDEN et ANTHONY 1987 In : HENNION et SCRIBE 1992).



L'appareil canadien (fig. 6) est constitué d'une chambre de mélange en pyrex (a) et de trois unités de décantation successives, les deux premières (b et c) assurant un recyclage du solvant et la troisième faisant office de séparateur (e). L'eau est introduite à la base de la chambre de mélange (f) après une régulation de température à 20-22 °C (g). Le solvant est admis à travers une colonne remplie (d) réalisant une ultime extraction et de façon à compenser les pertes de solvant dues à sa dissolution dans l'eau. L'appareil peut extraire un litre d'eau par minute. Un système d'injection continue d'un standard (j) permet le calcul et le contrôle des rendements d'extraction. Cet appareil est prévu pour fonctionner avec des solvants plus lourds que l'eau. Ses rendements varient d'un composé à l'autre mais sont généralement nettement inférieurs à ceux obtenus en ampoule à décantier (souvent de 20 à 50 % inférieurs) mais cette perte est largement compensée par la capacité de cet appareil à traiter de grands volumes d'eau (200 litres).

4.1.3 Analyse des lipides

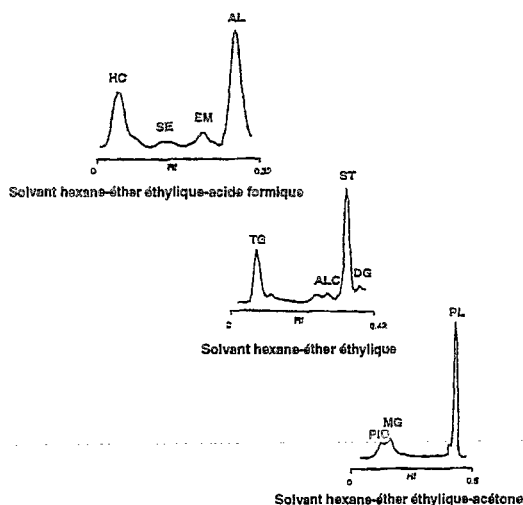
L'analyse des lipides comprend donc deux étapes de prétraitement : la première est une filtration (le plus couramment à $0,7\mu\text{m}$ sur des filtres de fibre de verre) qui va permettre de séparer les lipides associés aux particules et ceux restant dans le filtrat (dont on peut considérer qu'une partie est adsorbée sur des particules $< 0,7\mu\text{m}$, une partie associée aux colloïdes, et enfin une partie réellement dissoute). La seconde est une étape d'extraction par un solvant organique, généralement chloré (chloroforme ou dichlorométhane) qui conduit après concentration par évaporation du solvant à un extrait facilement transportable (à $-20\text{ }^\circ\text{C}$ néanmoins).

L'échantillon est ainsi prêt pour l'analyse proprement dite, soit par une technique qui préserve les distributions initiales des lipides dans l'échantillon, c'est la technique chromatographique du Iatroscan (PARRISH *et al.* 1988), soit par une méthode qui inclut une saponification pour accéder aux constituants des lipides : acides et alcools gras.

La technique du Iatroscan allie la chromatographie en couche mince sur des baguettes recouvertes de silice, « rod » couplée à la détection à ionisation de flamme ; elle permet de séparer les lipides neutres (hydrocarbures, cires, esters méthyliques et acides gras libres) et (triglycérides, alcools, stérols), les lipides plus polaires élués avec un mélange éther éthylique/acétone, (monoglycérides et phospholipides) (fig. 7).

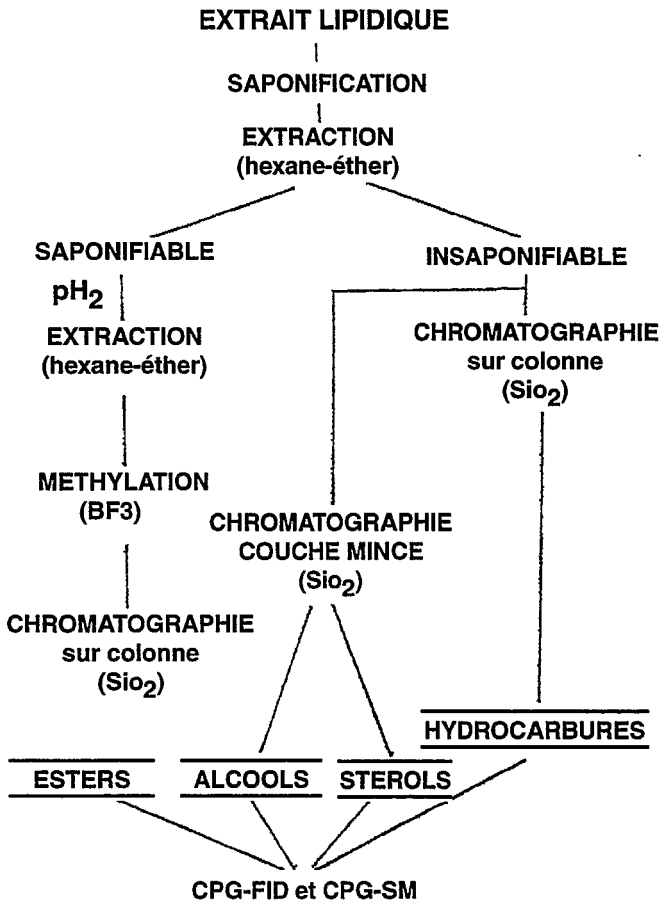
Figure 7 : Chromatogramme obtenu par la technique Iatroscan

D'un échantillon de mucus (mer Adriatique Nord), en utilisant trois systèmes de solvant d'éluion et montrant la séparation de différentes classes de lipides. HC : hydrocarbures ; SE : esters de stérols ; EM : esters méthyliques ; AL : acides gras libres ; TG : triglycérides ; ALC : alcools ; ST : stérols ; DG : diglycérides ; PIG : pigments ; MG : monoglycérides ; PL : phospholipides. (D'après MÉJANELLE 1994, In : SALIOT 1994)



La seconde méthode permettant d'analyser les lipides procède par une saponification effectuée à chaud en présence d'une solution de potasse méthanolique qui permettra de couper les liaisons esters et d'isoler deux fractions, l'une saponifiable, l'autre insaponifiable (fig. 8).

Figure 8 : Schéma du traitement des lipides en vue de l'analyse de leurs constituants



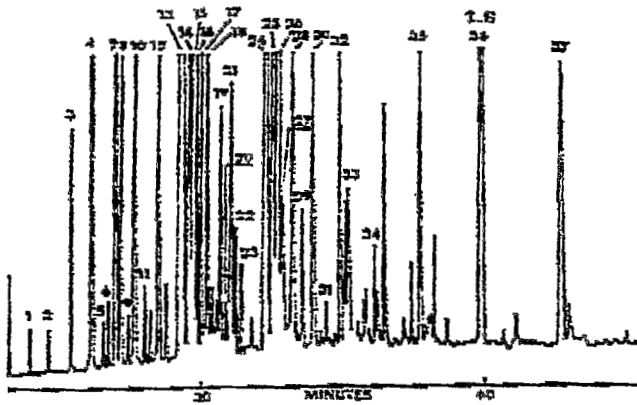
La partie insaponifiable est extraite en présence d'eau par un solvant tel que l'hexane ou l'éther ; l'acidification de la solution aqueuse libère les acides qui seront à leur tour extraits et devront être méthylés au trifluorure de bore (BF3) avant d'être analysés en chromatographie gazeuse (fig. 8). Quant à la partie saponifiable, elle donnera accès aux alcools, aux stérols et aux hydrocarbures après

un traitement soit par chromatographie sur silice en couche mince ou sur colonne. Toutes les fractions ainsi préparées peuvent être analysées en chromatographie en phase gazeuse (CPG) couplée à une détection ionisation de flamme (FID). Un chromatogramme (CPG) d'esters méthyliques d'acides gras est présenté à la figure 9. Il permet de quantifier 36 acides gras identifiés par leur temps de rétention et dans certains cas avec l'aide de la spectrométrie de masse (SM).

Figure 9 : Chromatogramme (CPG/FID) des esters méthyliques des acides gras
(d'après SCRIBE *et al.* 1988)

Appareil Girdel 32, colonne de silice (50 m x 0,25 mm d.i.), CP Sil88 (Chrompack) programmation de température (2 °C/mn de 100 °C à 195 °C).

Les acides gras saturés sont notés N : M (N = nombre d'atomes de carbone et M = nombre de doubles liaisons ; les acides gras insaturés sont notés Z ou EL-N : M (L = position de la première double liaison selon la nomenclature de l'IUPAC ; br = ramifié ; cy = cyclique. (1) iso 13 : 0, (2) 13 : 0, (3) iso 14 : 0, (4) 14 : 0, (5) Z6-14 : 1, (6) br-15 : 0, (7) iso 15 : 0, (8) ante 15 : 0, (9) br6-15 : 1, (10) 15 : 0, (11) Z6-15 : 1, (12) iso 16 : 0, (13) 16 : 0, (14) Z6-16 : 1, (15) Z9-16 : 1, (16) Z11-16 : 1, (17) iso 17 : 0, (18) ante 17 : 0, (19) 17 : 0, (20) Z6-17 : 1, (21) Z9-17 : 1, (22) Z11-17 : 1, (23) cy 17 : 0, (24) 18 : 0, (25) Z9-18 : 1, (26) Z11-18 : 1, (27) Z9 Z6-18 : 2, (28) Z12 Z9- 18 : 2, (29) 19 : 0, (30) cy 19 : 0, (31) Z15 Z12 Z9-18 : 3, (32) 20 : 0, (33) Z11-20 : 1, (34) 21 : 0, (35) 22 : 0, (36) 23 : 0 standard interne, (37) 24 : 0.



4.2. Extraction liquide-solide

L'extraction liquide-solide est bien adaptée à l'extraction des substances humiques par simple percolation de l'échantillon d'eau acidifiée à pH2 sur une colonne de résine XAD. Le choix de l'adsorbant et le volume que l'on peut percoler et les rendements attendus sont liés à la connaissance du principe de cette méthode.

4.2.1 Principe de la méthode

Les échantillons sont percolés à travers un adsorbant contenu dans une cartouche soit en verre ou en plastique, soit encore dans une colonne métallique. L'adsorbant retient la matière organique alors que l'eau passe au travers. Les composés sont élués ensuite par un solvant organique ou une solution acide ou basique selon la nature du support solide et des composés recherchés (neutres ou ionisés). L'extraction liquide-solide est en première approximation un simple processus chromatographique caractérisé par une rétention maximale des solutés lors de leur adsorption (l'eau de l'échantillon est alors la phase mobile) et une rétention minimale lors de leur désorption. La fin de fixation des composés sur l'adsorbant peut être due à une rétention insuffisante des composés dans l'eau ou à un dépassement de la capacité de l'adsorbant.

4.2.2 Extraction des substances humiques

Cette méthode est couramment utilisée pour l'isolement des substances humiques dissoutes. L'eau acidifiée à pH2 est percolée à travers une résine XAD-2, qui sont des polymères de méthylmétacrylate non ioniques qui adsorbent la matière organique en créant des liaisons hydrophobes. La matière organique adsorbée est alors éluee par une solution aqueuse basique (0,2N, NaOH), ce qui permet d'isoler une fraction acide hydrophobe (humique et fulvique). Une élution au méthanol conduit à l'isolement d'une fraction neutre hydrophobe (HUBBERTEN *et al.* 1994 et références citées). De nombreuses variantes de ce protocole existent (LEENHEER 1981 ; STUERMER and HARVEY 1977, MALCOLM 1990) dont un protocole d'extraction standard en 20 étapes utilisant la résine XAD-8 à l'instigation de l'International Humic Substances Society (IHSS). Ce protocole qui permet d'isoler l'acide humique, insoluble dans l'eau à pH acide et l'acide fulvique qui reste en solution n'est d'ailleurs pas à considérer comme la meilleure méthode mais plutôt comme une méthode de référence.

D'autres exemples d'extraction liquide-solide de composés organiques des eaux naturelles ont été publiés. Citons l'extraction des hydrocarbures aliphatiques et aromatiques, les PCBs et les acides gras sur des colonnes de résine XAD-2 et des mousses de polyuréthane (GOMEZ-BELINCHON *et al.* 1988) et l'extraordinaire développement des méthodes de préconcentration des micropolluants organiques sur cartouches de silice greffées, de copolymères de styrène-divinylbenzène (PRP-1, PLRPS...) ou de carbone graphitisé (HENNION et SCRIBE 1993 et références citées).

5. Conclusion

L'analyse de la matière organique et de ses constituants moléculaires nécessite rapidement après le prélèvement, un prétraitement de l'échantillon qui comporte une séparation granulométrique et une extraction.

La séparation dissous/particulaire par une filtration frontale à $0,7\mu\text{m}$ est parfois remise en cause au profit de la filtration tangentielle permettant d'opérer des microfiltrations et des ultrafiltrations. On isole ainsi des fractions enrichies en colloïdes et de matière organique complexe.

L'extraction liquide-liquide à l'aide d'un solvant organique (chloroforme ou dichlorométhane) est la méthode encore la plus utilisée pour les constituants neutres et peu polaires (type lipides). Aucun des inconvénients soulignés n'est insurmontable, mais leur accumulation pour les grands volumes d'eau en font une méthode très laborieuse.

L'extraction liquide-solide est particulièrement bien adaptée à l'extraction des substances humiques et des composés neutres. Ces méthodes devraient accroître la vitesse et l'efficacité de la préparation des échantillons grâce au développement d'appareillages automatisés.

6. Références

- BRUCHET A. (1991). Recent methods for the determination of volatile and non-volatile organic compounds in natural and purified drinking water. *Journal of Chromatography*, 562 : 469-480.
- HENNION M.C. et SCRIBE P. (1992). Analyse des pesticides dans les eaux : prétraitement des échantillons. In : *Bilan et perspectives analytiques du dosage des pesticides et de leurs résidus dans les eaux*. Treiner et Carbonnel Eds., Ministère de l'Environnement, Paris, 1 : 55-79.
- HENNION M.C. et SCRIBE P. (1993). Sample handling strategies for the analysis of organic compounds from environmental water samples. In : *Environmental Analysis. Techniques. Applications and Quality Assurance*. Ed. D. Barcelo. Elsevier Science Publishers : 23-77.
- HOLMEN K. (1992). The global carbon cycles. In : *Global biogeochemical Cycles*. Eds. Butcher S.S. et al. Academic Press, Londres, 379 p.
- HUBBERTEN U, LARA R.J. and KATTNER G. (1994). Amino acid composition of Sea water and dissolved humic substances in Greenland Sea. *Marine Chemistry*, 45 : 121-128.
- GOMEZ-BELINCHON J. I., GRIMALT J.O. and ALBAIGES J. (1988). Inter-comparison study of liquid-liquid extraction and adsorption on polyurethane and amberlite XAD-2 for the analysis of hydrocarbons, polychlorobiphenyls and fatty acids dissolved in seawater. *Environ. Sci. Technol.*, 22 : 677-685.

- LEENHEER J.L. (1981). Comprehensive approach to preparative isolation and fractionation of dissolved organic carbon from natural waters and wastewaters. *Environ. Sci. Technol.*, 15 : 578-587.
- MALCOLM R.L. (1985). Humic substances in rivers and streams. In : *Humic Substances I. Geochemistry, Characterization and Isolation*. Eds. G.R. Aiken, P. MacCarthy, D. McKnight and R.L. Wershaw. John Wiley Inc. Publisher, New York.
- PARRISH C.C., WANGERSKY P.J., DELMAS R.P. and ACKMAN R.G. (1988). Latroscan-measured profiles of dissolved and particulate marine lipid classes over the Scotian Slope and in Bedford Basin. *Mar. Chem.*, 23 : 1-15.
- SALOT A., TRONCZYNSKI J., SCRIBE P. and LÉTOLLE R. (1988). The application of isotopic and biogeochemical markers to the study of the biochemistry of organic matter in a macrotidal estuary, the Loire, France. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 27 : 645-669.
- SALOT A (1994). Biogéochimie organique marine. *Océanis* (série de documents océanographiques) vol. 20, fascicule 1-2, 197 p.
- SCRIBE P., GUEZENNEC J., DAGAUT J., PÈPE C. and SALOT A. (1988). Identification of the position and the stereochemistry of the double bond in monounsaturated fatty acid methyl esters by gas chromatography/Mass Spectrometry of Dimethyl disulfide derivatives. *Anal. Chem.*, 60 : 928-931.
- STUERMER D.H. and HARVEY G.R. (1977). The isolation of humic substances and alcohol-soluble organic matter from seawater. *Deep-Sea Research*, 24 : 303-309.
- THURMAN E.M. (1985). *Organic geochemistry of natural waters*. Editeur : Martinus Nijhoff and Dr W. Junk Publishers, Dordrecht/Boston/Lancaster, 497 p.