Analyse isotopique du ¹³C en abondance naturelle dans le carbone organique : un système automatique avec robot préparateur

Cyril GIRARDIN, André MARIOTTI

Université Pierre et Marie Curie – INRA, Laboratoire de biogéochimie isotopique, case nº 120, 4 place Jussieu, 75252 Paris Cedex 05

Résumé

Nous présentons un robot préparateur permettant en routine l'analyse isotopique ¹³C du carbone organique de plus de 40 échantillons par jour (ou par nuit). Les échantillons subissent une combustion dans un analyseur élémentaire de type CHN et les gaz produits sont purifiés et séparés cryogéniquement dans une interface composée de pièges à différentes températures, contrôlables, avant d'être introduits dans un spectromètre de masse isotopique à double introduction et triple collection, permettant la mesure relative du rapport isotopique par comparaison quasi instantanée de l'échantillon avec une référence. Pour des échantillons soigneusement broyés et homogénéisés, la précision des mesures est peu différente de la précision interne du spectromètre de masse. En fonction de la faible masse des échantillons introduits dans le système, cet outil rend nécessaire un excellent broyage des échantillons de végétaux ou de sol (< 100 µm), afin d'obtenir une prise d'essai représentative et une bonne reproductibilité des valeurs de $\delta^{13}C$.

MOTS CLÉS : ¹³C – Matière organique – Technique analytique.

Abstract

Automated analysis system for ^{13}C natural abundance measurement in organic carbon

An automatic system can analyse in routine more than 40 samples per day (or overnight) for stable organic carbon isotope composition. Samples are combusted and converted to carbon dioxide, dinitrogen and water in an elemental analyser (CHN-type) then cryogenically purified and separated in a trapping system with different and variable temperatures and finally introduced in an isotopic mass spectrometer equipped with double inlet system an triple ionic collection and fitted for rapid switching and comparison between samples and reference. Measurements of carefully crushed and homogeneised chemicals or natural samples are obtained with standard deviations close to those of the mass spectrometer itself. Due to the small sample size, natural samples have to be crushed to < 100 μ m in order to be representative and analyzed with good reproducibility.

KEY WORDS : ${}^{13}C$ – Organic matter – Analytical method.

INTRODUCTION

Les isotopes des éléments stables légers (C, N, O, H, S) sont des traceurs d'origine, de processus et de dynamique, et l'étude des variations de leurs abondances naturelles est largement utilisée pour la compréhension du fonctionnement des cycles biogéochimiques majeurs de la surface : carbone, azote, soufre et eau. En science du sol, l'utilisation du ¹³C s'est récemment très largement développée, comme en témoignent les divers sujets abordés dans les articles réunis dans ce volume. Les très larges perspectives de ce nouvel outil d'investigation rendent nécessaire la recherche de techniques d'analyses qui, sans sacrifier aux exigences de précision analytique, permettent la réalisation quotidienne de très nombreuses analyses.

Nous rappellerons rapidement les principes de la technique manuelle traditionnelle (combustion des échantillons organiques en ampoules de quartz scellées), puis nous présenterons un système automatique de robot préparateur mis au point au laboratoire, qui permet en routine l'analyse automatique du ¹³C dans des sols ou végétaux et qui procède du couplage d'un analyseur élémentaire de type CHN et d'un spectromètre de masse isotopique traditionnel. Nous discuterons des problèmes analytiques qui peuvent être rencontrés et de la précision que l'on peut attendre. L'objectif de ce texte est d'offrir aux utilisateurs potentiels un minimum de connaissance de l'outil analytique qui permet l'acquisition des analyses isotopiques qu'ils peuvent avoir à interpréter, et des conditions et contraintes de son emploi.

GÉNÉRALITÉS

Les abondances isotopiques des éléments légers sont mesurées sur des spectromètres de masse à source gazeuse : tous les échantillons organiques (pour ce qui nous préoccupe : sols, fractions de sols, végétaux) doivent être traités de façon que leur carbone organique soit porté sous forme gazeuse de façon parfaitement quantitative, pour éviter tout fractionnement isotopique : en dépit de quelques inconvénients, la forme habituellement choisie est le CO_2 . Produit par combustion dans une atmosphère oxydante, il est ensuite purifié avant d'être analysé dans le spectromètre de masse.

Un spectromètre de masse est un instrument précis qui peut mesurer des rapports isotopiques absolus avec une bonne reproductibilité sur un court intervalle de temps. Par contre, la justesse de sa mesure est toujours insuffisante, en raison de fluctuations des valeurs du rapport isotopique, en partie dues à l'électronique de mesure. Pour lutter contre ce défaut inhérent à l'instrument, on procède à une mesure relative de l'échantillon par rapport à une référence, en comparant de façon quasi instantanée le rapport isotopique (R) de l'un par rapport à l'autre : dans ces conditions, les fluctuations instrumentales, même de fréquence élevée, affectent le rapport isotopique de l'échantillon de la même façon que celui de la référence. L'emploi de la même référence pour tous les laboratoires est garant de la justesse de la mesure.

On introduit ainsi la notation delta pour mille :

$$\delta \% = \frac{R_{\acute{e}chantillon} - R_{\acute{r}\acute{e}f\acute{e}rence}}{R_{\acute{r}\acute{e}f\acute{e}rence}} \cdot 1000$$

On constate donc que l'emploi de cette notation relative est en fait imposé par des considérations instrumentales et par la recherche d'une très grande précision : elle est en effet nécessaire, car les variations d'abondances isotopiques naturelles ne dépassent guère, pour les problèmes qui nous préoccupent en science du sol, 20 ‰ en δ , soit en rapport isotopique (R = $^{13}C/^{12}C$) une variation de 0,00022 et on peut être amené à interpréter des variations de compositions isotopiques de \pm 0,2 ‰ en δ , ce qui correspond, en terme de rapport isotopique à : \pm 0,000 002.

Cette notation δ définit une relation explicite entre l'abondance d'un isotope donné d'un élément dans un échantillon et son abondance dans la référence : si $\delta > 0$, il y a plus d'isotope lourd dans l'échantillon que dans la référence ; si $\delta < 0$, il y a moins d'isotope lourd dans l'échantillon que dans la référence et si, pour un élément donné, on choisit bien la référence, cette différence va avoir immédiatement une importante signification géochimique. Pour le carbone-13, la référence internationale adoptée pour l'expression des $\delta^{13}C$ est le PDB : c'est un carbonate marin, restes fossiles d'une bélemnite de la Pee Dee Formation (Crétacé de Caroline du Sud, E.U.) : son choix se justifie par le fait que les carbonates marins représentent le plus gros réservoir de carbone de la surface. Le PDB est depuis longtemps épuisé et l'IAEA (International Atomic Energy Agency) et le NBS (National Bureau of Standards), pourvoyeurs des références géochimiques internationales, fournissent actuellement d'autres échantillons de carbonate référence, parfaitement calibrés par rapport à ce PDB.

DESCRIPTION DES PROCESSUS ANALY-TIQUES

La méthode originelle d'analyse du ¹³C dans les composés organiques a été décrite par Harmon CRAIG en 1953 : la combustion de l'échantillon s'effectue dans un four à 900 °C contenant de l'oxyde de cuivre, sous atmosphère d'oxygène pur ; ce four est un élément constitutif d'une ligne de verre en boucle permettant, grâce à une pompe Toepler, le recyclage des gaz de combustion sur le four. Cette technique, traditionnelle, a connu des modifications et améliorations (par ex. MIZUTANI et WADA, 1985) mais n'a pas perdu de sa validité et ses performances sont toujours à un niveau comparable à celui des méthodes ultérieures. Cette méthode a toutefois progressivement été supplantée dans les années 1980 par une méthode de combustion en tubes scellés, inspirée de FRAZER (1962), FRAZER et CRAWFORD (1963), améliorée et testée par de nombreux expérimentateurs : SOFER (1980), BOUTTON et al. (1983), SCHOELL et al. (1983), MINAGAWA et al. (1984), WEDEKING et al. (1983). Cette méthode présente de nombreux avantages : rapidité, simplicité, mais également la possibilité de procéder à l'analyse simultanée du rapport isotopique de ¹⁵N et ²H dans le composé organique.

Enfin, dans les dernières années, on note l'émergence de systèmes couplés en ligne (analyseur élémentaire – interface de piégeage cryogénique – spectromètre de masse isotopique), appliqués à la mesure des abondances isotopiques naturelles (FRY *et al.*, 1992), et nous décrirons notre dispositif expérimental et ses performances.

Combustion en ampoules de quartz scellées

La préparation du gaz en vue de son analyse au spectromètre de masse comporte deux étapes : la préparation des ampoules de quartz contenant l'échantillon et leur combustion, puis la séparation des différents gaz produits dans l'ampoule et la récupération du CO_2 après purification.

PRÉPARATION ET COMBUSTION DES AMPOULES

L'échantillon est un sol ou un fragment de végétal. Il convient, compte tenu des faibles prises d'essai, de rendre l'échantillon le plus homogène possible. Dans le cas d'un sol, on procède au broyage et au tamisage de l'échantillon jusqu'à l'obtention d'une granulométrie inférieure à 200 μ m.

Si les matières organiques du sol dont on veut mesurer le δ^{13} C du carbone organique sont associées à des carbonates, il faut recourir à un prétraitement, car le carbonate se décompose lors de la combustion et libère du CO₂, ce qui provoque une interférence avec la mesure faite sur le carbone organique. La technique retenue au laboratoire consiste en une décarbonatation progressive et ménagée de l'échantillon par HCI, sous ultrasons, avec contrôle de l'acidité par pH mètre. Nous utilisons des solutions à pH \geq 3, afin de minimiser la solubilisation et des pertes éventuelles de fractions organiques très fragiles. Dans le cas d'échantillons peu carbonatés (ou seulement suspectés de pouvoir l'être), on peut aussi analyser le carbone organique acido-soluble avec l'échantillon, en ne jetant pas le surnageant après attaque acide : l'échantillon de sol est attaqué directement dans l'ampoule de quartz par HCI M, qui est ensuite évaporé. Les chlorures résiduels sont en faible quantité et n'interfèrent pas sur la qualité des gaz obtenus. Il faut prendre garde à la présence de dolomie (parfois apportée en amendements aux sols) : dans ce cas l'attaque HCI à froid ne suffit pas à éliminer ce carbonate.

La prise d'essai est calculée en tenant compte des contraintes imposées par la pression des gaz qui apparaîtront dans l'ampoule après combustion (CO₂, N₂ et H₂O originaires des composés organiques, mais aussi l'eau fortement liée à des minéraux gonflants des sols, comme les smectites). Afin de travailler de manière optimale en routine, il convient de traiter entre 0,5 et 3 mg de carbone, ce qui permet de s'affranchir le plus souvent des corrections de blanc. L'échantillon est introduit dans un tube de quartz de 25 cm de long, 9 mm de diamètre extérieur, 7 mm de diamètre intérieur, clos à une de ses extrémités et préalablement passé au four à 850 °C pour le décontaminer de toute trace organique sur ses parois internes.

On ajoute, dans ce tube, de l'oxyde de cuivre CuO (0,5 à 1 g) qui fournira l'oxygène nécessaire à la combustion, ainsi que de la laine d'argent, susceptible de piéger des halogènes éventuellement produits. L'oxyde de cuivre est préalablement purifié dans un four à 850 °C sous atmosphère oxydante, pendant plus d'une heure.

Les tubes de quartz sont fixés, à l'aide de raccords hermétiques Cajon, sur une ligne de verre dans laquelle on entretient un vide d'environ 10-3 mbar par des pompes primaires (pompes à palettes) et un piège cryogénique plongeant dans l'azote liquide. Les échantillons sont ainsi dégazés pendant une période de 5 à 15 heures. La fin de cette période est déterminée par la stabilisation du vide à la pression limite permise par les pompes utilisées et par le fait qu'on ne peut détecter, sur une jauge Pirani adaptée à la ligne de verre, aucune augmentation de pression dans le tube pendant une durée de 10 minutes en étant isolé du pompage. On scelle alors les tubes, maintenus sous vide dynamique, au chalumeau oxy-gaz, en prenant soin d'éviter la présence de traces de composés organiques et (ou) de CuO dans la zone de soudure. Les ampoules ainsi obtenues sont placées dans un four où la combustion de la matière organique est réalisée selon un programme pré-établi de rampes et de paliers de températures, comptant notamment : un palier de 3 heures à 850 °C, une descente suivie d'un palier de 3 heures à 600 °C, puis un lent retour à la température ambiante, soit un cycle total d'environ 18 heures.

Le palier à 600 °C, puis le retour à la température ambiante permettent la réduction des oxydes d'azote éventuellement formés par la combustion à haute température sur le cuivre réduit issu de CuO lors de cette combustion. Il permet également de convertir le SO₂, formé à partir d'éventuels composés organiques soufrés, en sulfate non volatil CuSO₄ (Frazer et Crawford, 1963 ; Krishna-MURTHY et DE NIRO, 1982). La réduction des oxydes d'azote apparus lors de la combustion aboutit à l'azote moléculaire, N₂ : cela rend possible la récupération de ce gaz (par adsorption sur un tamis moléculaire, à la température de l'azote liquide) et l'analyse conjointe du $\delta^{15}N$ du composé organique, ce qui est pratiqué en routine. En tout état de cause, même si l'on ne souhaite effectuer que l'analyse isotopique du ${}^{13}C$ sur le CO₂, il est impératif que les oxydes d'azote soient parfaitement réduits car l'un deux, N₂O, possède la même masse moléculaire que le CO_2 (44) et il interfère très fortement lors de l'analyse isotopique du gaz carbonique.

EXTRACTION ET PURIFICATION DU CO2

Elles sont effectuées sur une ligne de verre (fig. 1) dans laquelle un vide d'environ 10⁻³ mbar est entretenu par une pompe à palettes et un piège cryogénique. Pour de très petits échantillons, ce vide doit être amélioré par un pompage secondaire.

L'ampoule de quartz (A) est placée dans un système dit « cracker » (C) décrit par DES MARAIS et HAYES (1976) et fixée à l'une des extrémités de la ligne par un système de raccords Cajon hermétique. Le « cracker » permet de casser l'ampoule sous vide et ainsi d'admettre les gaz qu'elle contient dans la ligne.

Un piège à -90 °C (mélange carboglace-acétone) permet de piéger et d'éliminer la vapeur d'eau. Puis, par le jeu de l'ouverture des vannes à vide, on admet les gaz sur un four à 750 °C, contenant du cuivre pur réduit sous hydrogène, afin d'achever, si besoin en est, la réduction des oxydes d'azote en azote moléculaire. On piège ensuite, à l'aide d'azote liquide, le CO₂ isolé et purifié dans le porte-échantillon de gaz (PE) prévu à cet effet, dégazé par un long pompage préalable. Quand ce piégeage, contrôlé par la jauge Pirani P2, est terminé, les autres gaz, incondensables (principalement N_2) sont pompés. Le CO_2 ainsi recueilli peut alors être porté au spectromètre de masse en vue de son analyse isotopique.



FIG. 1. – Schéma de la ligne de verre permettant la séparation cryogénique et la purification des gaz issus de la combustion dans l'ampoule de quartz. Schematic view of the glass tube designed for separation and purification of gases evolved by combustion in the quartz vial.

ANALYSE AU SPECTROMETRE DE MASSE

Le CO_2 est introduit dans un spectromètre de masse isotopique à source gazeuse (MCKINNEY et al., 1950) à double introduction et triple collection ionique. Le système de double introduction permet la comparaison quasi instantanée à un gaz de référence, issu par attaque acide (EPSTEIN et al., 1964; FRIEDMAN et O'NEIL, 1977) d'un carbonate référence interne de notre laboratoire, calibré versus une référence internationale, le NBS 19. La triple collection permet la mesure simultanée des faisceaux ioniques correspondant aux masses m/e = 44 ($[^{12}C^{16}O^{16}O]$), 45 ($[^{13}C^{16}O^{16}O]$, mais aussi $[^{12}C^{17}O^{16}O]$) et 46 ($[^{12}C^{16}O^{18}O]$ pour l'essentiel). Les échantillons d'origine terrestre présentent un rapport ¹⁸O/¹⁷O constant ce qui permet, par la mesure de la masse 46, de corriger la masse 45 de l'influence de $[^{12}C^{17}O^{16}O]$ et ainsi de surmonter l'inconvénient que présente le gaz CO₂ pour l'analyse isotopique du ¹³C. Pour chaque échantillon, un balayage de masse est effectué sur la valeur

Cah. Orstom, sér. Pédol., vol. XXVI, nº 4, 1991 : 371-380

m/e = 40 qui correspond à l'argon, traceur d'une éventuelle contamination par de l'air (et donc d'une fuite) au cours de l'une des étapes de la préparation.

La référence internationale pour le $\delta^{13}C$ est. comme on l'a vu, le PDB, qui est épuisé. Un autre carbonate, le NBS 19, est distribué par l'IAEA et le NBS et sa composition isotopique versus PDB est fixée (GONFIANTINI, 1984; COPLEN et al., 1984). D'autres standards, organiques, sont également distribués. Nous utilisons ces standards internationaux pour calibrer à l'intérieur du laboratoire un standard interne, un échantillon de marbre parfaitement homogénéisé, dont nous avons ainsi pu déterminer avec précision les valeurs de δ^{13} C et δ^{18} O versus le NBS 19 et donc versus PDB. De manière à avoir un contrôle indépendant de la qualité de notre référence de laboratoire, nous introduisons dans chaque série d'échantillon des « mouchards », composés organiques dont nous avons soigneusement mesuré la composition isotopique, que nous avons fait mesurer par des laboratoires exercés et dont la valeur de δ^{13} C nous sert à la fois de test de qualité de notre préparation du jour et de nondérive de notre référence de laboratoire.

CONCLUSION SUR LA MÉTHODE

Elle est relativement aisée et rapide à mettre en œuvre mais présente un inconvénient : le coût élevé du tube de quartz avec lequel les ampoules sont fabriquées. Ce matériau est en effet nécessaire pour atteindre la température de combustion de 850 °C. BOUTTON et al. (1983) comparent les résultats obtenus selon des protocoles identiques, d'une part avec des ampoules de quartz et une température de combustion de 850 °C, d'autre part avec des ampoules de Pyrex et une température de combustion de 550 °C. Dans ce dernier cas, la combustion n'est pas complète ce qui, malgré tout, n'apporte pas de différence de composition isotopique par rapport à l'emploi des ampoules de quartz et des températures de combustion élevées : seul l'écart-type sur plusieurs mesures du δ^{13} C augmente, sans que les valeurs moyennes soient significativement différentes. Il reste que les résultats ont été obtenus sur un petit éventail de composés organiques et il n'est pas du tout évident qu'ils soient aussi satisfaisants avec, par exemple, des matières organiques du sol, dont certains composés sont très réfractaires : en fonction de l'existence de composés organiques très hétérogènes dans le sol (ex. : coexistence de matières organiques d'origine C_3 ou C_4), cela peut entraîner des variations inacceptables du δ^{13} C

mesuré et il n'apparaît pas opportun de modifier ce protocole expérimental pour ce type d'échantillon.

La précision obtenue par cette méthode est comparable à celle décrite par CRAIG (1953). Nous obtenons sur un graphite pur soigneusement homogénéisé une reproductibilité (écart-type sur 10 mesures, par un même opérateur dans une même journée) de $\pm 0,02$ %c. L'écart-type obtenu sur un échantillon de sol (granulométrie < 100 µm) mesuré pendant plusieurs mois est typiquement de 0,14 ‰.

Un robot préparateur pour l'analyse du ¹³C dans les composés organiques

PRINCIPE

Il résulte du couplage d'un analyseur élémentaire commercial, de type CHN (NA 1500, Fisons) à un spectromètre de masse isotopique (Sira 10, Fisons), via une interface (fig. 2). Il reproduit les principales étapes du processus manuel évoqué cidessus. L'analyseur élémentaire réalise automatiquement la combustion des échantillons et les produits gazeux de cette combustion (CO₂, N₂, H₂O), séparés par chromatographie en phase gazeuse, sont ensuite traités dans l'interface avec le spectromètre de masse, composée de vannes à vide en inox et de pièges froids à différentes températures, où ces gaz seront piégés, séparés et purifiés cryogéniquement.

TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS

Les échantillons sont introduits dans le CHN enfermés dans des nacelles en étain (h = 5 mm, $\emptyset = 4$ mm), préalablement nettoyées par 2 lavages au tétrachlorure de carbone et 2 lavages à l'acétone, afin de réduire les traces de carbone qu'elles peuvent porter et ainsi diminuer les valeurs des « blancs ». Ces nacelles sont disposées dans un passeur automatique de type carrousel, depuis lequel elles tomberont les unes après les autres dans un four de combustion maintenu à 1 020 °C et empli d'oxyde de cobalt et d'oxyde de chrome $(Cr_2O_3 + CO_3O_4)$. Cette introduction s'effectue sous un courant gazeux (80 ml.mn⁻¹) d'hélium de grande pureté (99,999 % garanti) et au moment précis de l'introduction dans le four, une dose (10 ml) d'oxygène pur (99,999 %, $CO + CO_2 < 1$ ppm) est injectée dans le gaz vecteur. L'oxydation exothermique de la nacelle d'étain permet à la température de s'élever localement à près de 1 800 °C (combustion « flash »). La taille de la prise d'essai est limitée par la taille des nacelles et par la nécessité de ne pas colmater trop rapidement le haut





du four à combustion avec les cendres des échantillons (importantes avec les sols notamment). Une prise d'essai de 50 mg représente, suivant la densité de l'échantillon, une valeur proche du maximum. Les performances de l'analyse « en ligne » autorisent le passage d'échantillons contenant peu de carbone : il est possible d'analyser 200 μ g de C en routine, c'est-à-dire dans des conditions où on peut négliger les corrections de blanc (carbone apporté par la nacelle, fuites, etc.). Dans ces conditions, avec de si petites prises d'essai, la qualité et la représentativité de l'échantillonnage sont fondamentales, nous y reviendrons.

À la sortie du four à combustion [1], les gaz poussés par le flux d'hélium pénètrent dans un deuxième four [2], à 650 °C, contenant du cuivre réduit où sont réduits les oxydes d'azote et est retenu l'oxygène en excès. Au-delà, un piège contenant du perchlorate de Mg anhydre [3] retient l'essentiel de l'eau formée lors de la combustion. Une colonne chromatographique [4] réalise ensuite la séparation de CO₂ et N₂ qui sont successivement admis sur un catharomètre [5] couplé à un intégrateur numérique, ce qui permet, après calibration, le calcul des teneurs en C_{organique} et N_{organique} des échantillons. Cette colonne chromatographique et le détecteur permettent éventuellement la mise en évidence d'autres gaz (SO₂ par ex.), ce qui peut être précieux pour des échantillons de nature non parfaitement connue.

Au-delà, les gaz pénètrent dans l'interface de piégeage et passent successivement dans deux pièges cryogéniques. Le premier, vers - 90 °C (sonde cryogénique plongeant dans de l'éthanol), permet d'éliminer d'éventuelles traces résiduelles d'eau. Le second plonge dans l'azote liquide (- 196 °C) et piège le CO₂ sans retenir ni N₂ ni le gaz vecteur hélium, non condensables à cette température et cette pression. Le flux d'hélium est alors détourné, on pompe ensuite brièvement sur le piège à - 196 °C afin d'éliminer toute trace de gaz incondensables et on réchauffe ce piège jusqu'à une température égale à celle du système d'introduction du spectromètre de masse, afin d'éviter des effets isotopiques de thermodiffusion. Le CO₂ est alors introduit directement dans le spectromètre de masse pour les échantillons à forte quantité de carbone. Pour les faibles quantités, le CO₂, avant d'être admis dans la source d'ions, peut être concentré sur un « doigt froid » dans le système d'introduction du spectromètre de masse, petit volume dont la température peut varier de -196 °C à la température ambiante.

L'analyse spectrométrique elle-même s'effectue dans des conditions rigoureusement identiques à celles décrites précédemment, par comparaison avec le gaz référence. La totalité du processus analytique est contrôlée par un micro-ordinateur qui permet l'ajustement optimal, laissé au soin de l'expérimentation, de tous les paramètres.

POSSIBILITÉS, PERFORMANCES ET CONTRAINTES

La durée complète d'une analyse est de 20 minutes environ, ce qui nous permet avec ce couplage CHN-MS de traiter quotidiennement trois fois plus d'échantillons que ce que nous permettait la technique classique des ampoules de quartz : 30 à 50 échantillons par jour au lieu de 10 à 15. De plus, ce travail peut s'effectuer sans contrainte de nuit, ce qui permet éventuellement de libérer le spectromètre de masse pour d'autres analyses dans la journée. Pour des échantillons classiques en science du sol, il est possible de faire 500 mesures environ sans intervention sur le four de combustion.

Un avantage tout à fait important réside dans l'obtention simultanée du δ^{13} C, des teneurs en C_{organique} et N_{organique} (et donc du C/N). FRY et ses collaborateurs (1992) proposent un système plus complexe qui permet la mesure du δ^{15} N.

La précision des mesures de δ^{13} C obtenue en routine est tout à fait exceptionnelle, comme en témoigne le relevé des valeurs d'un « mouchard » introduit quotidiennement dans les séries d'analyses. Sur le tableau I, on a reporté, directement depuis le cahier d'analyses, les valeurs sur un graphite soigneusement homogénéisé, pendant la durée de vie d'un four de combustion (environ 3 semaines en usage intensif).

On constate sur ce tableau que la précision obtenue sur les compositions isotopiques de ce graphite n'est en fait pas fondamentalement différente de la précision interne du seul spectromètre de masse, obtenue lors de l'analyse répétée d'un même échantillon de gaz carbonique très propre et qui est de l'orde de 0,015 ‰. Cette répétabilité exceptionnelle montre non seulement le niveau de précision élevé, mais aussi les faibles effets mémoire du dispositif, puisque les échantillons sont passés, dans les séries d'analyse, derrière des échantillons dont les compositions isotopiques sont très variables.

Les avantages de l'analyse « en ligne » du CO_2 produit et purifié, qui entre directement dans le spectromètre de masse, ressortent à l'évidence de la qualité de ces résultats. Elle est confirmée par les valeurs que nous avons obtenues, sur de longues périodes, ou ponctuellement dans une journée d'analyse, sur des échantillons organiques de natures très différentes : composés purs (utilisés pour la calibration du CHN), albumine d'œuf, sol, tous très finement broyés et soigneusement homogénéisés. Ces résultats figurent sur le tableau II.

On observe, sur une période de 12 mois, que la précision de la mesure du δ^{13} C du graphite (1 $\sigma = 0.035$ ‰) n'est pour ainsi dire pas altérée par rapport à la série de mesures faites plus ponctuellement (tabl. I).

Tableau I
$\delta^{13}C$ d'un échantillon « mouchard » de graphite introduit
dans des séries d'analyses, sur une période de 3 semaines
$\delta^{13}C$ of the graphite reference sample which was used
through analyses over a 3 week period

date	δ ¹³ C ‰	
4/10/91	-23,31	
4/10/91	-23,30	
4/10/91	-23,28	
4/10/91	-23,32	
9/10/91	-23,30	
10/10/91	-23,33	
10/10/91	-23,29	
15/10/91	-23,26	
15/10/91	-23,25	
16/10/91	-23,28	
22/10/91	-23,30	
22/10/91	-23,28	
moyenne	-23,29	
écart-type	0,023	

On constate également que l'ajout d'azote dans ce graphite (sous forme de sulfate d'ammonium), en quantité variable (permettant d'obtenir des C/N dans une gamme de 54 à 3), ne modifie pas la valeur du δ^{13} C ni n'altère l'écart-type obtenu : on confirme ainsi le fait que les éventuels oxydes d'azote N₂O, de masse m/e = 44 [¹⁴N¹⁴N¹⁶O], sont totalement réduits et transformés en N₂ et n'interfèrent pas sur l'analyse du CO₂ de même masse [¹²C¹⁶O¹⁶O].

Les composés chimiques purs donnent des écarts-types compris entre 0,018 et 0,06 ‰. Cette très grande précision est utilisée au laboratoire pour la détermination de la période où les oxydes ou le cuivre réduit doivent être renouvelés dans les fours, le « vieillissement » de leurs propriétés chimiques ne permettant plus la combustion dans les conditions optimales : un écart de composition isotopique aussi petit que 0,2 ‰ sur les valeurs de ces références internes le signale sans ambiguïté.

Même les échantillons naturels (albumine, sol), pourtant naturellement inhomogènes, restent dans la gamme d'écart-type obtenue pour les produits purs (< 0,06 %).

TABLEAU II

δ¹³C (moyenne et écart-type) d'échantillons soigneusement homogénéisés, de natures chimiques différentes, présentant des rapports C/N très variables, analysés sur de longues périodes ou ponctuellement δ¹³C (mean and standard deviation) of homogeneized samples presenting different chemical compositions and variable C/N ratios

Nature de l'échantillon	Rapport C/N	Nombre d'analyses	δ ¹³ C moyen	Ecart-type	Période d'analyse
Graphite	C pur	32	-23,29	0,035	12 mois
Graphite + NH4 ⁺	3 à 54	25	-23,29	0,021	1 jour
Cyclohexanone*	2,6	55	-26,03	0,018	12 mois
Tyrosine	7,7	24	-23,27	0,037	3 mois
Atropine	14,6	12	-29,39	0,045	1 jour
Phénantrène	C pur	9	-24,10	0,061	1 jour
Acétanilide	6,8	9	-30,23	0,049	1 jour
Albumine d'oeuf	3,6	22	-17,21	0,057	1 jour
Sol H 21**	8,3	8	-22,79	0,057	2 jours

* : Cyclohexanone.2,4-dinitrophénylhydrazone

** : il s'agit d'un sol alluvial cultivé non carbonaté, prélevé en 1985, ayant subi 15 ans de culture de maïs (de 1969 à 1983), broyé et tamisé à 100 μm, C_{org} = 1%, N_{org} = 0,12%; la matière organique humifiée d'origine C4 (maïs) est estimée à 26%.

L'échantillon de sol appelé H 21 est intéressant à cet égard : il s'agit d'un sol situé initialement sous végétation C_3 et cultivé à 15 reprises en maïs, plante C_4 : l'échantillon est ainsi naturellement hétérogène puisqu'il contient des matières organiques d'origine C_3 et d'autres plus récentes d'origine C_4 (26 % environ). Broyé et tamisé à 100 µm, on constate que l'on peut obtenir sur sa mesure un écart-type nettement inférieur à 0,1 ‰ avec des prises d'essai de l'ordre de 40 mg.

La prise d'essai pour le CHN est nécessairement toujours très petite, relativement aux critères de représentativité exigés en science du sol. Une étude statistique rapide (J. BALESDENT, comm. pers.) montre l'influence de la taille de la prise d'essai et de la granulométrie des échantillons sur les résultats $\delta^{13}\overline{C}$ et sur leur précision. Tout échantillon solide broyé est une population de particules, souvent composée de sous-populations de compositions isotopiques différentes. Même si ces particules sont mélangées le plus soigneusement possible, la proportion des différents types de particules dans la prise d'essai est probabiliste. Cela produit une dispersion incontournable des résultats qui, pour une masse de carbone donnée dans la prise d'essai, est une fonction croissant proportionnellement avec les différences de compositions isotopiques entre les sous-populations, croissant avec la concentration en carbone organique des

particules et croissant (à la puissance 3/2) avec la taille de ces particules, liée à l'intensité du broyage de l'échantillon.

Le cas le plus défavorable, mais néanmoins fréquemment rencontré, est celui d'échantillons dont les particules sont des débris de végétaux de plantes C₃ et C₄ en mélange, ou des matières organiques humifiées d'origine C₃ ou C₄ (différence de δ^{13} C : 12‰). On peut calculer la variabilité sur la mesure du δ^{13} C d'un tel mélange, due à la seule variabilité aléatoire de la proportion des deux types de particules dans la prise. Pour une prise d'essai de 1 mg de carbone organique, l'intervalle de confiance à 95 % sur la valeur estimée est de l'ordre de 1,5 ‰ pour des particules de 400 µm de diamètre, 0,5 ‰ pour 200 µm, 0,2 ‰ pour 100 µm et 0,06 ‰ pour 50 µm.

On montre sur la base de cet exemple que cette source de variabilité théorique minimale, liée à l'échantillonnage, peut être largement supérieure à la variabilité de l'analyse proprement dite (tabl. II). Elle affecte particulièrement les études exploitant les changements de végétation en vue de la mesure du taux de renouvellement des matières organiques du sol (BALESDENT, ce *Cahier*; MARIOTTI, ce *Cahier*). En conséquence, afin de réduire l'erreur sur les résultats, nous pratiquons un broyage à 100 μ m sur tous les échantillons destinés à ce type d'analyse automatiques et nous recommandons même 50 μ m pour les végétaux ou les sols contenant des débris végétaux. On constate sur l'exemple de l'échantillon de sol H 21 que l'on peut aisément parvenir à un résultat très satisfaisant (même s'il faut bien constater que le temps gagné sur l'analyse isotopique est en partie consommé par la nécessité du broyage fin de l'échantillon : c'est le prix à payer pour l'obtention de prises d'essai parfaitement représentatives).

CONCLUSION

Nous disposons ainsi d'un dispositif analytique qui nous permet d'accéder à un grand nombre d'analyses sans perdre de la précision requise pour les interprétations : cela permettra la prise en compte, dans les protocoles d'échantillonnage, de la variabilité spatiale et l'application de techniques comme la géostatistique. Cette technique analytique impose des contraintes sévères pour la représentativité des prises d'essai. Par l'utilisation de systèmes de concentration des gaz dans le système d'introduction du spectromètre de masse (« doigt froid »), elle permet d'analyser des quantités de carbone notablement inférieures à 200 µg, ce qui peut être intéressant en science du sol, par exemple lors de l'étude de fractions de sol (fractions granulométriques ou fractions chimiques ou biochimiques). Dans ce cas, l'analyse ne s'opère plus en routine, il faut évaluer avec le plus de précision possible les « blancs » d'analyse en mesurant avant et après chaque échantillon la composition isotopique et la quantité (très faible) de CO₂ produit par la combustion dans des conditions identiques d'une nacelle d'étain isolée, et utiliser ces valeurs pour corriger les mesures.

Ce système d'analyse automatique ne doit pas être confondu avec des systèmes dits en flux continus où le CO_2 produit par combustion dans un analyseur élémentaire entre directement, accompagné du gaz vecteur, dans la source d'un spectromètre de masse. Dans ce cas, le rapport isotopique est mesuré sans être comparé instantanément avec celui d'une référence. Ces systèmes, utiles en marquage artificiel, ne peuvent prétendre à la précision atteinte avec le système décrit ci-dessus.

Des perspectives très prometteuses dans le domaine de l'analyse isotopique ¹³C concernent le développement des couplages chromatographie en phase gazeuse – combustion – spectrométrie de masse : dans ce système, le chromatographe sépare des molécules organiques qui, en ligne, sont brûlées dans un four de combustion à CuO à 800 °C et le CO₂ produit est directement injecté dans la source d'ions du spectromètre de masse, en même temps que le gaz vecteur, l'hélium. On peut ainsi traiter des échantillons solides, volatils ou gazeux et une précision de l'ordre de 0,4 ‰ en δ peut être atteinte sur des échantillons de quelques nanomoles de carbone !

Cet outil, qui autorise l'analyse isotopique de molécules identifiées, devrait permettre d'élargir le champ des recherches en science du sol, en nous donnant accès à des compartiments plus fins que ceux étudiés habituellement, en nous permettant de suivre dans le sol des filiations de molécules et en nous permettant de suivre dans le sol des filiations de molécules et en nous donnant accès à la dynamique des matières organiques du sol au niveau moléculaire. Les applications actuelles de cette technique récente concernent principalement le domaine médical et pharmacologique et la géochimie pétrolière (BJORØY et al., 1991; BRAZIER et GUILLUY, 1992; HAYES et al., 1989 ; LICHTFOUSE et al., 1991 ; RIELEY et al., 1991) : les premières applications en science du sol ne sauraient tarder.

Manuscrit accepté par le Comité de rédaction le 11 décembre 1992.

BIBLIOGRAPHIE

- BALESDENT (J.), 1993. Estimation du renouvellement du carbone des sols par mesure isotopique ¹³C. Précision, risque de biais. *Cah. Orstom. sér. Pédol.* vol XXVI, n° 4, 1991 : 315-326.
- BJORØY (M.), HALL (K.), GILLYON (P.), JUMEAU (J.), 1991. – Carbon isotope variations in *n-alcanes* and isoprenoids of whole oils. *Chem. Geol.*, 93 : 13-20.
- BOUTTON (T.W.), WONG (W.W.), HACHEY (D.L.), LEE (L.S.), CABRERA (M.P.), KLEIN (P.D.), 1983. – Comparison of quartz and Pyrex tubes for combustion of organic samples for stable carbon isotope analysis. Anal. Chem., 55 : 1832-1833.
- BRAZIER (J.L.), GUILLUY (R), 1992. Le point sur le couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de

Cah. Orstom, sér. Pédol., vol. XXVI, n° 4, 1991 : 371-380

masse. Applications sur isotopes de carbone. Spectra 2000, 162 : 29-35.

COPLEN (T.B.), FRIEDMAN (I.), O'NEIL (J.R.), 1984. – Comment on the International Atomic Energy Agency report on the Advisory Group Meeting on Stable Isotope Reference Samples for Geochemical and Hydrological Investigations. Vienna, Austria, 19-21 September 1983. USGS Water Resources Investigations Report 84-4136, 8 p.

- CRAIG (H.), 1953. The geochemistry of the stable carbon isotopes. *Geoch. Cosmoch. Acta*, 3 : 53-92.
- DES MARAIS (D.J.), HAYES (J.M.), 1976. A tube-cracker for opening glass-sealed ampoules under vacuum. Anal. Chem., 48: 1651-1652.
- EPSTEIN (S.), GRAF (D.L.), DEGENS (E.T.), 1964. Oxygen isotopes studies on the origin of dolomites. In : H. Craig, S.L. Miller et G.J. Wasseburg Eds, *Isotopic and Cosmic chemistry*. Amsterdam, North-Holland Pub. Co : 169-180.
- FRAZER (J.W.), 1962. Simultaneous determination of carbon, hydrogen, and nitrogen. Part II. An improved method for solid organic compounds. *Mikrochim. Acta*, 1962 : 993-999.
- FRAZER (J.W.), CRAWFORD (R.W), 1963. Modifications in the simultaneous determination of carbon, hydrogen, and nitrogen. *Mikrochim. Acta*, 1963 : 561-566.
- FRIEDMAN (I.), O'NEIL (J.), 1977. Compilation of stable isotope fractionation factors of geochemical interest. U.S. Geol. Surv. Prof. Paper, 440, 1:75.
- FRY (B.), BRAND (W.), MERSCH (F.J.), THOLKE (K.), GARITT (R.), 1992. Automated analysis system of coupled $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ measurements. *Anal. Chem.*, 64 : 288-291.
- GONFIANTINI (R.), 1984. Advisory Group Meeting on Stable Isotope Reference Samples for Geochemical and Hydrological Investigations. Vienna, Austria, 19-21 September 1983. Report to the Director General, International Atomic Energy Agency, Vienna, 77 p.
- HAYES (J.M.), FREEMAN (K.H.), POPP (B.N.), HOHAM (C.H.), 1989. – Compound-specific isotopic analyses : A novel tool for reconstruction of ancient biogeochemical processes. *Org. Geochem.*, 16 : 1115-1128.

- KRISHNAMURTHY (R.V.), DE NIRO (M.J.), 1982. Sulfur interference in the determination of hydrogen concentration and stable isotopic composition in organic matter. *Anal. Chem.*, 54 :153-154.
- LICHTFOUSE (E.), FREEMAN (K.H.), COLLISTER (J.W.), MERRITT (A.), 1991. – Enhanced resolution of organic compounds from sediments by isotopic gas chromatography-combustion-mass spectrometry. J. Chromat., 585:177-180.
- MARIOTTI (A.), 1993. Le carbone 13 en abondance naturelle, traceur de la dynamique de la matière organique des sols et de l'évolution des paléoenvironnements continentaux. *Cah. Orstom, sér. Pédol*, vol. XXVI, n° 4, 1991 : 299-313.
- MCKINNEY (C.R.), MCCREA (J.M.), EPSTEIN (S.), ALLEN (M.A.), UREY (M.C.), 1950. Improvements in mass spectrometers for the measurements of small differences in isotopes abundance ratios. *Rev. Sci. Instrum.*, 21: 724-730.
- MINAGAWA (M.), WINTER (D.A.), KAPLAN (I.R.), 1984. Comparison of Kjeldahl and combustion methods for measurements of nitrogen isotope ratios in organic matter. Anal. Chem., 56: 1859-1861.
- MIZUTANI (H.), WADA (E.), 1985. Combustion of organic samples by infrared furnace for carbon isotope analysis. *Anal. Biochem.*, 146: 90-95.
- RIELEY (G.), COLLIER (R.J.), JONES (D.M.), EGLINGTON (G.), EAKIN (P.A.), FALLICK (A.E.), 1991. – Sources of sedimentary lipids deduced from stable carbon isotope analysis of individual compounds. *Nature*, 352: 425-427.
- SCHOELL (M.), FABER (E.), COLEMAN (M.L.), 1983. Carbon and hydrogen isotopic compositions of the NBS 22 and NBS 21 stable isotope reference materials : an inter-laboratory comparison. Org. Geochem., 5 : 3-6.
- SOFER (Z.), 1980. Preparation of carbon dioxide for stable carbon isotopes analysis of petroleum fractions. *Anal. Chem.*, 52: 1389-1391.
- WEDEKING (K.W.), HAYES (J.M.), MATZIGKEIT (U.), 1983. Procedures of organic geochemical analysis. In : Schopf J.W. Ed., Earth's Earliest Biosphere. Its Origin and Evolution. New Jersey, Princeton University Press : 428-447.