

Recherche et identification de traces d'explosifs sur des prélèvements après attentat. Application de l'électrophorèse capillaire à cette problématique

Cédric Sarazin

▶ **To cite this version:**

Cédric Sarazin. Recherche et identification de traces d'explosifs sur des prélèvements après attentat. Application de l'électrophorèse capillaire à cette problématique. Chimie inorganique. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2011. Français. NNT : . pastel-00657517

HAL Id: pastel-00657517

https://pastel.hal.science/pastel-00657517

Submitted on 6 Jan 2012

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

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

THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité : Chimie analytique

École doctorale de Chimie Physique et Chimie Analytique de Paris Centre
(ED 388)

Présentée par

Cédric SARAZIN

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'université PIERRE ET MARIE CURIE

Recherche et identification de traces d'explosifs sur des prélèvements après attentat. Application de l'électrophorèse capillaire à cette problématique

Soutenue le 27 Septembre 2011

devant le jury composé de :

M. Jean Aupiais	Rapporteur
M. Hervé Cottet	Rapporteur
M. Dominique Deharo	Examinateur
M. Jean-Maurice Mallet	Examinateur
Mme Nathalie Delaunay	Encadrante
M. Pierre Gareil	Directeur de Thèse
Mme Véronique Eudes	Membre invitée

Thèse préparée à Chimie ParisTech

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE **6**

PARTIE I - ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE **8**

CHAPITRE I : Explosifs et explosions 10
1. Introduction 10
1.1 L'explosion résultant d'une réaction chimique 10
1.2 Les substances et produits chimiques explosifs 10
2. Formulation des substances explosives 10
2.1 Les explosifs primaires 13
2.2 Les explosifs secondaires 13
2.3 Les poudres propulsives 14
2.4 Les compositions pyrotechniques 14
2.5 Les compositions artisanales 15
2.5.1 Les explosifs à base de peroxydes 15
2.5.2 Les compositions à base de sels oxydants 15
3. Références 17

CHAPITRE II : De l'explosion à l'analyse 18
1. Les prélèvements 18
1.1. Collecte des petits débris solides 18
1.2. Collecte sur cotons 18
1.2.1. Préparation des cotons 18
1.2.2. Prélèvement avec les cotons 19
2. Traitement des prélèvements 19
2.1. Les vapeurs d'explosifs 19
2.1.1. Tube d'adsorption 20
2.1.2. Microextraction sur phase solide 20
2.1.3. Cas particulier du TATP 21
2.2. Extraction de résidus d'explosifs inorganiques à partir de matrices solides 22
2.3. Extraction de résidus d'explosifs organiques à partir de matrices solides 23
2.3.1. Extraction des cotons de prélèvement 23
2.3.2. Extraction de résidus d'explosifs organiques à partir de matrices solides 23
2.3.2.1 Extraction par solvant 23
2.3.2.2 Extraction par fluide supercritique 24
2.4. Purification et préconcentration des extraits 25
2.4.1. Extraction liquide-liquide 25
2.4.2. Extraction micellaire 25
2.4.3. Extraction sur phase solide 26
2.4.4. Microextraction sur phase solide et sur simple goutte 27
2.5. Conclusion 28
3. Analyses des explosifs et de leurs résidus 28
3.1. Les techniques d'analyses structurales 28
3.2. Les techniques chromatographiques 29
3.2.1. Analyse d'explosifs par chromatographie en phase gazeuse 29
3.2.1.1. Paramètres d'injection et de séparation d'explosifs en GC 29
3.2.1.2. Modes de détection 30
3.2.1.3. Couplage à la spectrométrie de masse 31
3.2.2. Analyse d'explosifs par chromatographie sur couche mince 32
3.2.3. Analyse d'explosifs organiques par chromatographie en phase liquide sur colonne 33
3.2.3.1. Phases stationnaires et mobiles pour l'analyse d'explosifs 33
3.2.3.2. Modes de détection 34
3.2.4. Analyse d'explosifs inorganiques par chromatographie ionique 36

3.3. Analyse d'explosifs à l'aide de techniques électrocinétiques et de microsystèmes électrophorétiques 38
3.3.1. Introduction 38
3.3.2. Article 39
4. Conclusion 62
5. Références 63

PARTIE II – ANALYSE D'ANIONS ET DE CATIONS INORGANIQUES DANS DES RESIDUS PRE- ET POST-EXPLOSION PAR ELECTROPHORESE CAPILLAIRE 68

INTRODUCTION 70

CHAPITRE I : Identification et détermination d'anions et de cations inorganiques dans des résidus pré- et post-explosions 72
1. Article – Identification et détermination d'anions inorganiques dans des extraits issus de résidus pré- et post-explosion par électrophorèse capillaire 72
2. Article – Analyse par électrophorèse capillaire de cations inorganiques dans des résidus post-explosion avec un électrolyte à base de guanidine et un capillaire modifié par une double-couche ionique 94

CHAPITRE II : Article - Analyse simultanée par électrophorèse capillaire d'anions et de cations inorganiques dans des résidus issus d'explosion de mélanges d'acide et d'aluminium 114

CONCLUSION 130

PARTIE III – ANALYSE DE CARBOHYDRATES DANS DES RESIDUS POST-EXPLOSION PAR ELECTROPHORESE CAPILLAIRE 132

INTRODUCTION 134

CHAPITRE I – Article : Nouvelle stratégie pour la détection dans le bas UV des carbohydrates et des acides aminés par électrophorèse capillaire 136

CHAPITRE II – Article : Optimisation d'une séparation par électrophorèse capillaire de neuf carbohydrates à l'aide d'une approche multivariée 157

CHAPITRE III - Analyse quantitative des carbohydrates (fructose, glucose, lactose et saccharose) dans des extraits issus de résidus post-explosions par électrophorèse capillaire 175
1. Introduction 175
2. Éléments de validation de la méthode développée 175
2.1. Sélectivité 175
2.2. Fidélité 175
2.3. Limites de détection 176
2.4. Linéarité 176
2.5. Limites de quantification 178
2.6. Effets de matrices 178
3. Analyse quantitative de carbohydrates par EC dans des résidus post-explosion – Comparaison avec la Chromatographie sur Couche Mince 179
4. Étude par EC de la composition en carbohydrates d'un fumigène 180
5. Conclusion 181

CONCLUSION 182

PARTIE IV – UTILISATION DES METHODES ELECTROPHORETIQUES DEVELOPPEES POUR LA DETERMINATION DE LA CHARGE EXPLOSIVE UTILISEE LORS D'UN ATTENTAT SUICIDE SIMULE DANS UN BUS **183**

1. Introduction 185
2. L'attentat suicide 185
3. Les prélèvements à analyser 187
4. L'analyse des anions inorganiques 187
5. L'analyse des cations inorganiques 187
6. L'analyse des carbohydrates 190
7. Conclusion 191

PARTIE V – DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE D'ANALYSE PAR ELECTROPHORESE CAPILLAIRE DE L'EAU OXYGENEE **193**

1. Introduction 195
2. Procédures électrophorétiques 196
3. Résultats et discussions 196
   - *3.1. Mise en évidence de la complexation de H_2O_2 avec les ions borate* 196
   - *3.2. Influence du pH de l'électrolyte à concentration en borate et force ionique constantes* 198
   - *3.3. Influence de la concentration en borate à pH et force ioniques constants* 199
   - *3.4. Influence de la force ionique à pH et concentration en borate constants* 200
   - *3.5. Influence de la température* 201
4. Transfert d'appareillage 202
5. Reproductibilité et linéarité 203
6. Conclusion 204
7. Références 205

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES **207**

ANNEXES **211**

Annexe A – L'électrophorèse capillaire de zone **213**

Annexe B – Tableau de comparaison entre les appareillages Agilent Technologies HP^{3D}CE et Beckman Coulter P/ACE MDQ **223**

INTRODUCTION GENERALE

Au cours des dernières années, la fabrication et le trafic illicite de substances explosives ont eu pour conséquences l'usage croissant d'engins explosifs improvisés lors d'attentats perpétrés par des groupes terroristes ou criminels. Les investigations menées après attentat par les services de police technique et scientifique ont pour but d'identifier la nature de la charge explosive employée, mais la tâche se révèle le plus souvent difficile d'un point de vue analytique. En effet, les éléments permettant d'identifier cette charge sont la plupart du temps présents à l'état de traces dans des matrices variées et difficiles à traiter. Il est alors nécessaire de disposer au laboratoire de procédures analytiques performantes. L'une des principales difficultés réside dans la grande variété des composés recherchés : les charges explosives employées sont constituées soit de substances organiques, soit de substances inorganiques, soit d'un mélange des deux. Les substances organiques utilisées sont souvent des molécules d'explosifs classiques, telles le TNT ou la pentrite, mais il arrive que des composés commerciaux, non référencés comme explosifs, soit utilisés dans la charge explosive, comme par exemple les carbohydrates ou l'eau oxygénée.

Un protocole d'analyse classique consiste à frotter les débris volumineux récupérés sur la scène d'attentat ou d'explosion au moyen de cotons imbibés d'eau ou de solvant organique pour extraire les résidus de charge explosive. Les composés inorganiques sont ainsi plus facilement isolés par extraction sur coton en milieu aqueux alors que les composés organiques le sont par extraction sur coton en milieu organique. Les débris de petites tailles ou les sols, sont, quant à eux, extraits directement dans le solvant adéquat. La qualité du résultat dépend ensuite des performances des méthodes d'analyse disponibles au laboratoire. Il s'agit principalement de méthodes chromatographiques associées à des détecteurs sélectifs ou de méthodes électrocinétiques.

L'électrophorèse capillaire est d'ailleurs devenue depuis une vingtaine d'année une méthode de choix pour l'analyse de composés inorganiques voire organiques dans des extraits issus de résidus post-explosion. Elle est utilisée comme technique complémentaire des techniques chromatographies existantes (HPLC, Chromatographie d'échange d'ions…) et permet de confirmer la présence ou l'absence de certains composés. Ce travail de thèse présente donc le développement de nouvelles méthodes électrophorétiques d'analyse d'anions et de cations inorganiques, de carbohydrates et de peroxydes entrant dans la composition d'explosifs artisanaux.

PARTIE I - ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : Explosifs et explosions

1. Introduction

1.1 L'explosion résultant d'une réaction chimique

Une explosion correspond à la libération d'une grande quantité d'énergie en un temps extrêmement court. On distingue différents types d'explosions parmi lesquelles les explosions physiques, nucléaires et chimiques [1,2]. Les explosions chimiques, qui sont les seules qui seront abordées dans la suite de ce travail, sont produites par une réaction chimique quasi-instantanée, générant une forte énergie et un grand dégagement gazeux. Ces gaz, libérés en grande quantité, provoquent une augmentation importante de la pression et de la température, ce qui engendre dans l'atmosphère une onde de choc. Cette onde se déplace dans l'environnement en créant un effet de souffle, plus ou moins destructeur.

1.2 Les substances et produits chimiques explosifs

Une substance est dite explosive lorsqu'elle est susceptible de libérer en un temps limité l'énergie qu'elle contient grâce à une réaction chimique quasi-instantanée [1]. Ces substances sont généralement utiliseés à des fins pratiques (démolition de bâtiments, exploitation minière…) mais peuvent être détournées de leurs utilisations pour être employées lors d'attentats. Les substances explosives les plus répandues sont notamment la nitrocellulose (NC), la nitroglycérine (NG), le tétryl (2,4,6-Trinitrophénylméthylnitramine, Ty), la pentrite (tétranitrate de pentaérythritol, PETN), l'hexogène (cyclotriméthylène trinitramine, RDX), l'octogène (cyclotétraméthylène-tétranitramine, HMX), ou en encore la tolite (2,4,6-trinitrotoluène, TNT). Ces quelques molécules sont à la base de diverses formulations souvent complexes telles que la dynamite par exemple. Des produits chimiques tels que des anions inorganiques oxydants, des cations inorganiques, des carbohydrates ou des peroxydes comme l'eau oxygénée peuvent également être à la base de mélanges explosifs. Aussi, il est nécessaire de mieux connaître ces différentes formulations afin d'identifier un certain nombre de composés pouvant les caractériser.

2. Formulation des substances explosives

Les formulations des substances explosives sont ici présentées à travers le système de classification le plus couramment admis (Figure I-I-1) [2,3]. La classification s'organise en fonction de leurs propriétés explosives mais également de leurs applications. La distinction entre les poudres propulsives, les compositions pyrotechniques, les explosifs primaires et

secondaires est réalisée en fonction du comportement de chacun vis-à-vis de la réaction de décomposition de la substance.

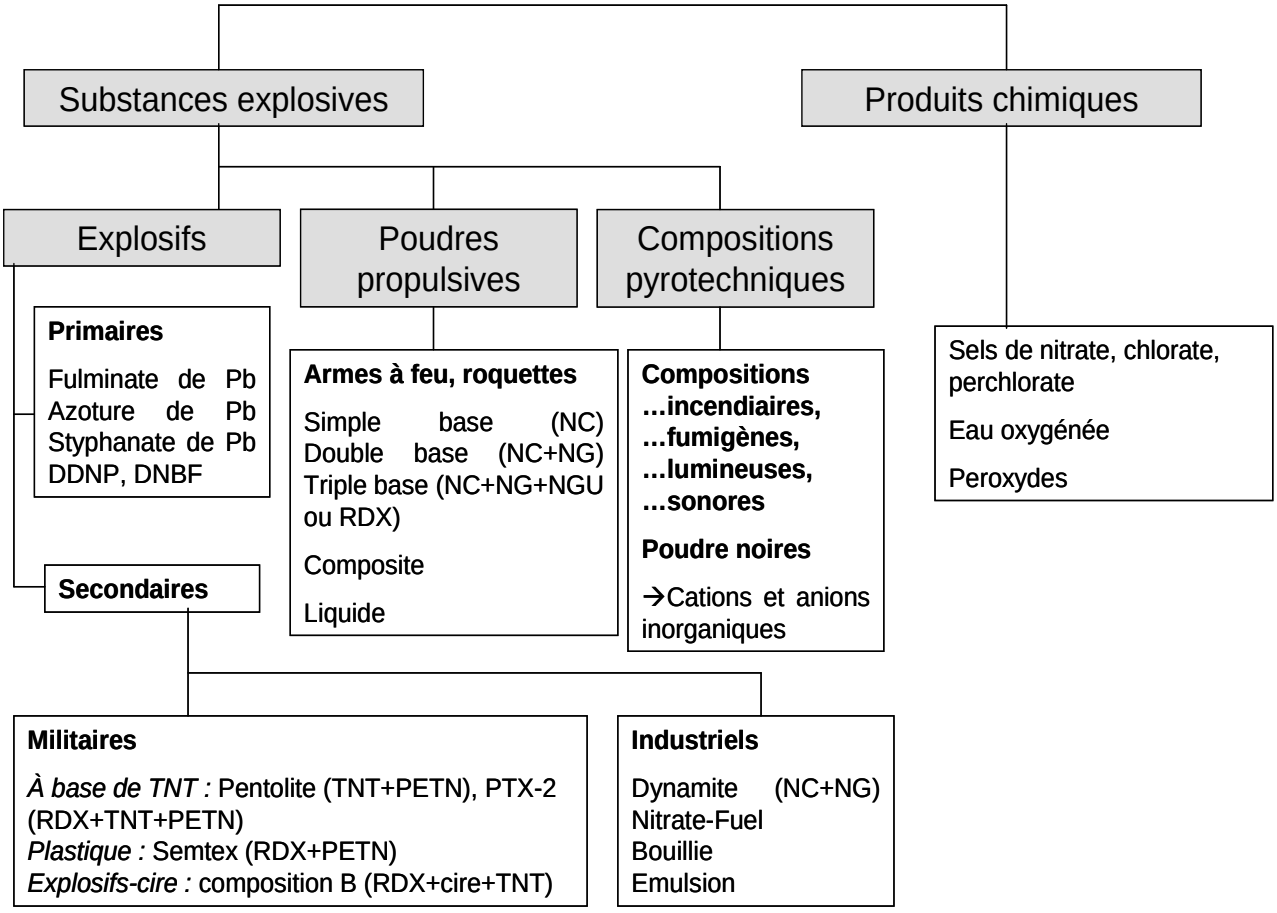


Figure I-I-1. Classification des substances explosives

La décomposition d'une substance explosive peut se faire de trois manières différentes : la combustion, la détonation et la déflagration. La décomposition par combustion est plus ou moins rapide avec la production de produits gazeux, solides ou fondus. Dans ce cas, on observe une zone de réaction se propageant au sein de la matière intacte, principalement par combustion thermique à une vitesse de quelques millimètres à quelques mètres par secondes. On n'observe cette propagation que pour des mélanges d'explosifs.

La déflagration est, elle, un type de combustion rapide à vitesse de propagation variant de quelques mètres par seconde à quelques centaines de mètres par seconde mais toujours inférieure à la vitesse du son dans le matériau énergétique considéré. Le régime d'explosion peut ainsi être représenté comme sur la Figure I-I-2, sous forme de triangle isocèle. La base de ce triangle représente la durée du phénomène (de l'ordre de quelques millisecondes) et le sommet le niveau de surpression maximal atteint (de l'ordre de quelques mbars). La montée en pression dans le milieu environnant est progressive en fonction du temps. La déflagration

d'une substance explosive est initiée lorsque celle-ci est exposée à un stimulus tel qu'un choc, un frottement, une étincelle, un échauffement…. [1,4]. Plus la quantité d'énergie à apporter est faible, plus la substance explosive est dite sensible.

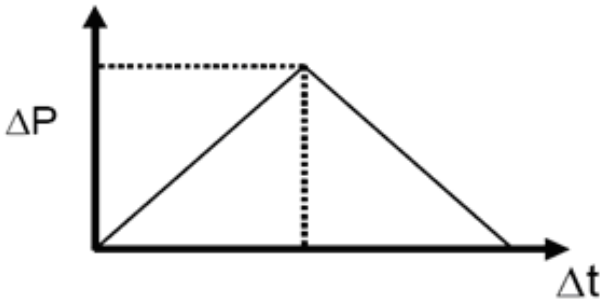


Figure I-I-2. Signal de déflagration

Par opposition au régime de déflagration, la détonation désigne une explosion dont le niveau de surpression maximal (supérieur à celui que l'on peut rencontrer lors d'une déflagration) est atteint de façon instantanée. La réaction se propage à une vitesse supérieure à la vitesse du son (330 m s^{-1}). Ce phénomène peut être caractérisé par un triangle rectangle (Figure I-I-3).

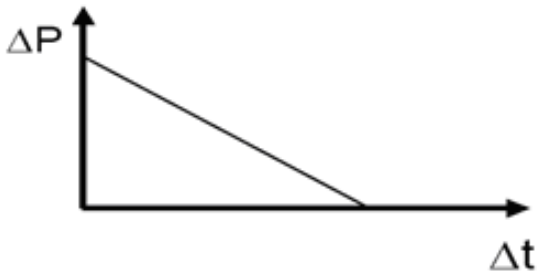


Figure I-I-3. Signal de détonation

La détonation est obtenue soit par un choc initial dont la vitesse est suffisamment importante pour entraîner l'apparition d'une onde de choc, soit par un changement de régime de décomposition [1,4]. La transition d'un régime de déflagration à un régime de détonation peut avoir lieu lorsque la substance explosive se trouve dans un milieu confiné. Les gaz produits au cours de la décomposition sont piégés et provoquent une augmentation de la pression au niveau de la zone de réaction. La vitesse de décomposition qui dépend étroitement de la pression dans le cas de la déflagration devient si grande qu'elle dépasse la vitesse du son et entraîne l'apparition d'une onde de choc. Pour que la propagation de l'onde de choc soit maintenue, les pertes d'énergie doivent être suffisamment faibles.

Selon leur comportement à l'amorçage, les explosifs peuvent être classés en explosifs primaires ou secondaires [1,4]. Les explosifs primaires, sous l'effet d'un petit stimulus,

prennent très rapidement le régime de détonation stable. Les explosifs secondaires ne détonent que s'ils sont correctement amorcés. En effet, un petit stimulus n'entraîne qu'une déflagration alors que l'onde de choc provoquée par la décomposition d'un explosif primaire au contact d'un explosif secondaire entraîne une détonation. Ainsi, les explosifs primaires joue principalement le rôle de mise à feu alors que l'essentiel de la charge explosive est constitué d'explosifs secondaires. Ces systèmes de mise à feu sont également utilisés pour l'allumage des poudres.

2.1 Les explosifs primaires

Les explosifs primaires sont des explosifs d'amorçage, très sensibles à toute action extérieure. Il est possible de distinguer parmi les explosifs primaires les dérivés métalliques et organiques. On retrouve parmi les dérivés métalliques les sels de fulminate (fulminate de mercure), d'azoture (azoture d'argent, azoture de plomb), d'acétylure (acétylure de cuivre) et de styphnate (styphnate de plomb) [2,5,6]. Les dérivés organiques employés en tant qu'explosifs primaires sont pour la plupart des dérivés diazoïques comme le tétrazène, le diazodinitrophénol ou le dinitrobenzofuroxanne. Ils sont utilisés dans la composition de détonateurs tels que les détonateurs pyrotechnique ou électrique [5].

2.2 Les explosifs secondaires

Contrairement aux explosifs primaires, les explosifs secondaires nécessitent une énergie d'activation suffisamment élevée pour détoner. Ils peuvent être constitués à partir de corps purs, comme par exemple des molécules organiques nitrés (esters nitriques, nitramines et nitroaromatiques) ou de mélanges (explosifs plastiques). Ils sont regroupés en deux familles, les explosifs militaires et les explosifs industriels.

Les explosifs militaires sont le plus souvent des composés organiques nitrés. Le TNT, le tétryl, la pentrite, le RDX et le HMX sont les explosifs les plus fréquemment rencontrés. La plupart des explosifs militaires sont en fait des mélanges de ces molécules ; on retrouve notamment la pentrite et le TNT dans les mélanges pentolites ou le RDX, la pentrite et le TNT dans l'explosif PTX-2.

Les explosifs industriels comprennent, eux, des constituants inorganiques. Le nitrate d'ammonium (NA) est le plus répandu. Le NA seul ne détone pas mais l'addition d'une matière combustible en faible quantité suffit à lui donner un caractère explosif [7,8]. Les compositions de type nitrate-fuel sont ainsi constituées à 94 % de NA et 6 % de fuel. Le NA peut être également sensibilisé par l'ajout de composés tels que le dinitrotoluène ou la tolite [8]. L'anion nitrate, puissant oxydant, entre aussi dans la composition de la poudre noire.

2.3 Les poudres propulsives

Ces poudres sont composées de poudres colloïdales et de poudres composites. Les poudres colloïdales, pour armes à feu, sont des compositions à base de nitrocellulose et sont très sensibles au choc et au frottement. Il en existe trois formulations principales :

- la poudre simple base, utilisée dans la plupart des armes à feu, contient de la NC caractérisée par un taux de nitration compris entre 12,5 et 13,2 %.
- la poudre double base, utilisée dans les mortiers, est constituée d'un mélange de NC et de NG.
- la poudre triple base, utilisée dans les canons, est obtenue en ajoutant 50 % environ de nitroguanidine ou d'hexogène au mélange NC + NG.

Les poudres composites, pour engins balistiques, diffèrent des poudres pour armes à feu par la géométrie de leur chargement. Les poudres pour armes à feu brûlent uniformément alors que les poudres pour engins balistiques brûlent progressivement pour assurer une propulsion constante [9]. Ces poudres peuvent être homogènes comme les poudres double base ou hétérogènes comme les propergols composites, produits de propulsion.

2.4 Les compositions pyrotechniques

Contrairement aux poudres et explosifs, les compositions pyrotechniques se décomposent à faible vitesse et libèrent des produits solides. Le fonctionnement de ces compositions est basé sur la mise en œuvre de réactions d'oxydo-réduction qui visent à produire du son, de la lumière et/ou de la fumée. Elles sont présentes dans les feux d'artifice, les pétards et les systèmes de mise à feu et sont donc essentiellement de composition minérale [10,11]. Le Tableau I-I-1 regroupe différentes compositions pyrotechniques qui peuvent générer de la lumière dans le domaine du visible. L'émission de lumière dépend étroitement de la température d'inflammation. Certains métaux émettent au-delà de 3000 °K des rayonnements à des longueurs d'onde caractéristiques. Afin d'obtenir de telles températures, il est nécessaire d'utiliser un sel de chlorate, de perchlorate ou de nitrate en tant qu'oxydant et de l'aluminium, du magnésium, du soufre ou du carbone en tant que réducteur. Enfin, la poudre noire (mélange de charbon, de soufre et de salpêtre), considérée comme une composition pyrotechnique, est utilisée le plus souvent pour transmettre l'allumage dans des mèches lentes.

Tableau I-I-1. Exemples de compositions pyrotechniques générant de la lumière

Composition pyrotechnique	Effet
Magnésium, nitrate de baryum, nitrate de potassium	Lumière blanche
Perchlorate de potassium, nitrate de baryum, liant	Lumière verte
Perchlorate de potassium, oxalate de strontium, liant	Lumière rouge
Perchlorate de potassium, oxalate de sodium, liant	Lumière jaune
Perchlorate de potassium, carbonate de cuivre, chlorure de polyvinyle	Lumière bleue

2.5 Les compositions artisanales

2.5.1 Les explosifs à base de peroxydes

Un peroxyde est un composé chimique de formule générale R-O-O-R'. Les peroxydes sont d'excellents oxydants et sont donc très utilisés pour fabriquer des explosifs. L'hexaméthylènetriperoxydediamine (HMTD) et le triacétonetriperoxyde (TATP) sont deux peroxydes (Figure I-I-4) qui peuvent être considérés comme des explosifs primaires, mais ils sont beaucoup trop sensibles pour un usage militaire ou industriel. Récemment, ces deux explosifs ont été largement utilisés lors d'attentats. Ces composés sont préparés à partir de produits chimiques commerciaux faciles à acquérir (acétone, eau oxygénée et acide sulfurique ou chlorhydrique pour le TATP ; hexaméthylène tétramine, eau oxygénée et acide sulfurique pour le HMTD). Les solides blancs cristallins obtenus explosent violemment sous l'effet de la chaleur ou de la friction.

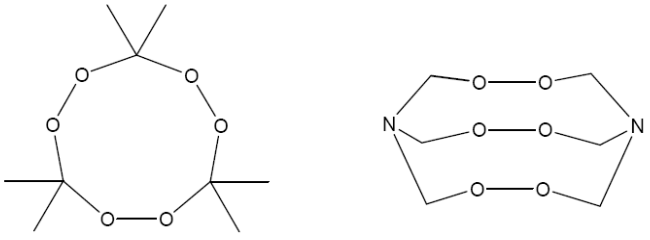


Figure I-I-4. Peroxydes explosifs

2.5.2 Les compositions à base de sels oxydants

De nombreux produits chimiques sont détournés de leur utilisation première et employés à des fins terroristes dans des compositions dites artisanales. Le nitrate d'ammonium, fertilisant

pour jardin, peut ainsi être associé à une matière combustible pour constituer une puissante substance explosive. Plus généralement, une composition artisanale peut être obtenue en mélangeant un oxydant avec un réducteur. C'est pour cela qu'il n'est pas rare de retrouver des sels de nitrate, de perchlorate ou de chlorate, des oxydes métalliques ou de l'eau oxygénée pour les oxydants et l'aluminium, le fioul, le soufre, le charbon de bois ou des sucres pour les réducteurs.

3. Références

[1] Calzia J., *Les substances explosives et leurs nuisances*, Notions sur le caractère explosif, Dunod, Paris, **1969**, p. 3-46.
[2] Akhavan J., *The chemistry of explosives*, Classification of explosive materials, RSC, Paperbacks, Cambridge, **1998**, p. 18-42.
[3] Zukas J.A., *Explosive effects and applications*, Explosive developments and fundamentals of explosives technology, Springer, New-York, **1998**, p 23-45.
[4] Akhavan J., *The chemistry of explosives*, Ignition, initiation and thermal decomposition, RSC, Paperbacks, Cambridge, **1998**, p. 58-68.
[5] Calzia J., *Les substances explosives et leurs nuisances*, Les explosifs primaires, Dunod, Paris, **1969**, p. 64-79.
[6] Quinchon J., *Les poudres, propergols et explosifs, Tome 1* : Les explosifs, les explosifs primaires, Tec & Doc, Paris, **1982**, p. 17-39.
[7] Zukas J.A., *Explosive effects and applications, The Chemistry of Explosives*, Springer, New-York, **1998**, p 137-172.
[8] Quinchon J., *Les poudres, propergols et explosifs, Tome 1* : Les explosifs, les explosifs industriels, Tec & Doc, Paris, **1982**, p. 41-90.
[9] Calzia J., *Les substances explosives et leurs nuisances*, Les poudres, Dunod, Paris, **1969**, p. 158-168.
[10] Akhavan J., *The chemistry of explosives*, Introduction to propellants and pyrotechnics, RSC, Paperbacks, Cambridge, **1998**, p. 143-157.
[11] Calzia J., *Les substances explosives et leurs nuisances*, Les compositions pyrotechniques, Dunod, Paris, **1969**, p. 177-184.

CHAPITRE II : De l'explosion à l'analyse

L'analyse des explosifs peut porter sur la substance explosive même mais aussi sur ses produits de dégradation, sur ses produits secondaires de fabrication ou sur ses produits de réactions. Compte tenu du nombre important de composés susceptibles d'être présents sur une scène d'attentat, l'analyste doit avoir à sa disposition différentes techniques permettant de collecter, extraire, purifier et analyser afin de confirmer la présence de l'explosif ou du mélange explosif à l'origine de l'explosion. Ce chapitre est une mise au point des techniques d'extraction et d'analyse recensées dans la littérature.

1. Les prélèvements

1.1. Collecte des petits débris solides

Une explosion laisse dans une vaste région autour du cratère, une multitude d'éléments qui permettent aux scientifiques d'interpréter le processus de l'explosion en identifiant les éléments de l'engin explosif qui l'a déclenchée. Le but de la collecte des débris est de les étudier au laboratoire, en procédant à des analyses pour, si possible, identifier la composition initiale de la charge et du dispositif de mise à feu. Chaque débris ou ensemble de débris suspects est mis dans un flacon fermé afin d'éviter toute contamination.

1.2. Collecte sur cotons

Lorsque les débris sont intransportables (morceau de mur, de voiture…), des frottis sur coton sont réalisés afin de récupérer les informations nécessaires pour l'identification.

1.2.1. Préparation des cotons

Les débris sont le plus souvent frottés au moyen de cotons hydrophiles commerciaux. Les morceaux de coton subissent généralement un traitement avant d'être utilisés pour la collecte des résidus après explosions. Ils sont traditionnellement extraits au Soxhlet avec de l'acétone [1-3], des mélanges d'éthanol et d'acétate d'éthyle [4], du méthanol [5] ou du méthyltertiobutyléther [2]. Lorsque les cotons sont aussi utilisés pour collecter des composés inorganiques, ils sont préalablement traités par simple trempage dans l'eau [2,6]. La

procédure est relativement longue et peut durer jusqu'à huit heures pour obtenir des cotons vierges. Au Laboratoire Central de la Préfecture de Police, les deux lavages (organiques et inorganiques) sont combinés en une unique procédure d'extraction assistée par solvant à l'aide d'un appareil ASE 200 (Dionex, Voisins-le-Bretonneux, France). Ainsi les cotons sont successivement purifiés avec de l'eau puis de l'acétone pendant 5 min à 100 °C sous 100 bars. L'utilisation de l'ASE 200 permet de purifier 10 g de cotons par cellule en 30 min. Ce lavage permet l'élimination des impuretés organiques susceptibles de provoquer des interférences au cours des analyses. Les cotons sont enfin séchés et introduits dans des emballages plastiques pour les conserver jusqu'à leur utilisation pour collecter les résidus d'explosifs.

1.2.2. Prélèvement avec les cotons

D'une manière générale, les explosifs organiques sont solubles dans des solvants relativement polaires comme le méthanol, l'acétonitrile ou l'acétone. La nature du solvant utilisé pour imbiber les cotons influe sur l'efficacité de l'échantillonage, mais cette dernière dépend aussi de l'état de surface des débris frottés. Twibell et al. ont testé de nombreux solvants pour la collecte de la nitroglycérine sur les mains [1]. Ils ont ainsi montré que le diéthyléther et l'acétone entraînent de grandes quantités de composés interférents alors que l'éthanol, le méthanol et l'eau conduisent aux meilleurs rendements d'extraction. Ainsi, au laboratoire, trois types de frottis sont réalisés : un frottis avec un coton sec qui entraînera les particules notamment métalliques, un autre avec un coton imbibé de méthanol pour récupérer les composés organiques et un dernier imbibé d'eau ultra-pure visant à entraîner les constituants inorganiques. Chaque prélèvement, réel ou témoin, est ensuite placé dans des bocaux de verre distincts.

2. Traitement des prélèvements

2.1. Les vapeurs d'explosifs

L'analyse des vapeurs d'explosifs se limite le plus souvent aux composés organiques les plus volatils. Une technique d'échantillonnage est nécessaire pour la collecte de ces composants volatils, pour l'analyse de la dynamite (EGDN et NG) ou de peroxydes par exemple. Des prélèvements sont réalisés directement sur la scène d'attentat ou bien au laboratoire. Les débris susceptibles d'être recouverts de résidus d'explosif sont placés dans des récipients en verre ou des sachets hermétiquement fermés, ainsi l'espace de tête présent au dessus de l'échantillon s'enrichit en vapeurs d'explosifs et il est alors possible d'en prélever une partie

afin de l'analyser. Une étape de concentration est souvent nécessaire du fait de la grande dilution de ces vapeurs et plusieurs approches existent.

2.1.1. Tube d'adsorption

Dans les systèmes de concentration les plus courants, l'air présent au-dessus des échantillons est aspiré au moyen d'une pompe à travers un adsorbant sur lequel se fixent les vapeurs d'explosifs [7-12]. Les explosifs sont ensuite soit élués avec un solvant organique (dichlorométhane [7,8], pentane [11], isopropanol [12]…) ou bien extraits par désorption thermique directement dans le port d'injection d'un appareillage de chromatographie en phase gazeuse. Sigman et al. ont testé la désorption thermique de nitroaromatiques, de nitramines et d'esters nitrés à partir de différents supports contenant des adsorbants à base de Tenax utilisés pour fixer des vapeurs d'explosifs [13] et des tubes en Téflon utilisés pour collecter des résidus solides d'explosifs [14]. La première approche rend difficile l'analyse des composés les moins volatils comme la pentrite ou le RDX et la seconde subit de fortes interférences dues à la matrice. Enfin, une autre technique consiste à effectuer l'extraction et l'analyse des explosifs en ligne : le solvant utilisé pour désorber les explosifs du support est dirigé vers le système d'analyse [15-17]. Battle et al. ont employé l'extraction par fluide supercritique pour une désorption plus sélective des explosifs : l'utilisation d'un piège en carbone graphite poreux est alors nécessaire pour concentrer les explosifs avant l'analyse chromatographique [16,17]. Cette approche a été appliquée avec succès à la détection des vapeurs de nitroaromatiques issues de mines antipersonnels mais elle nécessite beaucoup de moyens techniques.

2.1.2. Microextraction sur phase solide

La microextraction sur phase solide (SPME) est une alternative intéressante aux tubes d'adsorption pour la concentration de vapeurs d'explosifs. La technique consiste à mettre en contact avec les vapeurs à échantillonner une fibre de silice recouverte à son extrémité d'un adsorbant (Figure I-II-1). L'épaisseur et la nature de l'adsorbant, la température et le temps d'extraction influent sur la capacité de la fibre à fixer les vapeurs. Les adsorbants les plus couramment utilisés pour la fixation des explosifs sont le polydiméthylsiloxane déposé sur du polydivinylbenzène (PDMS/DVB) [18], le PDMS déposé sur du polyacrylate (PDMS/PA) [19,20], le polyéthylèneglycol déposé sur du polydivinylbenzène (CW/DVB) [18,21,22,23] et plus récemment Harvey a démontré la capture d'explosifs sur une fibre SPME de PDMS greffé avec le polymère métallique -dicétonate (complexe formé entre La(III) et p-

di(4,4,5,5,6,6,6-heptafluoro-1,3-hexanedionyl)benzène) [24]. Les polymères déposés sur DVB restent à ce jour les adsorbants les plus efficaces pour fixer les vapeurs d'explosifs [18]. Une élévation de la température de l'échantillon permet en règle générale d'enrichir l'espace de tête mais une température trop importante limite l'adsorption des composés les plus volatils. Une température autour de 80 °C semblerait idéale si l'on souhaite rechercher les esters nitriques, les nitramines et les nitroaromatiques [20].

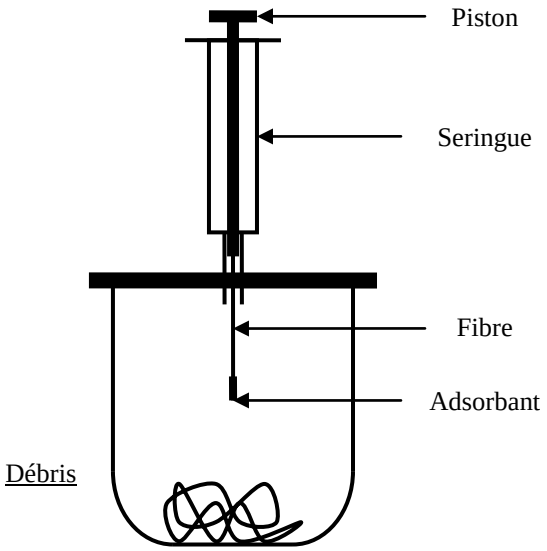


Figure I-II-1. Mode d'extraction avec fibre SPME

L'analyse des explosifs s'effectue traditionnellement par désorption thermique de la fibre SPME directement dans le port d'injection d'un appareillage de chromatographie en phase gazeuse, mais une analyse par chromatographie en phase liquide est aussi possible et se montre souvent plus intéressante pour les composés thermolabiles [23,25]. Enfin, une interface entre une fibre SPME et un spectromètre de mobilité ionique (IMS) a été récemment développée et permet d'atteindre des performances comparables à une interface entre une fibre SPME et un chromatographe en phase gazeuse couplé à la spectrométrie de masse [26-29].

2.1.3. Cas particulier du TATP

Le triacétonetriperoxyde est un explosif instable très volatil. Il est généralement concentré à l'aide d'une fibre SPME ou d'un tube d'adsorption [30-32]. Mais Schulte-Ladbeck et al. ont développé une nouvelle méthode de préconcentration du TATP dans l'air ambiant [33]. Le montage expérimental (Figure I-II-2) nécessite deux bouteilles en verre « nettoyeuse de gaz »

remplies de 20 mL d'acétonitrile chacune et de tubes en verre connectés entre eux par du Teflon. L'air en contact avec l'échantilon solide est ainsi pompé à un débit de 0,6 L min^{-1} pendant 20 min à travers l'acétonitrile et le TATP potentiellement présent dans l'air s'y retrouve ainsi dissous. La seconde bouteille de verre est présente pour pallier une éventuelle perte de l'analyte de la première bouteille. Le contenu des bouteilles est ensuite analysé par HPLC couplée à une détection électrochimique et à la spectrométrie UV. La limite de détection atteinte est de 550 ng L^{-1} d'air.

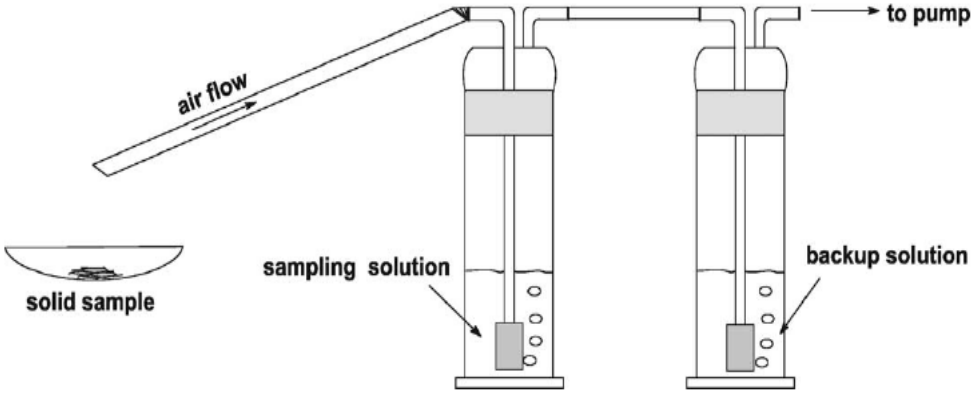


Figure I-II-2. Montage expérimental pour l'analyse du TATP. D'après [33].

Le transfert des molécules volatiles vers l'état gazeux peut être limité par l'état de surface du débris. Il faut donc, pour obtenir des seuils de détection convenables, le pompage de très grands volumes d'air à travers les tubes d'adsorption ou les fibres SPME. Ces approches concernent l'étude de composés organiques et volatils, il est donc préférable pour avoir une vue globale de la composition de l'explosif, d'extraire aussi les résidus solides. Au LCPP, les composés volatils sont analysés à l'aide d'une fibre SPME directement introduite dans l'injecteur d'un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse.

2.2. Extraction de résidus d'explosifs inorganiques à partir de matrices solides

Les cotons utilisés pour frotter les débris sont extraits à l'aide d'un solvant pour récupérer les informations qu'ils contiennent [4]. L'extraction des composés inorganiques, qui sont très solubles dans l'eau, est très peu décrite dans la littérature. Au LCPP, leur extraction consiste en l'immersion totale dans de l'eau ultra-pure préalablement portée à ébullition, puis l'extraction est favorisée en plaçant alors le bécher dans un bain à ultrasons durant 10 min. La solution est ensuite filtrée sur un filtre en cellulose 150-µm puis à l'aide d'un filtre seringue en nylon 0,45-µm.

2.3. Extraction de résidus d'explosifs organiques à partir de matrices solides

2.3.1. Extraction des cotons de prélèvement

Les cotons peuvent être extraits directement dans un solvant organique ou une solution hydro-organique appropriée, par compression par piston [4,6] ou par centrifugation [4,5,34]. Ces techniques conduisent à des rendements d'extraction relativement limités car les explosifs organiques semblent fortement liés au coton et un apport d'énergie est nécessaire pour rompre ces interactions. C'est pour cette raison que les extractions en solvant Soxhlet ou avec des ultrasons sont susceptibles de désorber plus efficacement les explosifs, entraînant aussi plus d'interférents issus de la matrice [3,35]. Les solvants organiques co-extraient généralement beaucoup plus de composés interférents que l'eau. Ce phénomène a été illustré par Thompson et al. qui ont comparé des extractions par de l'eau ultra-pure ou de l'acétone de cotons propres ou dopés et imprégnés d'huile de moteur [6]. Comme le montre la Figure I-II-3, l'acétone entraîne alors des composés interférents à la fois issus du coton et de la matrice alors que l'eau conduit à des chromatogrammes plus facilement interprétables. Mais, selon les matrices (des tissus par exemple où des colorants sont présents), des résultats totalement inverses peuvent être trouvés [6]. Une extraction avec de l'eau présente les avantages d'être peu coûteuse, plus respectueuse de l'environnement et, dans la plupart des cas, de limiter la quantité de composés interférents coextraits.

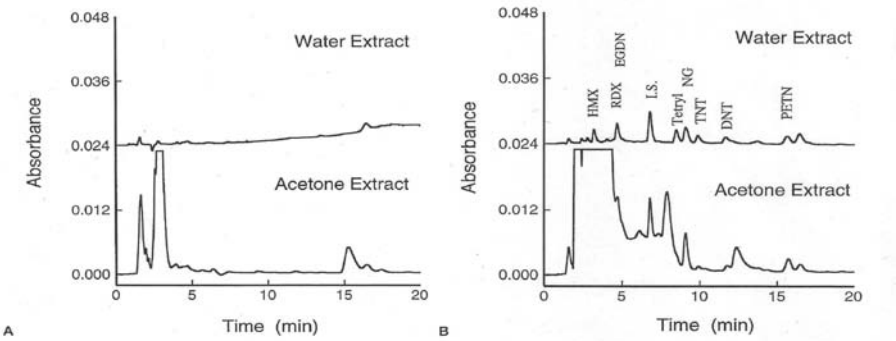


Figure I-II-3. Analyse par HPLC d'extraits de cotons propres (A) et de cotons dopés et imprégnés d'huile de moteur (B). UV (210 nm). D'après [6].

2.3.2. Extraction de résidus d'explosifs organiques à partir de matrices solides

2.3.2.1 Extraction par solvant

Les extractions en solvant Soxhlet ont été utilisées pour la recherche d'explosifs après attentat ou dans l'environnement. Un Soxhlet permet de réaliser des extractions à chaud de matrices solides mais nécessite un volume conséquent de solvant et un temps d'extraction très long. Il

a toutefois été appliqué à des tissus végétaux et des sols [36-38]. Les temps d'extraction pouvant atteindre parfois 48 heures, un risque de dégradation des explosifs thermolabiles sous l'effet de la température est donc possible.

Pour éviter cette dégradation, Jenkins et al. ont proposé d'utiliser plutôt le bain à ultrasons : la température n'augmente que très légèrement et plusieurs extractions simultanées peuvent être réalisées [39]. Une comparaison a donc été faite entre l'extraction par Soxhlet et par ultrasons d'un sol dopé par du TNT, TNB, RDX et HMX. Ces deux techniques permettent d'extraire les mêmes quantités d'explosifs mais les équilibres ont été atteints plus rapidement avec le bain à ultrasons. La technique consistant à extraire les sols aux ultrasons avec de l'acétonitrile pendant 18 heures (les nitroaromatiques semblent être fortement adsorbés aux particules de sol, ce qui explique la durée de la procédure) est même devenue la méthode de référence pour la recherche d'explosifs dans les sols pour l'agence américaine de protection de l'environnement (méthode US EPA 8330) [38,40-43].

L'extraction en solvant chaud sous pression (PLE) consiste à introduire la matrice à extraire dans une cellule en acier inoxydable puis à la placer dans un four. Cette cellule est remplie de solvant puis chauffée à une température pouvant atteindre 200 °C. La pression est alors maintenue à environ 10 MPa pour conserver le solvant à l'état liquide. Les hautes pressions et températures permettent de faciliter la pénétration du solvant dans la matrice, de diminuer les interactions entre les analytes et la matrice, d'augmenter la solubilité des analytes dans le solvant et enfin d'améliorer les cinétiques de transfert. La PLE a été appliquée à l'extraction de sols et d'organes d'animaux dans l'acétonitrile à 100 °C pour la recherche du RDX et de ses métabolites [46-48]. Les performances de la PLE ont été comparées à la méthode US EPA 8330 et les résultats obtenus sont équivalents avec un temps d'extraction en PLE de 15 min uniquement [49,50].

L'extraction assistée par micro-onde s'est également très vite développée durant les 20 dernières années. Cette technique consiste en une interaction directe entre la matière à extraire et un rayonnement électromagnétique. Ce transfert d'énergie induit un transfert de matière dont les mécanismes diffèrent notablement de ceux de l'extraction solide-liquide traditionnelle. L'extraction d'explosifs organiques a été réalisée dans une solution aqueuse de phosphate de sodium 0,1 M à pH 8,0 sous 400 W et 80 °C [51,52].

2.3.2.2 Extraction par fluide supercritique

L'extraction par fluide supercritique (SFE) consiste à mettre en contact une matrice solide avec un fluide dont les valeurs de température et de pression sont supérieures à celles du point critique. Ce fluide (traditionnellement le CO_2) présente un fort coefficient de diffusion, une viscosité relativement faible et un bon pouvoir solvant, assurant la pénétration dans la matrice et la solubilisation des analytes, les composés les plus polaires tels que le RDX et le HMX

étant plus difficilement extraits [44]. L'ajout d'un modificateur polaire comme le méthanol est souvent nécessaire pour extraire les composés les plus polaires. Cette technique a été appliquée à des tissus végétaux et des sols [43-45]. L'ajout d'acétonitrile au dioxyde de carbone permet d'obtenir des résultats équivalents à ceux de la méthode US EPA 8330 mais avec des temps d'extraction de seulement 30 min [43]. La SFE reste tout de même une technique délicate à optimiser et sa mise en œuvre nécessite des moyens techniques relativement importants.

2.4. Purification et préconcentration des extraits

Dans la littérature, la purification et la préconcentration d'extraits contenant des explosifs ne concernent que les explosifs organiques. Comme ces explosifs ne seront pas concernés dans la suite de ce manuscrit, une présentation succincte des différentes techniques est réalisée.

2.4.1. Extraction liquide-liquide

L'Extraction Liquide-Liquide (LLE) est la méthode traditionnellement utilisée pour la purification et la concentration des échantillons aqueux. L'échantillon aqueux est mis en contact avec un solvant organique non-miscible et les composés organiques se répartissent entre les deux phases suivant leur affinité. Pour l'extraction des explosifs organiques, composés hydrophobes, l'utilisation de solvants apolaires, comme le dichlorométhane, permet d'obtenir de bons rendements, supérieurs pour la grande majorité à 90 % [53]. Cette méthode est utilisée dans la méthode US EPA 8330 pour l'extraction des explosifs organiques à partir d'eaux résiduaires [54-55]. Les méthodes d'ELL sont très coûteuses en temps et en solvants organiques. Elles peuvent être remplacées par d'autres types d'extraction comme l'extraction micellaire, l'extraction sur phase solide ou la microextraction sur phase solide.

2.4.2. Extraction micellaire

L'extraction micellaire ou extraction par point de trouble (CP) (Figure I-II-4) est une méthode d'extraction récente et qui a été appliquée à l'extraction d'explosifs dans des eaux [56]. Babaee et Beiraghi ont ainsi extrait du HMX, RDX, TNT et PETN dans des eaux à l'aide de Triton X-114 et de bromure de cétyltriméthylammonium (CTAB) [56]. Des rendements proches, voire meilleurs, ont été obtenus avec cette technique d'extraction par rapport à une extraction sur phase solide (SPE), SPME ou LLE.

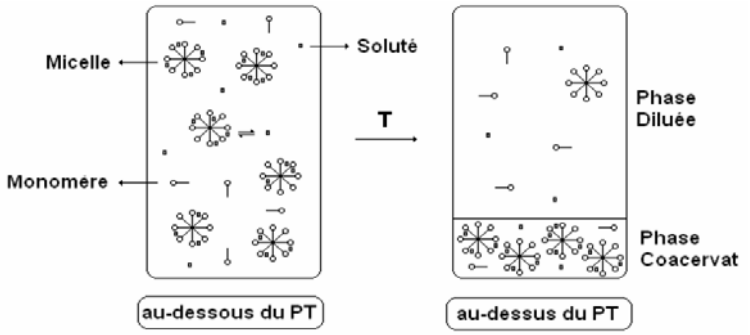


Figure I-II-4. Schéma de principe de l'extraction micellaire ou par point de trouble.

2.4.3. Extraction sur phase solide

L'extraction sur phase solide consiste à percoler l'échantillon à travers un adsorbant qui permet de retenir les analytes ciblés. Un adsorbant hydrophobe sera utilisé pour un échantillon aqueux et des composés peu polaires alors qu'un adsorbant hydrophile sera utilisé pour un échantillon organique et des composés polaires. Le principe d'utilisation de ces supports se résume en cinq étapes : le conditionnement, la percolation, le lavage, le séchage et l'élution [57].

L'application de la SPE aux explosifs organiques peut être réalisée à partir d'extraits organiques ou aqueux. Les applications concernant les extraits organiques ont utilisé des adsorbants polaires et ont conduit à des rendements très faibles [58-60]. C'est pour cette raison que ce paragraphe se concentrera sur l'analyse d'extraits aqueux. L'introduction de silices greffées hydrophobes dans le domaine de la SPE a permis aux laboratoires de développer de nouvelles méthodes. Kolla et al. et Strobel et al. ont montré que la percolation d'extraits organiques dilués dix fois dans l'eau sur une silice greffée C18 conduit à des rendements supérieurs à 95% lorsque 10 mL d'échantillon sont percolés sur 500 mg d'adsorbant [35,61,62]. Des adsorbants à base de polymère plus rétentifs autorisent la percolation de plus grands volumes et sont donc été utilisée de manière plus fréquente pour l'analyse d'explosifs post-attentats [6,55, 63-67]

L'utilisation de supports spécialement dédiés à un explosif ou une famille d'explosifs peut permettre de gagner en spécificité. A ce titre, les polymères à empreintes moléculaires (MIP) ont connu un essor important durant ces dernières années. Pour la préconcentration d'explosifs organiques, les MIPs sont généralement synthétisés dans un solvant aprotiques avec le TNT comme molécule empreinte et des monomères organiques comme l'acide méthacrylique [68-71] et l'acrylamide [68,71-74]. L'approche monomère peut être remplacée par une approche alternative sol-gel [75-77]. Un adsorbant sol-gel a ainsi été utilisé pour l'extraction du TNT dans l'eau [78] ou de quatre composés nitroaromatiques dans des extraits de résidus post-explosion comme du sang ou de l'huile moteur [79].

2.4.4. Microextraction sur phase solide et sur simple goutte

Il a été montré précédemment que l'échantillonnage de vapeurs d'explosifs au moyen de fibres SPME suivi d'une analyse en chromatographie en phase gazeuse conduisait à des performances intéressantes. Néanmoins, l'adsorption de composés peu volatils, comme le RDX, le HMX, le Tétryl ou la pentrite, était limitée. Il est toutefois possible d'immerger une fibre SPME dans un échantillon aqueux pour en extraire les explosifs nitrés [19,21,22,25,80]. Les analytes se partagent entre l'échantillon aqueux et l'adsorbant placé à l'extrémité de la fibre en fonction de leur affinité. Cette technique a été utilisée pour l'analyse du RDX et du HMX [19,22,81-83].

Les protocoles d'extraction suivent la tendance actuelle de la miniaturisation des techniques d'analyse avec pour principal objectif la diminution du volume de solvant organique utilisé. Ainsi, la microextraction sur simple goutte (SDME), technique à la frontière entre la SPME et la LLE, a été appliquée aux nitroaromatiques [84-86]. La SDME s'effectue en immergeant dans l'échantillon aqueux une microseringue remplie de solvant organique non-miscible (Figure I-II-5). Les analytes se distribuent alors entre l'échantillon aqueux et la petite goutte de solvant organique suspendue à l'extrémité de la seringue. L'analyse s'effectue directement par injection du solvant organique en chromatographie en phase gazeuse. Les solvants couramment rencontrés sont le toluène, le dichlorométhane et l'hexane, ce qui limite l'emploi de cette technique aux composés plutôt apolaires, comme le sont les nitroaromatiques. Des rendements de l'ordre de 80 % peuvent être atteints.

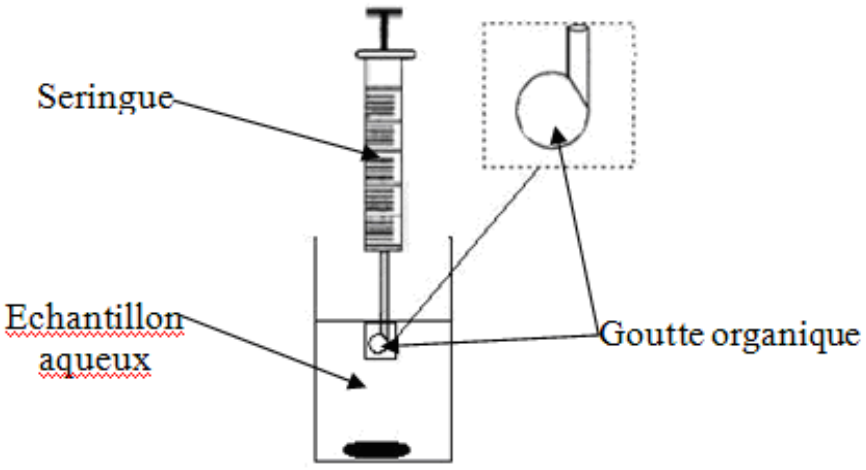


Figure I-II-5. Schéma du principe de la microextraction par simple goutte

2.5. Conclusion

Les explosifs inorganiques sont d'abord prélevés via des cotons qui sont extraits dans de l'eau portée à ébullition et soumis aux ultrasons. Cette méthode très simple d'utilisation est efficace et ne nécessite pas de solvant organique.
Les explosifs organiques volatils sont eux directement extraits soit par tube d'adsorption ou par fibre SPME alors que les composés les moins volatils sont soit extraits par cotons ou directement de la matrice solide à l'aide d'un solvant organique ou d'une solution hydroorganique à l'aide de diverses techniques d'extraction (Soxhlet, ultrasons, SFE…). Les extraits obtenus sont finalement préconcentrés avant l'analyse, le plus souvent par extraction sur phase solide.

3. Analyses des explosifs et de leurs résidus

3.1. Les techniques d'analyses structurales

Les techniques classiques de chimie analytique structurale fondées sur les interactions entre rayonnement et matière sont fréquemment utilisées en laboratoire ou sur le terrain. Parmi celles-ci on retrouve la résonance magnétique nucléaire (RMN), les spectroscopies infrarouge (IR), Raman ultraviolet (UV) ainsi que la microscopie à balayage électronique. Néanmoins, ces techniques ne sont utilisables que lorsque les composés à caractériser sont purs. Les spectroscopies IR [87], UV et Raman [88] sont des outils qui fournissent des informations moléculaires utiles à l'identification des explosifs et sont relativement peu coûteuses et capables d'identifier rapidement et simplement la nature des composés grâce à des bibliothèques spectrales d'explosifs. En 1995, Cheng et al. ont effectué l'analyse in-situ des explosifs RDX et PETN à l'aide de la spectroscopie Raman en utilisant des lasers de longueurs d'onde d'excitation dans le visible et ont confirmé que l'analyse sur le terrain était à la fois possible et fiable [89]. Des engins explosifs ont été également analysés en utilisant l'excitation laser dans le domaine UV mais la sensibilité limitée et la faible volatilité des explosifs n'ont pas permis une détection sensible des molécules [90]. Cependant, le développement d'instruments tels que le laser proche infrarouge [91] et le Raman à transformée de Fourier [92] a permis de surmonter ces problèmes. Ces appareillages, également disponibles en formats portables, permettent une détection performante directement sur le lieu de l'explosion [93,94].
La RMN est reconnue comme un outil puissant pour les analyses structurales [95-97]. Les progrès réalisés permettent de différencier des lots d'un même explosif grâce aux différents isomères nitroaromatiques utilisés dans la synthèse ou offrent la possibilité de détecter de

manière rapide et certaine des liquides explosifs dans les aéroports [98]. La résonance quadripôle nucléaire connaît un très fort développement dans le domaine des explosifs, elle apparaît moins coûteuse, plus compacte et plus sélective que la RMN et est également d'intérêt dans les aéroports [99,100]. Enfin, il est possible de caractériser des explosifs au moyen de la microscopie électronique à balayage. Ainsi, la présence de TNT sous forme de cristaux allongés sur des dépôts de sable a été découverte à Ottawa [101,102]. Cette technique s'avère toutefois coûteuse et non-transportable sur le terrain.

3.2. Les techniques chromatographiques

3.2.1. Analyse d'explosifs par chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse (GC) permet l'analyse de mélanges complexes dont les constituants diffèrent par leur volatilité et/ou leur polarité. L'utilisation de la GC pour l'analyse des explosifs ne semble pas évidente compte tenu de la très faible volatilité ou de la forte thermolabilité de certains composés comme les esters nitrés et les nitramines. De plus, les matrices étudiées sont souvent très complexes et peuvent entraîner une dégradation prématurée de la colonne analytique. Toutefois, la GC est très fréquemment utilisée pour l'analyse de composés organiques nitrés et à base de fonctions peroxydes [103-105]. L'optimisation des paramètres tels que le mode d'injection, la température ou la nature de la phase stationnaire permet alors de minimiser les problèmes précédemment cités.

3.2.1.1.Paramètres d'injection et de séparation d'explosifs en GC

Deux modes d'injection sont couramment utilisés en GC : les injections « split » et « splitless ». L'injection en mode « split », c'est-à-dire avec division de débit, n'est pas adaptée d'une manière générale à l'analyse de traces et est de ce fait rarement mise en œuvre pour la recherche d'explosifs. En revanche, le mode d'injection « splitless », c'est-à-dire sans fuite, permet de transférer la quasi-totalité de l'échantillon vers la colonne et est donc préféré pour l'analyse de traces d'explosifs [18-21,25,106-108]. La température de l'injecteur est également un paramètre clé de l'analyse. Des températures relativement importantes sont nécessaires pour les composés peu volatils. Le HMX, par exemple, n'est volatilisé correctement qu'à partir de 250 °C [109]. Cette température rend quasi impossible l'analyse simultanée du HMX et de l'EGDN ou de la NG. En effet, ces derniers se décomposent à haute température. L'injection en mode « on-column » permet d'analyser les composés thermolabiles ou de haute température d'ébullition. L'échantillon est introduit à froid dans la colonne et l'augmentation progressive de la température va permettre de les vaporiser les uns

après les autres. Ce mode d'injection apparaît comme très intéressant lorsqu'il s'agit d'analyser des traces d'explosifs [35,110,111]. Cependant, des injections répétées d'échantillons complexes peuvent conduire à un encrassement de l'entrée de la colonne et donc à une dégradation des performances chromatographiques [35].

La nature de la phase stationnaire joue également un rôle important sur les performances de la méthode. L'analyse d'explosifs s'effectue couramment sur des colonnes capillaires avec des phases stationnaires de type polydiméthylsiloxane [2,20,108] ou polyméthylphénylsiloxane [2,3,15,25,35,46,47,110,111]. Pour séparer les composés ayant des températures d'ébullition comparables, comme les DNB et les DNT par exemple, il est possible d'utiliser des phases stationnaires polaires de type polycyanopropylphénylméthylsiloxane [2,18]. Enfin, le fabricant Restek a développé la colonne RTx-TNT, qui est spécialement dédiée à l'analyse des nitroaromatiques et des nitramines [21].

La tendance actuelle est à l'obtention de séparations rapides. Pour cela, l'analyste a la possibilité de modifier plusieurs facteurs, tels que la longueur de la colonne, le débit du gaz vecteur ou la programmation en température du four. Mais il est possible aussi d'effectuer la séparation en mode « fast-GC ». Les colonnes sont alors très courtes avec de faibles diamètres internes. Ainsi, une séparation des explosifs les plus couramment rencontrés à l'exception du HMX a été réalisée en moins de 2,5 min sur une colonne de 5 m de long et de 0,1 mm de diamètre interne avec une rampe de température de 60 °C par min [112]. La séparation obtenue est présentée Figure I-II-6

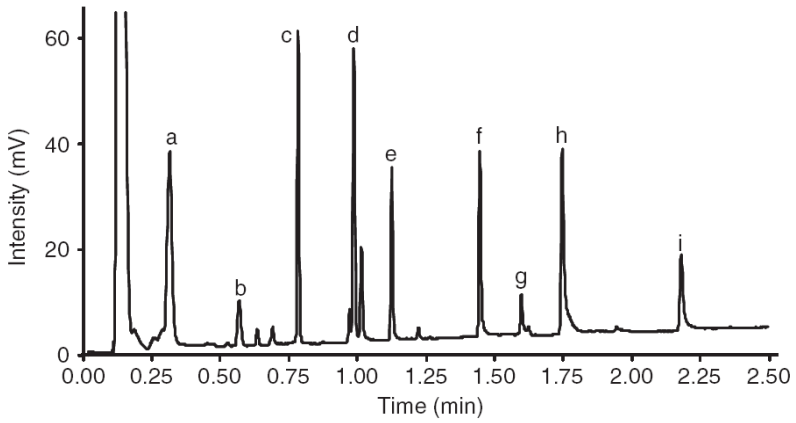


Figure I-II-6. Chromatogramme d'un mélange standard d'explosifs organiques obtenu en mode Fast-GC couplé à une détection à capture d'électrons. Identification : (a) EGDN, (b) 4-NT, (c) NG, (d) 2,6-DNT, (e) 2,4-DNT, (f) TNT, (g) PETN, (h) RDX, (i) Tétryl. D'après [112].

3.2.1.2.Modes de détection

Le détecteur le plus couramment utilisé en GC est le détecteur à ionisation de flamme (FID). Néanmoins, des composés possédant de forts pourcentages en oxygène ou en azote (comme

les nitramines ou les esters nitrés) sont difficilement détectables. Ceci explique le faible nombre d'études consacrées à l'analyse d'explosifs par GC/FID. On le rencontre surtout pour la caractérisation d'additifs tels que les cires ou les huiles dans les explosifs [113-114].
Le détecteur à capture d'électrons est en revanche beaucoup plus fréquent car il est sélectif vis-à-vis des composés ayant une forte affinité pour les électrons et il est donc particulièrement adapté aux explosifs possédant un groupement $-NO_2$ [1,4,18,21,25,46,47,58,112]. En revanche, ce détecteur est particulièrement sensible aux effets de matrices et ne peut être mis en œuvre qu'après un traitement de l'échantillon adapté [46,47].
Le détecteur à chimiluminescence, encore connu sous le nom de « thermal energy analyzer » (TEA), est aussi utilisé pour l'analyse des explosifs. L'effluent de la colonne est ainsi pyrolysé à très haute température et les molécules possédant un groupement –NO ou $–NO_2$ libèrent du monoxyde de carbone. Le CO est dirigé vers une chambre de réaction sous vide où il est oxydé par de l'ozone. Le CO_2 formé émet une radiation de longueur d'onde caractéristique, ce qui permet alors d'enregistrer un signal. La sélectivité de ce détecteur vis-à-vis des molécules nitrées le rend intéressant pour les explosifs [2,3,11,35,59,60,111]. Philipps et al. ont comparé la sélectivité d'un détecteur ECD avec celle du TEA pour l'analyse d'explosifs contenus dans une boue contaminée [115]. Les chromatogrammes obtenus, représentés Figure I-II-7, montrent une meilleure sélectivité du TEA.

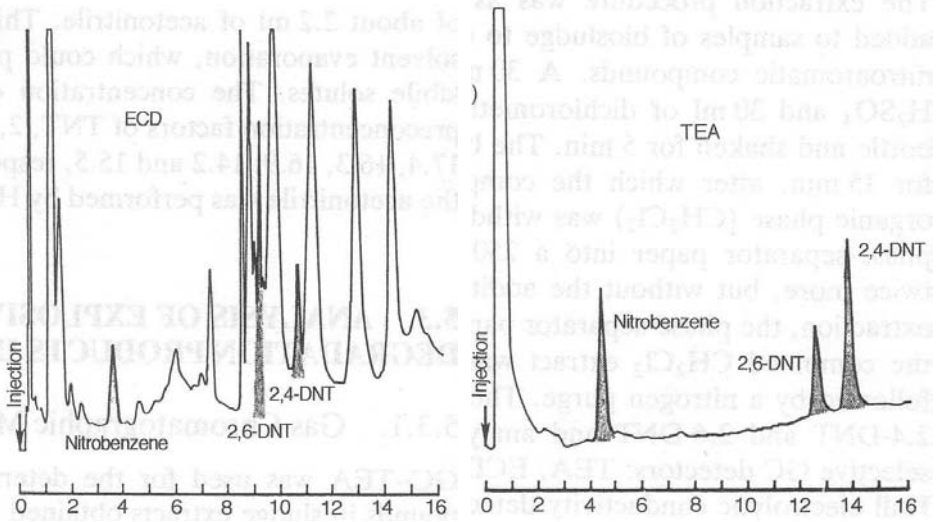


Figure I-II-7 : Chromatogrammes correspondant à l'analyse en GC/ECD et GC/TEA d'un extrait de boue contaminée. D'après [115].

3.2.1.3. Couplage à la spectrométrie de masse

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) a connu de nombreux développements pour l'analyse d'explosifs organiques. L'impact électronique et

l'ionisation chimique positive ou négative sont les deux modes d'ionisation les plus fréquemment rencontrés. Les ions ainsi formés sont ensuite transférés vers un analyseur de type quadripôle ou piège ionique.

Brill et al. ont déjà discuté des mécanismes de fragmentation en impact électronique des nitroaromatiques [116]. Leurs spectres de masse sont caractérisés par la présence d'un ion moléculaire intense mais également d'ions fragments majoritaires de masse m/z (M-30), m/z (M-46) et d'ions fragments minoritaires de masse m/z 46 et m/z 30 [107,108,110,116]. Ils sont attribués aux ions $[M\text{-}NO]^+$, $[M\text{-}NO_2]^+$, NO_2^+ et NO^+. Les esters nitrés présentent des spectres de masse très similaires caractérisés par les ions de masse m/z 30, m/z 46 et m/z 76 correspondant à NO^+, NO_2^+ et $CH_2ONO_2^+$ [107,110]. En revanche, l'impact électronique ne permet pas de distinguer EGDN, NG et PETN et les spectres de masse du RDX et du HMX sont aussi très comparables [107,110]. Enfin, le TATP est également détecté en impact électronique avec des m/z caractéristiques à 221 (M-1), 75 ($[C_3H_7O_2]^+$), 59 ($[C_3H_7O]^+$) et 43 ($[C_2H_3O]^+$) [117,118].

L'ionisation chimique consiste, elle, à produire des molécules protonées ou déprotonées par collisions réactives de la molécule d'intérêt avec les ions primaires GH^+ ou $[G\text{-}H]^-$ du gaz réactif (G) présent dans la source. Cette réaction n'est possible que si l'affinité protonique ou l'acidité de la molécule sont supérieures à celle du gaz. Parmi les gaz les plus courant on retrouve le méthane, l'ammoniac et l'isobutane. L'ionisation chimique est très souvent utilisée en complément de l'ionisation par impact électronique. Les nitroaromatiques ainsi que les esters nitrés donnent un ion MH^+ abondant alors que sur les spectres de masse des nitramines, cet ion est peu abondant [107,108,119]. Par leur affinité électronique, les nitroaromatiques sont des molécules qui donnent un ion $M^{-\cdot}$ abondant quand il n'y a pas de protons mobiles. En effet l'ion $[M\text{-}H]^-$ n'est observé que pour les composés relativement acides comme le TNT. Les esters nitrés présentent des spectres de masse très proches caractérisés par des ions de faibles rapports m/z.

3.2.2. Analyse d'explosifs par chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une technique utilisable dans la recherche d'explosifs organiques nitrés car elle a l'avantage d'être facilement mise en œuvre, d'être rapide et peu coûteuse [104,105]. Elle est souvent employée pour orienter les choix des analyses suivantes et caractériser des composés tels que la nitrocellulose. L'adsorbant courant est un gel de silice et il s'agit alors de chromatographie d'adsorption. L'analyse des explosifs par CCM fait intervenir le plus souvent des phases mobiles comprenant un solvant apolaire et un solvant polaire [120]. La révélation des explosifs organiques s'effectue généralement en pulvérisant des réactifs chimiques sur la plaque, notamment le réactif de Griess, sélectif des

nitramines et des esters nitrés [58,120] et le réactif de Bratton-Marshall, sélectif des nitroaromatiques [120]. L'ensemble de ces réactifs conduit à une caractérisation sélective de la plupart des composés recherchés d'où la popularité de la CCM pour la recherche d'explosifs nitrés. Néanmoins, les seuils de détections sont relativement élevés, de l'ordre de la dizaine de ppm, et la CCM présente un pouvoir résolutif relativement limité, il est donc souvent nécessaire d'effectuer des analyses complémentaires pour des échantillons complexes.

La chromatographie en phase liquide (HPLC) connaît depuis une dizaine d'année un développement important pour ce qui concerne l'analyse d'explosifs [80,121].

3.2.3. Analyse d'explosifs organiques par chromatographie en phase liquide sur colonne

3.2.3.1.Phases stationnaires et mobiles pour l'analyse d'explosifs

Les colonnes utilisées possèdent un diamètre compris entre 1 et 4,6 mm et sont généralement remplies de particules de silice de 1,6 à 5 µm greffées le plus souvent par des groupements organiques, -NH_2 ou –CN (mode partage classique) ou C8 ou C18 (mode partage à polarité de phases inversée).
Les explosifs organiques sont des composés moyennement polaires, les log P variant de 0,85 pour le HMX jusque 2,38 pour la pentrite [40]. Ils peuvent donc être séparés aussi bien en partage normal qu'en partage inverse. Une séparation en mode partage à polarité de phases inversée est bien souvent préférée afin de limiter l'utilisation de solvants chlorés et ainsi rendre les phases mobiles compatibles avec les détecteurs employés [122]. Une phase stationnaire de silice greffée C18 et une phase mobile eau/méthanol sont les plus souvent rencontrées [18,22,38,41,42,50,63,67,123]. Les résultats obtenus peuvent être confirmés pour ce même système de phase mobile en remplaçant la colonne C18 par une colonne -CN, comme le préconise l'agence américaine de protection de l'environnement [123,124]. Une séparation d'explosifs sur phase stationnaire C18 conduit la plupart du temps à une séparation incomplète, due aux coefficients de partage très proches de certains composés (Figure I-II-8) [123,125,126]. Les composés difficilement séparables sur une phase stationnaire C18, sont par contre très bien séparés sur une colonne CN. Afin d'améliorer la séparation sur C18, une approche utilisant une précolonne de type CN a été utilisée avec des résultats prometteurs [23,25,123,125,126]. Une autre approche destinée à améliorer la séparation consiste à employer une phase stationnaire en carbone graphite poreux (PGC).

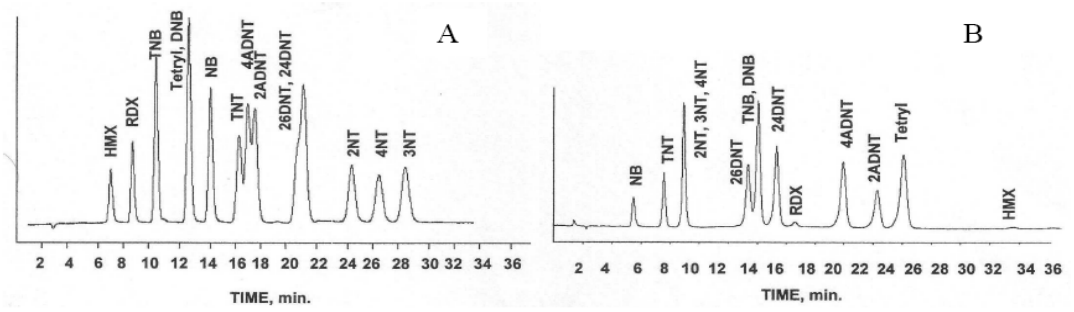


Figure I-II-8. Analyse en HPLC de solution étalons. Colonnes Res Elut C18 (A) et Res Elut CN (B) avec un mélange d'eau et de méthanol (50:50, v/v). UV (254 nm). D'après [123].

Sur ce matériau, constitué d'un empilement de feuillets d'atomes de carbone, la rétention des analytes fait intervenir un mécanisme d'adsorption sur la surface plane du PGC, un mécanisme d'interaction π-π et un mécanisme d'interactions dipolaires entre les groupements polaires des molécules et la surface polarisable du PGC [127]. Ceci permet de pallier le manque de sélectivité rencontré sur une phase C18 vis-à-vis des composés très polaires [128,129] ou d'isomères de position comme ceux du DNT [16,17]. Les nitroaromatiques, de par leur électronégativité et leur forme plane, présentent de fortes affinités avec la phase PGC. Il est donc nécessaire d'utiliser des phases mobiles plus éluantes comprenant par exemple de l'isopropanol [16], du toluène [17] ou du tétrahydrofurane [129]. Des phases stationnaires à base de groupements phényle peuvent également être mises en œuvre [130]. Les groupements phényle sont bien connus pour participer à des interactions π-π et ont donc des sélectivités meilleures qu'avec une colonne PGC, avec des molécules aromatiques polaires ou polyaromatiques.

Enfin, il est possible d'obtenir des temps d'analyse très courts avec des colonnes monolithiques qui présentent des perméabilités plus importantes. Ces colonnes sont parfaitement adaptées à la séparation d'un nombre limité d'explosifs mais ne le sont pas pour des mélanges complexes. La Figure I-II-9 représente ainsi la séparation d'un mélange de HMX, RDX, TNT, 2,4-DNT et PETN en moins de 2,5 min [131].

3.2.3.2.Modes de détection

Le détecteur UV, robuste et commode d'emploi, est le plus couramment rencontré. La détection UV est donc le premier choix pour l'analyse des nitramines et des nitroaromatiques, qui présentent des maxima d'absorbance compris entre 210 et 250 nm [6,132-134] mais elle est peu sélective [35]. Pour les esters nitrés, une détection à 210 nm est privilégiée, mais à cette longueur d'onde, certains solvants ne sont pas transparents et de nombreux interférents peuvent perturber le signal.

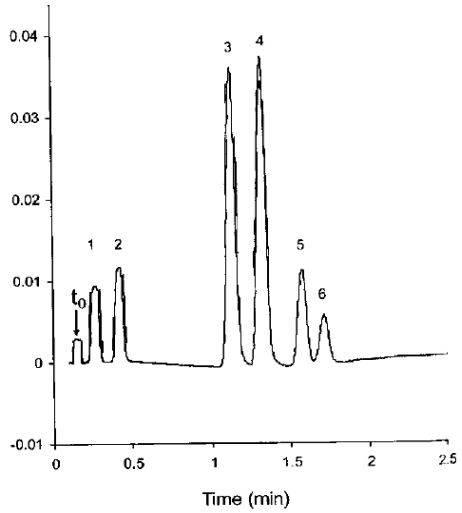


Figure I-II-9. Séparation rapide par chromatographie en phase liquide de 6 explosifs commerciaux à l'aide d'une colonne monolithique ODS de 5 cm de longueur. Détection UV à 254 nm. Gradient d'élution de 90 % (A): 10 % (B) à 25 % (A) : 75 % (B) (solvant A = 10 % MeOH, 90 % eau, solvant B = 70 % MeOH, 30 % eau). Débit : 8 mL min^{-1}. Température : 60 °C. Identification : (1) HMX, (2) RDX, (3) TNT, (4) 2,4-DNT, (5) 2-NT, (6)-3-NT. D'après [131].

La détection électrochimique, qui met à profit les propriétés oxydoréductrices des analytes peut être mise en œuvre pour les nitroaromatiques (réduction des groupements NO_2 en groupements NH_2) [5,67,135].

Le TEA peut être utilisé mais ce dernier n'est compatible qu'avec des phases mobiles non aqueuses. La séparation se fait donc en partage normal [111]. La détection infrarouge peut également être couplée à la LC pour la détection des explosifs à base de peroxydes. Ainsi, le TATP et le HMTD ont pu être détectés avec des limites de détection de l'ordre de 1 mM [136].

Enfin, la HPLC-MS a fait l'objet d'un nombre croissant de publications. Ce couplage est actuellement essentiellement réalisé avec des interfaces d'ionisation à pression atmosphérique, comme celles à ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI), à photoionisation à pression atmosphérique (APPI) et à électronébulisation (ESI). L'APCI est une technique d'ionisation en phase gazeuse à pression atmosphérique, qui fait appel à des réactions ion-molécules, dans lesquelles les ions primaires réactifs sont produits par des décharges électriques sur un aérosol de solvant [137-139]. L'ionisation des explosifs nitrés est comparable à celle qui se produit à basse pression. Le groupement $-NO_2$ étant particulièrement électronégatif, l'ionisation s'effectue le plus souvent en mode négatif. Les nitroaromatiques sont détectés en APCI sous la forme d'un radical anion moléculaire $M^{-\cdot}$ abondant [52,132,140] et également caractérisés par la présence d'ions à nombre pair d'électrons $[M-H]^-$ et $[M-OH]^-$ [139,140]. Les nitramines, et en particulier le RDX, donnent des ions adduits, comme par exemple $[M+NO_2]^-$ [141]. En présence d'anions chlorure, les esters nitrés ainsi que les nitramines donnent un ion adduit $[M+Cl]^-$, en présence d'ions nitrate, un ion adduit $[M+NO_3]^-$ et en présence d'ions formiate l'ion adduit $[M+HCO_2]^-$. Les

explosifs à base de peroxydes peuvent également être détectés avec ce mode d'ionisation [142,143]

L'APPI est, elle, une technique assez récente dans laquelle l'échantillon est vaporisé à l'aide d'un nébuliseur similaire à celui utilisé en APCI. Après la vaporisation, l'analyte interagit avec des photons émis par une lampe à décharge Vacuum UV (VUV). Une série de réactions en phase gazeuse permet alors l'ionisation des molécules. La source APPI est bien appropriée pour ioniser les explosifs organiques [144,145]. Les spectres de masse des nitramines et des esters nitrés montrent uniquement la formation d'ions adduits chlorés $[M+Cl]^-$ et les nitroaromatiques sont caractérisés par l'ion $[M-H]^-$.

Enfin, l'ESI s'effectue en phase liquide et à l'extrémité d'un capillaire porté à un haut potentiel électrique. Le champ électrique intense provoque la formation de gouttelettes chargées. La taille de ces gouttelettes diminue suite à l'évaporation du solvant et par « explosions coulombiennes » jusqu'à l'obtention d'ions en phase gazeuse, bien souvent sous forme d'agrégats multichargés. Les nitroaromatiques sont très difficiles à détecter en ESI. En général, les ions les plus abondants sont $[M-H]^-$ et $M^{+\cdot}$ [146-148]. Les esters nitrés et les nitramines conduisent à des ions particulièrement variés dont la nature est étroitement liée aux conditions de désolvatation et de formation d'agrégats. Les spectres de masse obtenus sont différents en fonction de l'additif utilisé : avec l'ajout d'agents chlorés, on observe l'ion adduit $[M+Cl]^-$, en présence de nitrate on obtient $[M+NO_3]^-$ et en présence d'acide formique ou acétique on obtient respectivement $[M+HCO_2]^-$ et $[M+CH_3CO_2]^-$ [52].

Il est à noter qu'il est très difficile de différencier les isomères du TNT et du DNT car ils présentent des spectres de masse presque identiques. La spectrométrie de masse en tandem est alors requise et elle a été appliquée aux nitroaromatiques [149-151] et aux esters nitrés [150,151]. Le radical cation $M^{+\cdot}$ des nitroaromatiques obtenu en APCI se fragmente en ions $[M-NO]^-$ ou $[M-NO_2]^-$. Il est alors possible de distinguer les 2,4,6-TNT et 2,4-DNT de leurs isomères respectifs car leurs spectres de fragmentation sont caractérisés par la présence d'un ion $[M-OH]^-$ intense [149]. Pour pouvoir différencier les isomères du TNT et du DNT, il est nécessaire d'effectuer leur séparation au préalable.

3.2.4. Analyse d'explosifs inorganiques par chromatographie ionique

La chromatographie ionique (IC) utilise le mode d'échange d'ions pour la séparation de mélanges de cations ou d'anions et est associée principalement à une détection conductimétrique [2,152-154]. Les séparations d'anions s'effectuent sur des phases stationnaires possédant des groupements fonctionnels de type $-NHR_2^+$ ou $-NR_3^+$ et les séparations de cations sur des phases stationnaires possédant des groupements fonctionnels de type $-CO_2^-$ ou $-SO_3^-$. La détection conductimétrique nécessite soit d'utiliser des phases

mobiles de faible conductivité, soit d'abaisser la conductivité de l'effluent de la colonne par suppression chimique.

L'IC est extrêmement utilisée pour l'analyse des explosifs inorganiques. L'une des premières méthodes a été développée par le FBI en 1980 pour l'analyse de débris post-explosion [155]. Un éluent composé d'acide chlorhydrique et de méthanol a permis de séparer les cations sodium, ammonium, monométhylammonium (MMA) et potassium. Une méthode pour l'analyse des anions a ensuite été développée, tout d'abord spécifiquement pour l'analyse des mélanges explosifs perchlorate/chlorate/sucre [156]. Ainsi, les anions chlorure, nitrate, sulfate et perchlorate ont été analysés en moins de 20 min dans des extraits de résidus de bombes artisanales et de sols à l'aide d'un éluent composé d'hydrogénophthalate de potassium. Mc Cord et al. ont mis au point une analyse d'extraits de bombes artisanales récoltés après explosion et ils ont séparé en moins de 20 min les anions chlorure, nitrite, nitrate, chlorate, sulfate, thiocyanate, perchlorate et hydrogénocarbonate avec un éluent d'acide isophthalique [157]. Une détection par UV indirecte à 280 nm a été employée. En complément de l'analyse des anions, une méthode d'analyse des cations a permis de séparer en moins de 17 min les cations sodium, ammonium, potassium, magnésium, calcium, lithium, éthyammonium et MMA sur une colonne Waters M/D à l'aide d'un éluent acide nitrique-EDTA et d'une détection conductimétrique. Une colonne Dionex AS9 avec un éluent composé de carbonate de sodium et une colonne Dionex CS12 avec un éluent d'acide méthanesulfonique ont permis à Burns et al. de séparer respectivement les anions chlorate, chlorure, perchlorate et nitrate et les cations sodium, calcium, ammonium et MMA dans des résidus d'explosif [158]. Avec cette méthode, le perchlorate n'était pas suffisamment résolu du nitrate et n'a pas pu être analysé.

Cette séparation a été ensuite améliorée au début des années 2000, par le FBI qui a développé une méthode pour la recherche des anions chlorure, nitrite, chlorate, nitrate, sulfate, thiocyanate et perchlorate en moins de 16 min sur une colonne Ion Pak Anion HR avec un éluent contenant les acides borique et D-gluconique, de l'hydroxyde de lithium, du glycérol, de l'acide octanesulfonique (réactif permettant d'ajuster la sélectivité entre l'anion perchlorate et l'anion nitrate), de l'acétonitrile (pour augmenter la résolution) et de l'hydroxyde de tétrapropylammonium (réactif favorisant l'appariement d'ions) [153]. Les ajouts d'acide octanesulfonique et d'hydroxyde de tétrapropylammonium permettent de faciliter l'élution des anions les plus retenus. Des résidus post-explosion ont pu être analysés avec cette méthode. Des méthodes pour l'analyse d'explosifs organiques, pyrotechniques et de poudres ont été présentées par les laboratoires Sandia National Laboratories en 2002 [159]. Une séparation d'une durée de 18 min des anions fluorure, chlorure, nitrate, sulfate, thiocyanate, phosphate et perchlorate à l'aide d'une colonne Dionex AS16 a ainsi été décrite. En 2007, Canella et al., ont utilisé une colonne de particules hybrides (2,5 µm) de silice C18 greffée avec du bromure de di-dodécyldiméthylammonium (DDAB) afin de mettre en œuvre un

mécanisme mixte de séparation [160]. Cette colonne, stable dans une gamme de pH allant de 1 à 12, a permis l'emploi d'éluent bicarbonate-carbonate et une détection conductimétrique avec suppression chimique. Un gain de 10 min a été démontré par rapport à une colonne conventionnelle. Des limites de détection de 50 µg L^{-1} ont été relevées pour les anions chlorure, nitrate et perchlorate, 100 µg L^{-1} pour les anions nitrite et sulfate et 500 µg L^{-1} pour les anions thiocyanate et perchlorate.

Enfin, Johns et al. ont réalisé l'analyse simultanée de 18 anions et 12 cations inorganiques dans des résidus post-attentat en utilisant deux appareillages Dionex ICS-2000 avec un injecteur unique [161]. Le premier chromatographe dédié à l'analyse des anions comprenait une colonne Dionex AS20 avec un éluent constitué de potasse et le second, pour l'analyse des cations, une colonne Dionex SCS 1 avec un éluent composé d'acide oxalique et contenant de l'acétonitrile. Une détection conductimétrique a été utilisée dans les deux cas. Des limites de détections comprises entre 2 et 28 µg L^{-1} et 13 et 115 µg L^{-1} ont été déterminées respectivement pour les anions et les cations inorganiques. La figure I-II-10 montre les séparations simultanées obtenues pour des analyses de poudres noires artisanale et commerciale.

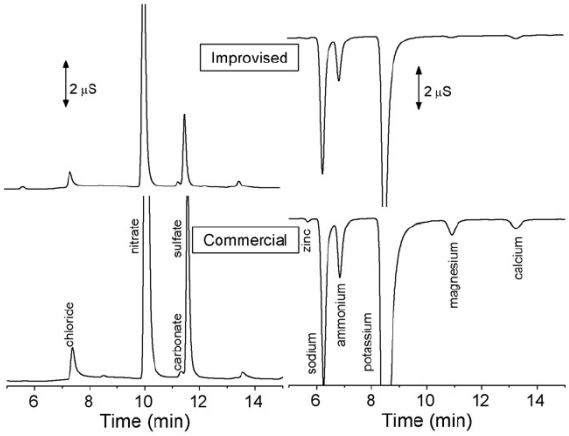


Figure I-II-10. Séparations simultanées d'extraits issus de résidus post-explosions de poudres noires artisanale et commerciale. Colonnes Dionex AS20 pour les anions et SCS 1 pour les cations. D'après [161].

3.3. Analyse d'explosifs à l'aide de techniques électrocinétiques et de microsystèmes électrophorétiques

3.3.1. Introduction

L'électrophorèse capillaire (CE) offre des possibilités très intéressantes pour analyser les explosifs ou leurs résidus. Cette technique miniaturisée, peu consommatrice en solvant, automatisable et donnant de grandes efficacités de séparation s'est imposée depuis le début

des années 90 comme une technique alternative aux techniques chromatographiques. La mise au point qui suit présente une vue d'ensemble de l'électrophorèse en format capillaire ou sur puce couplée à différents modes de détection pour l'analyse d'explosifs organiques ou inorganiques et leurs résidus.

3.3.2. Article

CAPILLARY AND MICROCHIP ELECTROPHORETIC ANALYSES OF EXPLOSIVES AND THEIR RESIDUES

Cédric Sarazin[1,2], Nathalie Delaunay[2], Anne Varenne[2], Christine Costanza[1], Véronique Eudes[1] and Pierre Gareil[2]

Separation and Purification Reviews, 39 (2010), 63-94

[1]Laboratoire Central de la Préfecture de Police, 39 bis rue de Dantzig, 75015, Paris.

[2]Laboratory of Physicochemistry of Electrolytes, Colloids and Analytical Sciences (PECSA), Chimie ParisTech, UPMC Univ Paris 06, CNRS, 11 rue Pierre et Marie Curie, 75231 Paris Cedex 05.

Key words: Explosives, Capillary electrophoresis, Microchip electrophoresis

Abstract

Since twenty years, the upsurge of terrorist threat on western countries and the appearance of new environmental policies have been generating an important demand for the detection and identification of explosives. Sensitive, fast, and cheap analysis method of explosives and their residues on the bombing site or in environmental samples (water, soil…) are necessary for the security of citizens or local residents. Within this context, electrophoresis, in capillary or in microchip format, displays attractive features. This article is an overview of the different applications of capillary and microchip electrophoresis for the analysis of organic- or inorganic-based explosives and their residues.

Abbreviation: BGE, background electrolyte; **18-C-6**, 18-crown-6 ether; **CCD**, contactless conductivity detection; **CD**, cyclodextrin; **CE**, capillary electrophoresis; **CEC**, capillary electrochromatography; **CMC**, critical micellar concentration; **CZE**, capillary zone electrophoresis; **EC**, Electrochemical; **EOF**, electroosmotic flow; **HIBA**, 2-hydroxyisobutyric acid; **HPLC**, high performance liquid chromatography; **IC**, ion chromatography; **IDLIF**, indirect laser-induced fluorescence; **LED**, light emitting diode; **LIF**, laser-induced fluorescence; **LOD**, limit of detection; **MEKC**, micellar electrokinetic chromatography; **MES**, morpholinoethanesulfonic acid; **MS**, mass spectrometry; **NTS**, 1,3,6-naphthalenetrisulfonic acid; **SDS**, sodium dodecylsulfate; **SPE**, solid-phase extraction; **SB-β-CD**, sulfobutyl ether-β-cyclodextrin.
Abbreviation of explosive compounds: CL-20, 2,4,6,8,10,12-hexanitro-2,4,6,8,10,12-hexaaza-isowurtzitane; **ADNT**, 2-amino-4,6-dinitrotoluene; **4-ADNT**, 4-amino-2,6-dinitrotoluene; **DANT**, diaminonitrotoluene; **DBP**, dibutylphtalate; **DEDPU**, *N*,*N*-diethyl-*N*,*N*-diphenylurea; **DEGDN**, diethylene glycol dinitrate; **DNB**, dinitrobenzene; **DNN**, dinitronaphthalene; **2,4-DNP**, 2,4-dinitrophenol; **DNT**, dinitrotoluene; **DPA**, diphenylamine; **EGDN**, ethylene glycol dinitrate; **2-HADNT**, 2-hydroxylamino-4,6-dinitrotoluene; **4-HADNT**, 4-hydroxylamino-4,6-dinitrotoluene; **HMX**, octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine; **MDNA**, methylenedinitramine; **MMA**, monomethylammonium; **MNX**, hexahydro-1-nitroso-3,5-dinitro-1,3,5-triazine; **NB**, nitrobenzene; **2-nDPA**, 2-nitrodiphenylamine; ***N*-nDPA**, *N*-nitrosodiphenylamine; **NG**, nitroglycerine; **NGU**, nitroguanidine; **2-NN**, 2-nitronaphthalene; **NT**, nitrotoluene; **PA**, picric acid; **PETN**, pentaerythritol tetranitrate; **RDX**, hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine; **Tetryl**, methyl-2,4,6-trinitrophenylnitramine; **TAT**, 2,4,6-triaminotoluene; **TNB**, trinitrobenzene; **TNT**, 2,4,6-trinitrotoluene.

Introduction

The bombing that occurred in Bali in October 2002, in Madrid in March 2004, and in London in July 2005, as well as the closure and remediation of former ammunition plants and military facilities generated an important demand for the determination of explosives and their residues in various matrices (tissues, plastics, metallic pieces, soils, waters…). However, many types of explosive exist, comprising inorganic and organic components.
Explosives are classified as low- or high-explosives according to their rates of burn: low-explosives burn rapidly (or deflagrate), while high-explosives detonate. High-explosives normally are employed in mining, demolition, and military warheads. They are usually based on nitrated organic compounds, such as trinitrotoluene (TNT), 1,3-dinitrobenzene (DNB), and more recently hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX), or methyl-2,4,6-

trinitrophenylnitramine (tetryl). Figure I-II-11 presents the stuctures of the main nitroaromatic, nitramine, and nitrate ester explosives. Raman spectroscopy [162] or electrochemical sensing [163] allow detection of explosives. As forensic samples are complex, a separation step is often involved prior to identification of explosive compounds. Due to chemical instability of explosives, even if gas chromatography can be used [164], high-performance liquid chromatography (HPLC) is often the technique of choice with UV or mass spectrometry (MS) detection [165], after various extraction methods such as solid-phase extraction (SPE), ultrasonic, soxhlet extraction, liquid-liquid extraction, or solid phase microextraction [166]. The only official method for analysis of explosives was specified by US EPA under EPA method 8330 for monitoring nitroaromatic compounds in environmental samples [167]. The method recommended using a C18 phase as a primary column and a CN phase as a confirmation column. The separation offered by these two phases can be somewhat problematic, with many co-elutions on both phases, and required 60 min. Therefore, there was a need for a complementary technique, involving an orthogonal mechanism, and, possibly, also being fast and cheap. A low-explosive is usually a mixture of a combustible substance and an oxidant that decomposes rapidly, such as black powder (potassium nitrate, charcoal, and sulfur), flash powder (aluminum or magnesium powder with a strong oxidizer, e.g. potassium chlorate or perchlorate), ANFO mixture (ammonium nitrate and fuel oil), and pyrotechnics. These kinds of bombs leave a significant amount of inorganic residues upon deflagration, which are characteristic of the initial mixture used. The determination of specific cations, such as ammonium, monomethylammonium (MMA), and potassium, and anions, such as chloride, nitrate, and perchlorate, is critical for the identification of the nature of the explosive mixture used.

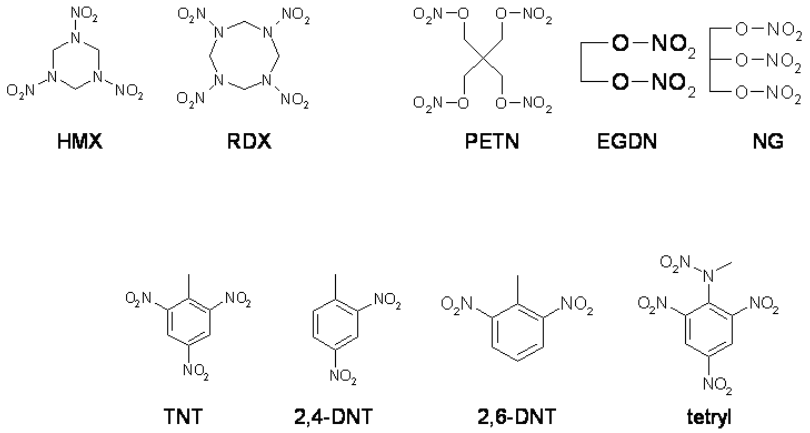


Figure I-II-11. Structure of the most often used nitrated explosives classified in 3 families: nitramines, nitrate esters, and nitroaromatics.

Different techniques were used for this task, but the most classical one was ion chromatography (IC) [156]. Nevertheless, IC suffered from the lack of a complementary technique for confirmation purposes.

For the last twenty years, capillary electrophoresis (CE) has become a valuable alternative to chromatography for the analysis of all low- or high-explosives [168-170], but peroxide-based ones as far as we know (this latter class has not been analyzed by CE yet and the interested readers are invited to consult references [171-174] for more details on others methods). Thanks to their unique properties of efficiency, speed, versatility, and miniaturization, CE is now essential for analyzing or monitoring explosives. Portable systems were developed for on-site measurements [175], which was highly required after terrorist attacks [176] or in the environmental field. The introduction of the concept of micro total analytical system, 20 years ago, brought additional advantages such as sample size and savings [177-179]. Thus, lots of efforts were paid to develop analytical microsystems, also called chips, for explosive analysis. This paper is intended to provide a comprehensive review on the use of electrophoretic analytical methods in explosive field, involving different modes of separation and detection, with capillary or chip format. It may supplement and update the previous published reviews on this subject [168,169,180].

1. Analysis of explosives by CE

1.1 Analysis of inorganic explosives by CE

Since twenty years, CE has known a real development for ion analysis and appears now as a valuable complementary technique to IC, as the separation mechanisms are completely different. Numerous commercial or home-made explosive mixtures contain inorganic species in large amount. This is the case, among others, for of ANFO mixture or black powder. The most frequently encountered ions are chloride, nitrate, nitrite, thiosulfate, sulfate, chlorate, perchlorate, thiocyanate, carbonate, phosphate, cyanate, fluorure, acetate, and benzoate anions, and MMA, ammonium, potassium, sodium, barium, strontium, magnesium, calcium, manganese, zinc, lead, aluminum, and iron cations.

1.1.1 Detection modes

Since low-molecular-mass ions commonly lack suitable absorbance properties, which is the detection mode available for all commercial CE instruments, indirect UV detection has to be performed. A visualizing agent, named also chromophore, with adequate spectroscopic and electrophoretic properties is thus introduced into the background electrolyte (BGE) [181,182]. For explosive-related anion analysis, the chromophore must be an anion and most often chromate ion was selected for its proper spectroscopic properties and electrophoretic mobility in the range of the analyte one's [183-186]. 1,3,6-naphthalenetrisulfonic acid (NTS) was also

used [187]. For explosive-related cation analysis, imidazole [185,187,188], 4-methylbenzylamine (UV-Cat 1^{TM}) [184], chrysoidine [175], histidine [189], and pyridine [186] were cited in literature. The electrophoretic mobilities of those chromophores belong to the mobility range of the targeted compounds, precluding for highly asymmetrical peaks. The obtained limits of detection (LODs) are between 1 ppm and several hundreds of ppb.

Conductivity detection mode became within the last years a frequently used detection technique in CE methods [190,191]. This detection mode is the most universal for inorganic ions as the signal response is related to the equivalent conductivity of a solute. Analyte ions displace BGE co-ions during electrophoretic separations. Thus, the response arises from the difference in conductivity between analytes and BGE co-ions and, for optimum signal-to-noise ratio, a difference in the conductance of analyte and electrolyte as large as possible is required.

Conductivity detection in CE is performed in two modes, either with or without direct contact of the sensing electrodes with the BGE and the sample components. However, problems may arise from the direct contact of the separation electrolyte with the measuring electrode, such as electrode contamination by BGE additives or sample components. This is why the capacitively coupled contactless conductivity detection (CCD) is often preferred, especially as the recent improvements in the detector design and its electronic circuitry led to higher sensitivity and robustness, and also to its commercial release. CCD detection was thus performed for explosive-related ion analysis [189]. Low conductivity BGEs were used, such as morpholinoethanesulfonic acid (MES) and Tris mixture in the case of anions. LODs between some tens and some hundreds of ppt were obtained.

1.1.2 Separation strategies

Whatever the detection mode, all explosive-related ion analyses involved capillary zone electrophoresis (CZE) (Annexe A) , with a separation mechanism based on differences in ion apparent mobilities, combining electrophoretic and electroosmotic contributions. In 1992, Hargadon and Mc Cord published the first analysis of anionic inorganic explosive residues by CZE, investigated as a complementary technique to IC [183]. The BGE was composed of 2 mM borate and 40 mM boric acid for buffering at pH 8.7, 1.8 mM sodium dichromate (chromophore) and 1 mM diethylene triamine. UV indirect detection mode at 280 nm was mainly involved, but it is worthwhile to notice that direct detection at 205 nm was also performed for confirmation of the identity of nitrate, nitrite, and thiocyanate anions, due to their UV absorbance properties at this low wavelength. The separation of 7 inorganic anions was obtained in 6 min by CE instead of 20 min by IC, and the LODs were about 0.5 ppm in CE against 2 ppm in IC. Both techniques were successfully applied for the analysis of real

extracts, such as black powder. The orthogonal property of IC and CE was next clearly demonstrated and an example of its usefulness clearly appeared, as cyanate/thiocyanate and fluoride/phosphate anion pairs co-eluted in IC whereas they were resolved by CE [156]. Table I-II-1 details the methods published in the literature allowing the analysis of explosive-related anions by CE, highlighting the ionic mixture and matrix natures, BGE, detection mode, and LODs. .In all cases, the electroosmotic flow (EOF) was reversed for reducing the analysis time either by the presence of an EOF modifier in the separation electrolyte [183-185], such as diethylenetriamine, or by a pre-analysis modification of the capillary surface via the flush of a solution of hexadimethrine bromide [175,189]. Hutchinson et al. recently succeeded in determining 15 anions in less than 9 min, with LODs close to 1 ppm [184].

The explosive-related cation separation of ammonium, potassium, and MMA was highly challenging, because of their close electrophoretic mobilities. Doyle and Mc Cord succeeded first in separating these three cations by additions of both 18-crown-6 ether (18-C-6) and acetonitrile in a BGE composed of 2-hydroxyisobutiric acid (HIBA, complexing agent for alkaline earth and transition metal cations to improve their separation) and imidazole as chromophore [188]. 18-C-6 formed inclusion complexes with K^+, enabling it to be separated from NH_4^+, but next K^+ comigrated with MMA cation. The addition of 5% of acetonitrile in the BGE affected the equilibrium constant for the inclusion complex of K^+ and 18-C-6, allowing the selectivity adjustment to reach full separation of the three cations. Table I-II-1 presents the different studies involving analysis of explosive-related cations by CE.

As it appears in Table I-II-1, anion and cation determinations were usually performed with different BGEs, whereas both anion and cation analysis are required for characterizing the explosive, which was either costly or time-consuming and laborious. Also, simultaneous analysis of explosive-related anions and cations needed to be developed. One approach could be the use of ethylenediaminetetraacetic acid [192] or 2,6-pyridinedicarboxylic acid [193] to form anionic complexes with cations and thus simplified the analysis of anions and cations into a single anion analysis. Nevertheless, these well-known complexing agents were not relevant in the explosive field, because they did not form any complex with the targeted cations, such as ammonium, potassium or MMA. Another approach consisted in generating a high-magnitude EOF allowing the detection from the same injection end of some anions and cations, having both their apparent velocity directed to the detection end [194]. However, no chromophore was used, precluding the UV detection of numerous anions that could be solved by employing a conductivity detector. Another alternative is to simultaneously inject into both sides of a single capillary, named dual-opposite injection. This was used for the simultaneous analysis of anions and cations in explosive residues [187]. In this dual-opposite injection mode, a novel BGE was developed containing HIBA as the buffer, imidazole as cationic chromophore, 1,3,6-naphthalenesulfonic acid (NTS) as anionic chromophore, 18-C-6 as a cation selectivity modifier, and acetonitrile (5%) as an organic modifier. The pH was adjusted

at 6.5 using tetramethylammonium hydroxide, which is also an EOF modifier. Reversed polarity was used for separating the anions using the normal injection side (longer migration distance) because a wide variety of anions must be separated for explosive residue characterization.

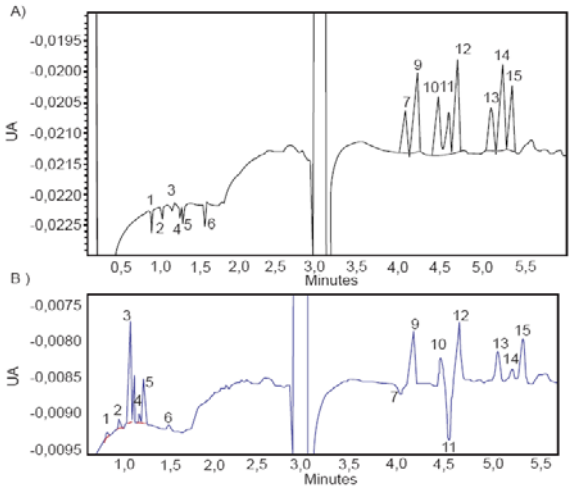


Figure I-II-12. CE separation of a 10 ppm cation and anion standard mixture in ultra-pure water at (A) 235 nm and (B) 208 nm. Bare fused-silica capillary, 50 µm I.D. x 40,2 cm (detection at 30 cm). BGE: 4 mM 18-C-6, 5% (v/v) acetonitrile, 15 mM HIBA, 3 mM NTS, and 6 mM imidazole adjusted at pH 6.5 with tetramethylammonium hydroxide. Separation voltage: 10 kV. Hydrodynamic injection, 50 mbar, 7 s (inlet) and 5 s (outlet). Peak assignment: 1, ammonium; 2, potassium; 3, sodium; 4, calcium; 5, magnesium; 6, strontium; 7, bromide; 9, chloride; 10, nitrite; 11, nitrate; 12, sulfate; 13, perchlorate; 14, thiocyanate; 15, chlorate. From [187].

The HIBA, imidazole, and NTS concentration and pH values were optimized in order to reach complete resolution in the same run of 6 cations and 9 anions in less than 6 min, as presented in Figure I-II-12. LODs ranged from 0.5 to 5 ppm for anions and from 10 to 15 ppm for cations.

All the methods for CE explosive-related anion and cation analysis published in literature presented good figures of merit, especially the relative standard deviations for migration times remaining less than 2% and for peak areas, always inferior to 5 or 10% over numerous successive runs. Various matrices were analyzed, such as powders, soils, metallic pieces, and water samples.

1.1.3 Mobile laboratory

The recent Bali bombings demonstrated that a "mobile laboratory" was the only effective and efficient way to process large numbers of samples and assist investigators with relevant information in a very short time [176]. Consequently, Hutchinson et al. developed protocols for CE separation of 15 anions in less than 9 min and 12 cations in less than 9.5 min [184]. A commercialized portable CE instrument was modified for use with a LED detector to enable sensitive indirect photometric detection. Indeed, LED provided a highly stable narrow-

spectrum, low-noise output, required low power, could be purchased quite cheaply, was small in size, and had very long lifetime in comparison with other light sources. LODs ranged from 0.2 to 1.2 ppm for anions and from 0.1 to 2.3 ppm for cations. Use of the portable instrumentation in the field was demonstrated by analyzing post-blast residues in a mobile laboratory immediately after detonation of the explosive devices. Complete profiling of the ionic composition of the residues allowed identification of the chemicals initially used. The same CE portable instrumentation approach was next evaluated with a contactless conductivity detection, which improved the LODs by a factor of 10 (cf. Table I-II-1) [189]. Low conductivity BGEs were used and 15 anions or 11 cations were analyzed in less than 7 min. A selection of 10 deemed most important anions could even be separated in 45 s on a short capillary (30.6 cm). The developed methods were successfully field tested for post-blast residues obtained from the control of homemade devices. The resulting electrophoregrams are shown in Figure I-II-13. Thus, CE is a highly relevant separation technique for inorganic explosive analysis, and its miniaturized and portable features are perfectly adapted for field analyses, which are necessary within the terrorism context, but may be also highly useful for forensic or environmental purposes.

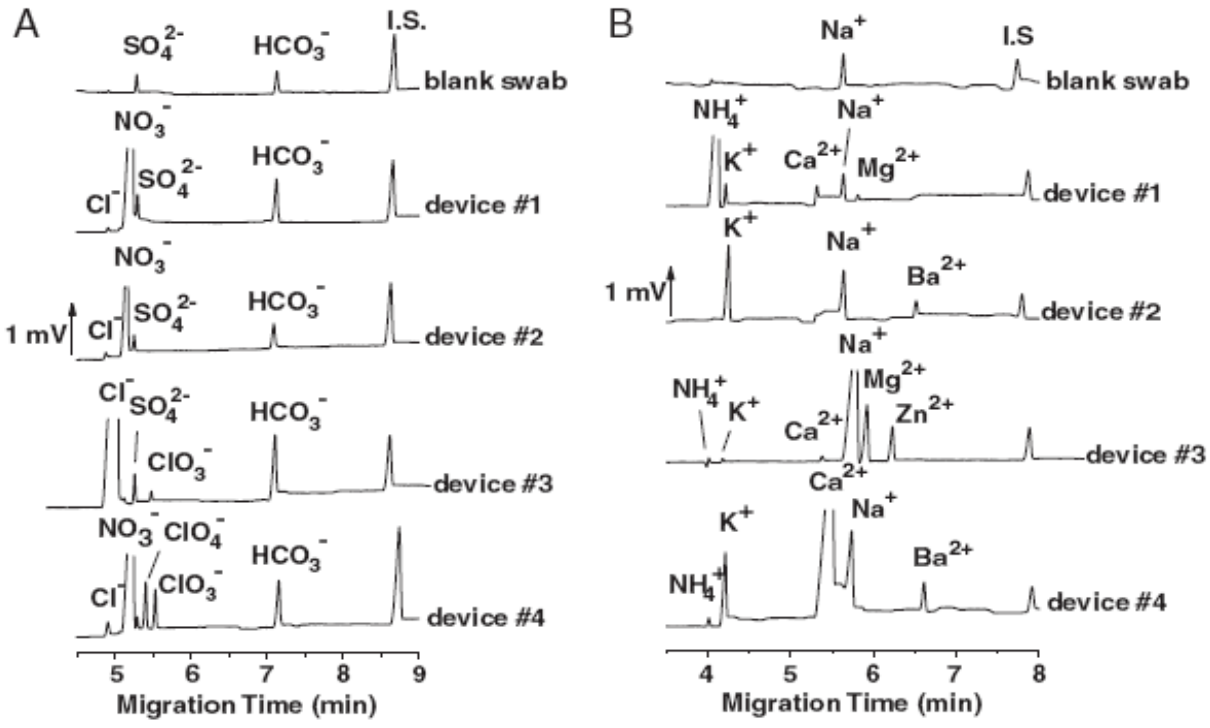


Figure I-II-13. Analysis by CE-CCD of (A) anions and (B) cations extracted from post-blast residues resulting from the detonation of four inorganic homemade explosive devices and present in blank swab. (A) Fused-silica capillary modified with hexadimethrine bromide, 75 µm I.D. x 90 cm (detection: 82 cm). BGE: 70 mM TRIS, 70 mM CHES, pH 8.6. Separation voltage: -25 kV. Hydrodynamic injection, 1 psi, 5 s. Internal Standard: hexanesulfonate. (B) Fused-silica capillary, 75 µm I.D. x 73 cm (detection: 65 cm). BGE: 10 mM His, 50 mM acetic acid, 1 mM HIBA, 0.7 mM 18-C-6, pH 4.2. Separation voltage: 25 kV. Hydrodynamic injection, 1 psi, 5 s. Internal Standard: benzylamine. From [189].

Table I-II-1: Separation of explosive-related ions by CZE.

Compounds	BGE	Detection	LOD (ppm)	Matrices	Ref.[a]
Anions					
Cl^-, NO_3^-, ClO_3^-, NO_2^-, SO_4^{2-}, SCN^-, ClO_4^-, Br^-	2 mM borate, 40 mM boric acid, 1.8 mM sodium dichromate, 1 mM DETA[b], pH 7.8	ind[c] UV 280 nm dir[d] UV 205 nm	1	pipe-bomb residues	[183]
Cl^-, ClO_3^-, NO_3^-, ClO_4^-	5 mM chromate, 5 mM Nice Pack (Waters)	ind UV 254 nm	N/A[e]	residues	[176]
Cl^-, NO_2^-, NO_3^-, SO_4^{2-}, ClO_4^-, SCN^-, ClO_3^-, OCN^-	2 mM borate, 40 mM boric acid, 18 mM sodium chromate, 1 mM DETA, pH 7.8	ind UV 280 nm	0.7-8.5	powder, residues	[185]
Cl^-, $S_2O_3^{2-}$, NO_2^-, NO_3^-, SO_4^{2-}, ClO_4^-, SCN^-, ClO_3^-, OCN^-, F^-, ClO^-, HPO_4^{2-}, HCO_3^-, CH_3COO^-, $C_6H_5COO^-$	10 mM CrO_3, 10 mM Na_2CrO_4, 40 mM Tris, pH 8.1	ind UV 370 nm	0.2-1.2	residues	[175]
Cl^-, $S_2O_3^{2-}$, NO_2^-, NO_3^-, SO_4^{2-}, ClO_4^-, SCN^-, ClO_3^-, OCN^-, F^-, ClO^-, HPO_4^{2-}, HCO_3^-, CH_3COO^-, $C_6H_5COO^-$	70 mM Tris, 70 mM CHES[f], pH 8.6	CCD	0.027-0.24	residues	[189]
ClO_3^-, ClO_4^-, NO_2^-, NO_3^-, SO_4^{2-}	2 mM tetraborate, 40 mM boric acid, 18 mM dichromate, pH 8.6 adjusted with TMAOH[n]	ind UV 254 nm	0.1-1.9	soil	[186]
Cations					
NH_4^+, Na^+	5 mM UVCat1, 6.5 mM HIBA, 2 mM 18-C-6	ind UV 214 nm	N/A	residues	[184]
K^+, NH_4^+, Ba^{2+}, MMA, Sr^{2+}, Na^+, Ca^{2+}, Al^{3+}, Mg^{2+}, Li^+, Co^{2+}, Zn^{2+}	6 mM imidazole, 17.5 mM HIBA, 4 mM 18-C-6, 5% ACN[g], pH 4.4	ind UV 215 nm	0.5	black powder, residues	[188]
NH_4^+, K^+, Na^+, Mg^{2+}	16 mM imidazole, 17.5 mM HIBA, 4 mM 18-C-6, pH 4.4	ind UV 215 nm	1-11	residues	[185]
MMA, NH_4^+, EA[h], K^+, Na^+, Ba^{2+}, Sr^{2+}, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}, Pb^{2+}	10 mM chrysoidine in MeOH[i], 0.7% glacial acetic acid	ind UV 470 nm	0.1-2.3	residues	[175]
MMA, NH_4^+, EA, K^+, Na^+, Ba^{2+}, Sr^{2+}, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}	10 mM histidine, 50 mM acetic acid, 1 mM HIBA, 0.7 mM 18-C-6, pH 4.2	CCD	0.031-0.240	residues	[189]
K^+, NH_4^+	10 mM pyridine, 3 mM 18-C-6, pH 4.5	ind UV 254 nm	0.1-0.3	soil	[186]
Simultaneous detection					
NH_4^+, K^+, Na^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Sr^{2+}, Br^-, Cl^-, NO_2^-, NO_3^-, SO_4^{2-}, ClO_4^-, ClO_3^-, SCN^-, CN^-	6 mM imidazole, 15 mM HIBA, 4 mM 18-C-6, 3 mM NTS, 5% ACN, pH 6.5 adjusted with TMAOH[j]	ind UV 235 nm (anions) 208 nm (cations)	10-15 (anions) 0.5-5 (cations)	residues	[187]

[a]ref: reference; [b]DETA: diethylene triamine; [c]ind: indirect; [d]dir: direct; [e]N/A: not available; [f]CHES: cyclohexylaminoethanesulfonate; [g]ACN: acetonitrile; [k]EA: ethylammonium; [i]MeOH: methanol; [j]TMAOH: tetramethylammonium hydroxide.

1.2. Analysis of organic explosives by CE

Even if the nitroaromatic, the nitramine, and the nitrate ester compounds are neutral compounds, capillary electrophoretic techniques have been demonstrated to be fully relevant for organic explosive analysis, as it appears in Table I-II-2.

1.2.1 Separation modes

Micellar electrokinetic chromatography (MEKC) involving the introduction of charged surfactants, most often sodium dodecylsulfate (SDS), above its critical micellar concentration (CMC) was extensively used for the separation of neutral compounds [195,196].

The partitioning of the neutral analytes between the micelles cavity and BGE, depending on both the analyte and micelle natures, allows their separation. Identification of organic explosive constituents by MEKC was presented for the first time by Northrop et al. in 1991 [197]. The effects of the SDS concentration, pH, addition of a tetraalkylammonium salt, capillary diameter, and injection time were studied. Figure I-II-14 presents the separation of 26 compounds in less than 10 min, with a borate buffer containing 25 mM SDS. Some compounds were not fully resolved, such as 3,4-DNT and 2-NT. The use of a phosphate buffer at pH 7 instead of the previous borate buffer at pH 8 allowed Oehrle to completely resolve 14 explosive compounds including 3-NT and 4-NT [198]. This electrolyte was used for the analysis of high-explosives, such as C-4, and detonating cord [198], but also various waste water samples generated from an ammunition plant [199]. LODs about 1 ppm were obtained.

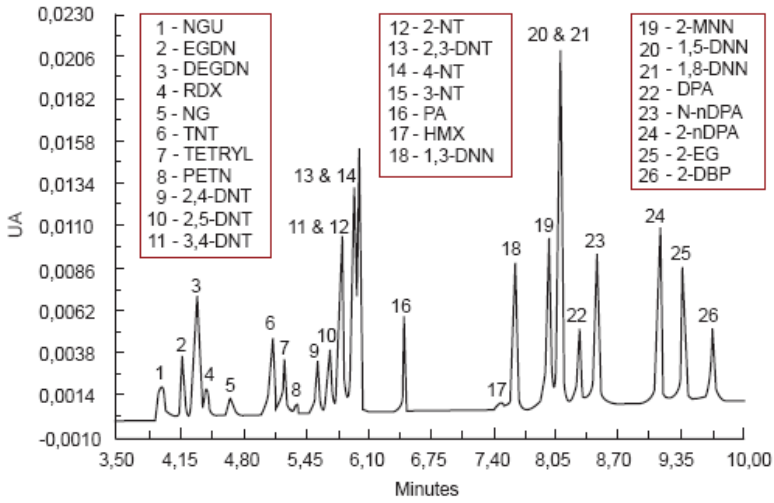


Figure I-II-14. MEKC separation of 26 gunshot and high-explosive constituents. Fused-silica capillary, 100 µm I.D. x 67 cm (detection: 62 cm). BGE: 2.5 mM borate, 25 mM SDS. Separation voltage: 20 kV. Electrokinetic injection: 5 kV, 2 s. UV detection at 220 nm. From [197].

MEKC was compared to HPLC for the determination of explosive residues in real extract, and more especially in soils [200-201]. MEKC offered high resolution, allowing for fingerprinting of complex soil extracts, was fast and cost-effective, and generated little organic waste compared to HPLC. Small sample sizes were easily handled, and LODs were close to those obtained by HPLC. In addition, MEKC provided easy removal of interfering humic substances extracted from complex soil matrices, because they were highly retained by micelles and migrated at the very end of the electrophoregram. Other environmental real matrices were then analyzed by MEKC for the determination of high-explosive compounds and their degradation products, allowing the determination of their degradation patterns and environmental fates [43,199,202].

Numerous experimental parameters affect MEKC separations and a large number of experiments may be required to reach the optimum experimental conditions. For this purpose, multivariate approach and artificial neural networks were employed by Casamento et al. for the optimization of the separation of 12 explosives by MEKC [203].

The use of cyclodextrins (CDs) alone or mixed with SDS was also evaluated in order to improve selectivity. The CDs form inclusion complexes with the analytes, exhibiting different stability constants according to the explosive molecule and leading to different selectivities for the explosives compared to SDS. Luong and Guo involved a mixed pseudo-stationary phase combining SDS and negatively charged sulfobutyl ether-β-CD (SB-β-CD) to obtain a satisfactory separation of positional isomers of some nitroaromatic compounds [204]. Groom et al. used SB-β-CD alone (without SDS) to rapidly resolve CL-20, HMX, and RDX plus their related degradation intermediates in environmental samples with UV detection [205] or MS [206].

Another electrokinetic separation technique well adapted to the separation of neutral compounds is capillary electrochromatography (CEC). CEC can be viewed as a hybrid technique between HPLC and CE where a solid stationary phase is present in the capillary and a mobile phase is driven through this stationary phase using EOF. Neutral species are separated on the basis of differential partitioning between the mobile and stationary phases. Bailey and Yan were the first ones to involve CEC for the separation of explosive compounds [207]. A separation with baseline resolution was achieved for 14 nitroaromatic and nitramine explosives (the US EPA standard mixture) in under 7 min with efficiencies over 500 000 theoretical plates/m. They also developed a fast CEC separation of these compounds in less than 2 min with a very short column, 12 cm, packed with non porous 1.5 µm C18-bonded particles and a hydro-organic mobile phase. Next, Bailey and Wallenborg for the first time developed the hyphenation of a CEC separation with indirect laser-induced fluorescence (LIF) detection and applied it for the complete separation of the US EPA standard mixture (cf. Figure I-II-15) [208].

Monolithic stationary phases may advantageously replace particle-based stationary phases for CEC applications, as columns in the capillary format are easily prepared by in situ synthesis and do not any more require the presence of frits, which are often sources of troubles. CEC of explosive mixtures using sol-gels prepared from methyltrimethoxysilane was evaluated [209]. It was observed that CEC was not as powerful as MEKC in terms of resolving power but allows for extended injection times for concentrating analytes contained in seawater at the top of the separation column. LODs below 100 ppb were reached.

1.2.2 Detection modes

Aromatic explosives possess a chromophore moiety allowing their direct UV detection, which is most often satisfactory. Nevertheless, due to the short optical path length in CE compared to HPLC, the LODs are around some ppm in CE, whereas it is rather some ppb in HPLC [80]. When more sensitivity is required, it is possible to select a capillary with a wider internal diameter, but this solution is limited by Joule effect. The capillary may also be replaced by one fitted with an extended path length, i. e. the inner diameter is increased only at the detection window, offering the sensitivity of a wider inner diameter capillary and the low current generation of a narrow one [203]. However, sensitivity may be improved likewise by only a factor between 3 and 5. A Z-shape detection cell may also be connected, allowing a gain of about 10, but it has not been exploited yet for the detection of explosives.

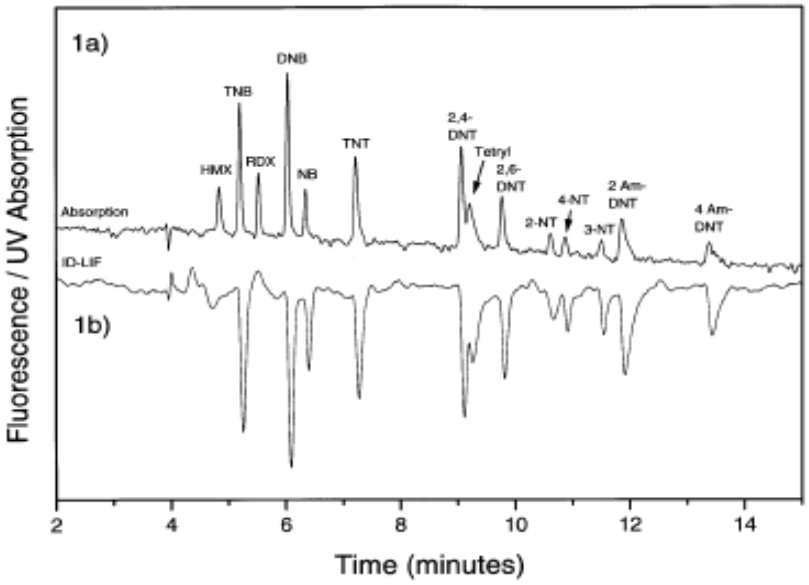


Figure I-II-15. CEC separation of US EPA 8330 standard mixture with tandem UV absorption and indirect laser induced detection. Fused-silica capillary, 75 µm x 44 cm, 30 cm of which was packed with 1.5 µm non-porous C18-bonded particles. Mobile phase, 20% methanol and 80% 10 mM MES, 5 mM SDS and 5 µM Cy-5 (v/v). Separation voltage, 15 kV. Electrokinetic injection, 1 s at 8 kV of a 20 mg L^{-1} (each component) sample. UV detection at 254 nm. Fluorescence detection excitation, 635 nm. From [208].

To solve the potential problem of low concentration sensitivity in CE, several techniques have been developed. One approach consists in on-line sample preconcentration, which can be easily performed in CE without any modification of the apparatus and keeping automation of the system. Yang et al. developed an on-line sweeping preconcentration step (picking and accumulating analytes by a pseudo phase passing through the large sample zone during voltage application) coupled to a MEKC separation for the determination of the US EPA mixture compounds in soil extracts [210]. LODs were improved down to as low as 3.1-6.5 ppb. Another approach is the use of high sensitivity detectors such as LIF, in a direct or indirect mode [207]. Kennedy et al. developed for the first time LIF detection for explosives [211]. As indirect detection was used, a fluorophore (fluoresceine, eosin, anthracene, or rhodamine B) was added to the MEKC buffer system,. The mechanism by which the analytes were detected is based on the fact that analytes perturb the partitioning of the fluorophore between the aqueous and micellar phases, knowing that one of the properties of the micelles is their ability to alter the fluorescence quantum yields.

Electrochemical (EC) detectors, which promise high sensitivity, simplicity, and low cost, have been also coupled with CE to detect explosives, since nitroaromatic ones are known to exhibit well-defined redox behavior. Indeed, these compounds such as TNT are readily reduced at various electrodes. Reduction of nitrotoluene occurs in a single four-electron step to form hydroxylamines, which is followed by a two-electron reduction to corresponding amine. The MEKC separation followed by amperometric detection was used to determine the explosive content of soil extracts and groundwater [212]. The electrochemical reactivity of TNT and analogs, and thus performance of the working electrode is strongly influenced by the type of electrode. Authors evaluated platinum, nickel, silver, gold, and silver-plated gold working electrodes [212]. Preliminary results eliminated platinum and nickel electrodes options because of their rapid fouling. Then, it appeared that the use of gold electrode could be problematic since its response to acetonitrile, the sample solvent used in the study, was significant. Best results were finally obtained with a silver-plated gold electrode and LODs of about one hundred ppb were reached for 13 explosives. The response signal is also strongly influenced by the electrode position. Here, precise alignment was not necessary due to the large diameter of the detecting electrode in comparison with that of the separation capillary. Amperometric detection was also coupled to CEC separation of explosives for their successful determination in environmental samples [213].

It is worthy of note that LIF and EC detection modes are characterized not only by a high sensitivity but also by a high selectivity which provides high suitability for the analysis of explosives at trace-levels in complex matrices. As an example, in soil extracts and groundwater, a majority of potential interferents such as humic acids are neither fluorescent nor electroactive.

Finally, CE can be hyphenated with MS to combine the excellent separation capabilities of CE and the sensitivity of MS associated with its power in analyte identification for structure elucidation or additional selectivity [214-216]. Groom et al. used a CE-MS system for the analysis of explosives in environmental samples and offered potential for the identification of highly polar or charged degradation products [206]. CDs were added in the CE buffer to allow the separation of the explosive compounds and the potential effect of the presence of CD on analyte mass spectra was study. The CD concentration was optimized such as the nature of the sheath liquid flow. Soils from an ammunition manufacturing site and contaminated marine sediments were next analyzed leading to LODs of 25 ppb for 6 explosive compounds.

2. Analysis of explosives in electrophoretic microsystems

CE microchip systems are of considerable recent interest owing to their high degree of integration, portability, minimal solvent and reagent consumption, speed, cheapness, consistency with multidimensional separations, disposability. These micro total analytical systems hold great promise for biomedical and pharmaceutical analysis, but also for environmental monitoring and forensic investigations in the explosive field. For explosive separation protocols on chip, all the developments were first performed in the capillary format and then transferred to the chip format. Thus, what mainly characterizes the state of the art of CE chip for explosive analysis is either the difficulty to transfer the capillary separation methods to a shorter separation length or the technical development of chip, such as the hyphenation of the separation step with the detection one, the miniaturization of the detection step or the introduction of macro-world sample to microfabricated separation devices without manual intervention. Chips involved in explosive analysis are generally made of glass. Cross-injector design was mainly involved, even if some authors also evaluated offset double-T design for increasing the injected volume [217]. It is worthy of note that the development of the methods for the separation of explosive compounds on chip has completely followed and sometimes even induced instrumental or conceptual evolutions with time, rendering the literature about the chip analysis of explosives rich and highly relevant. As an example, a newly designed CE chip with a simple and efficient sample introduction interface was described and its performance was demonstrated with the MEKC analysis of three explosives (TNT, TNB, and DNB) [218]. The idea consisted in fabricating a chip with a sharp inlet shape that can penetrate into a vial of either the sample solution or BGE (Figure I-II-16A). It led to reproducible and simple introduction of multiple discrete samples without memory effects, complex channel layouts, and numerous voltage controls.

Table I-II-2: Separation of nitrated explosives by CE.

Compounds	Separation mode	BGE	Detection	LOD (ppm)	Matrices	Ref.[a]
DBP, DEDPU, DEGDN, 1,3-DNN, 1,5-DNN, 1,8-DNN, 2,3-DNT, 2,4-DNT, 2,6-DNT, 3,4-DNT, DPA, EGDN, HMX, 2-nDPA, N-nDPA, NG, NGU, 2-NN, 2-NT, 3-NT, 4-NT, PA, PETN, RDX, Tetryl, TNT	MEKC	2.5 mM borate, 25 mM SDS, pH 7.8-8.9	UV (220 nm)	0.1-1	plastic explosives	[197]
4-ADNT, DNB, 2,6-DNT, HMX, NB, 2-NT, 4-NT, RDX, Tetryl, TNB, TNT	MEKC	2.5 mM borate, 12.5 mM boric acid, 25 mM SDS, pH 8.5	UV (230 nm)	100-10000	soils	[201]
EGDN, HMX, NG, NGU, PETN, RDX, Tetryl, TNT	MEKC	2.5 mM borate, 25 mM SDS, 1 µM fluoresceine, pH 8.5	LIF (488 nm)	10-40	N/A[b]	[211]
DNB, 2,4-DNT, 2,6-DNT, HMX, NB, NG, 2-NT, 3-NT, 4-NT, PETN, RDX, Tetryl, TNB, TNT	MEKC	25 mM phosphate, 50 mM SDS, pH 7	UV (254 nm)	0.31-1.42	detonating cord, explosives	[198]
2-ADNT, 4-ADNT, DNB, 2,4-DNT, 2,6-DNT, HMX, NB, 2-NT, 3-NT, 4-NT,RDX, Tetryl, TNB, TNT	MEKC	25 mM phosphate, 50 mM SDS, pH 7	UV (254 nm)	N/A	water	[199]
1,4-DNB, 1,2-DNB, 1,3-DNB, 2,3-DNT, 2,4-DNT, 2,6-DNT, 3,4-DNT, 2-NT, 3-NT, 4-NT	MEKC	10 mM SB-β-CD, 30 mM SDS, 20 mM borate pH 9, 10% ACN[c]	UV (214 nm)	N/A	N/A	[204]
2-ADNT, 4-ADNT, 1,4-DNB, 1,2-DNB, 2,4-DNT, 2,6-DNT, 3-NT, 3,4-DNT, 2,3-DNT, HMX, NB, RDX, TNT	MEKC	15 mM borate, 25 mM SDS, pH 8.7	EC (Ag/Au)	0.07-0.11	soil, water	[212]
2-ADNT, 4-ADNT, 2,6-DANT, 2,4-DANT, 2-HADNT, 4-HADNT, TAT, TNT	MEKC	2.5 mM borate, 12.5 mM boric acid, 50 mM SDS, pH 8.5	UV (225 nm)	0.1-0.2	sludge	[200]
HMX, MNX	MEKC	2.5 mM borate, 12.5 mM boric acid, SDS 50 mM, pH 8.5	UV (230 nm)	N/A	soil, plant	[201]
HMX	MEKC	2.5 mM borate, 12.5 mM boric acid, 50 mM SDS, pH 8.5	UV (230 nm)	N/A	soil, plant	[43]

Table I-II-2 *(continued)*

Compounds	Separation mode	BGE	Detection	LOD (ppm)	Matrices	Ref.[a]
2-ADNT, 4-ADNT, 1,3-DNB, 2,4-DNT, 2,6-DNT, HMX, NB, 2-NT, 4-NT, 3-NT, RDX, Tetryl, 1,3,5-TNB, TNT	MEKC	10 mM borate, 55 mM SDS or 80 mM cholate	UV (254 nm)	0.2-0.8	seawater	[209]
	CEC	10 mM Tris, 45% ACN	UV (254 nm)	0.1	seawater	
2-ADNT, 4-ADNT, 1,3-DNB, 2,4-DNT, 2,6-DNT, HMX, NB, 2-NT, 3-NT, 4-NT, RDX, Tetryl, 1,3,5-TNB, TNT	MEKC	7.5 mM NaH_2PO_4, 7.5 mM H_3PO_4, 150 mM SDS in water/MeOH[d]/ACN (7:2:1, v/v)	UV (210 nm)	0.003-0.006	soil	[210]
CL20, HMX, MDNA, MNX, RDX	CD-EKC[e]	0,1 mM acetate buffer, 10 mM SB-β-CD, pH 5	UV (230 nm)	0.2	N/A	[205]
CL20, HMX, RDX, TNB, TNT	CD-EKC	10 mM acetate buffer, 10 mM SB-β-CD, pH 6.9	MS	0.025-0.5	soil, sediment	[206]
2-ADNT, 4-ADNT, DNB, 2,4-DNT, 2,6-DNT, HMX, NB, 2-NT, 3-NT, 4-NT, RDX, Tetryl, TNB, TNT	CEC	15% MeOH, 85% 10 mM MES with 5 mM SDS	UV (254 nm)	N/A	N/A	[207]
4-ADNT, 2-ADNT, DNB, 2,6-DNT, 2,3-DNT, HMX, NB, 2-NT, 4-NT, 3-NT, RDX, TNB, TNT	CEC	30% MeOH, 70% 10 mM MES with 7 mM SDS	EC (Au)	0.07-0.11	soil, water	[213]
2-ADNT, 4-ADNT, DNB, 2,4-DNT, 2,6-DNT, HMX, NB, 2-NT, 4-NT, 3-NT, RDX, Tetryl, TNB, TNT	CEC	20% MeOH, 80 % 10 mM MES with 5 mM SDS and 5 µM Cy-5	LIF (635 nm)	1-10	N/A	[208]

[a]ref.: reference; [b]N/A: Not available; [c]ACN: acetonitrile; [d]MeOH: methanol; [e]CD-EKC : cyclodextrin-based electrokinetic chromatography.

This idea was next extended to achieve the direct coupling of hydrodynamically flowing stream to a CE chip for continuous assays, and thus, monitoring explosives [219]. It was achieved with two sharp inlets as presented in Figure I-II-16B. With a sample having a hydrodynamic flow-rate in the range 0.2-1.8 ml min^{-1}, a long sequence of 40 consecutive measurements was carried out over a total time of 125 min and gave relative standard deviations inferior to 4% for the current response and migration time.

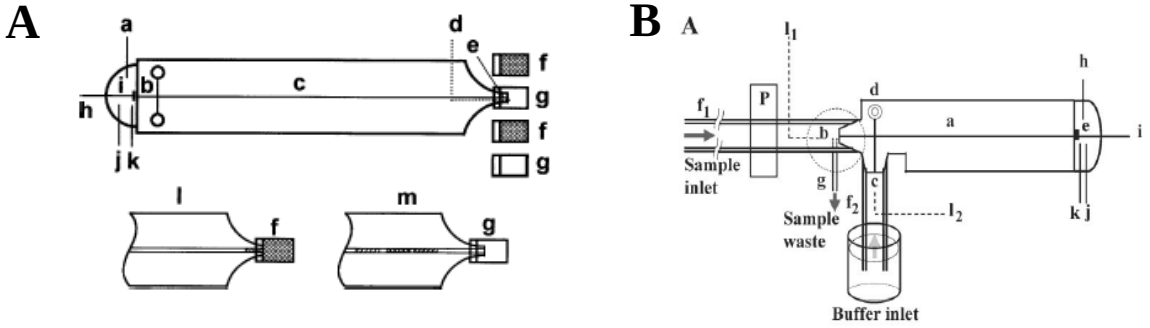


Figure I-II-16. Schematic diagram of the sharp CE chip for (A) simplified sample introduction and (B) on-line continuous monitoring capability. (A) The separation channel (c) is connected to a sharp inlet tip (e) and a detection cell (i). The sample or running buffer is introduced by placing the sharp inlet into a vial of either the sample solution (f) or BGE (g). The detection cell (i) comprised a Pt wire grounding electrode (a), screen-printed carbon working electrode (h), Pt wire auxiliary electrode (j), and the Ag/AgCl wire reference electrode (k). A Pt wire (d) serves as contact to high voltage power supply. From [218]. (B) The separation channel (a) is connected to a sharp inlet tip (b), a side sharp BGE inlet tip (c), unused reservoir (d) and a detector compartment (e). The sample is introduced by pumping with a peristaltic pump (P) from the reservoir through the tubing (f_1) to the separation channel. The sample solution is drained through a plastic tubing (g) that is placed 1 mm from the sample inlet tip. The BGE is introduced by capillary action through the plastic tubing (f_2). The detection cell (i) comprised a Pt wire grounding electrode (h), a screen-printed carbon working electrode (i), a Pt wire auxiliary electrode (k), and the Ag/AgCl wire reference electrode (j). Two Pt wires are inserted into the plastic tubings (f_1, f_2), respectively, serving as contacts to high voltage power supply. From [219].

2.1 Analysis of inorganic explosives in electrophoretic Microsystems

The analysis of ionic explosives by chip electrophoresis has received much less attention than the nitroaromatic ones, and only one group worked on the development of chip electrophoresis for low-energy explosives [220-224] (Table I-II-3). Nevertheless, a very significant work was performed. An original and miniaturized CCD was described by Pumera et al. [220]. The contactless approach allows the direct detection of ionic solutes and precludes problems associated with the electrode-solution contact (fouling, unwanted reactions), offers isolation of the detection system from the high separation fields, does not compromise the separation efficiency, and simplifies the detector fabrication. Indeed, two planar sensing aluminum film electrodes were placed on the outer surface of a chip and the impedance of the solution in the separation channel was then measured. This design was applied to the analysis of cationic and anionic explosives pertaining to pre- or post-explosion mixtures [221]. The low EOF generated in polymethylmethacrylate channels made it easier the rapid switching between cationic and anionic analyses within the same channel and using the same BGE, without any EOF modifier.

The CCD arrangement was next improved by moving the detector along the separation channel via sliding the electrode holder [222]. Placing the detector at different locations along the channel offered insights into the separation process and may help in optimizing resolution/channel length/separation voltage parameters. The system also enabled rapid

switching between total (fast screening) or individual (fingerprinting) signals while placing the detector at the channel inlet or outlet. The analysis time can also be decreased by changing the detector position during the analysis, after the detection of the first fast migrating ions. These improvements were illustrated with some low-energy ionic explosives. CCD detection was also used for the simultaneous measurement of six low-energy explosive-related anions and cations [223]. Dual electrokinetic injection from both ends of the separation channel was performed, thanks to the presence of injection crosses on both extremities of the chip. Since the EOF of the PMMA channel is low, anions and cations moved in opposite directions in the separation channel upon applying electric field and were detected by the CCD placed around the middle of the separation channel.

Recently, Wang et al. reported for first time an end-column "hybrid" CCD for microchips [225]. It was based on a hybrid arrangement where the receiving electrode is insulated by a thin layer of insulator and placed in the bulk solution of the chip detection reservoir, whereas the emitting electrode is in contact with the solution flowing out from the channel in a wall-jet arrangement. A 10-fold sensitivity enhancement was obtained as compared with usual chip CCD arrangement for the detection of 3 explosive-related cations (ammonium, methylammoniun, and sodium) and the peak shapes were improved in comparison with the contactless mode. This approach would allow spatial integration with amperometric detection, allowing easy and sensitive simultaneous detection of inorganic and organic explosives, as will be described in more details later

2.2 Analysis of organic explosives in electrophoretic Microsystems

As previously pointed, neutral organic explosives are most often electrokinetically separated by MEKC- or CEC-based mechanisms. For MEKC separation, no developments were made on the electrolyte media in chips. Most authors used a borate buffer containing 15-50 mM SDS (Table I-II-3). Whereas MEKC separations developed in the capillary format can be easily transfered to chip format, this is slightly more complex for CEC analysis, where the stationary phase is used for both preconcentration and separation purposes. Giordano et al. synthetized a stationary phase directly in the channel by a sol-gel process using methyl-based precursors to yield a hydrophobic phase [226]. In order to keep the overall separation resolution obtained with the capillary format while transfering to the chip format with reduced separation length, the authors increased the hydrophobicity of the stationary phase by producing hybrid gels from metyl- and ethyl-trimethoxysilane precursors. It is worthwhile to notice that a simple Y configuration was used, rather than the traditional cross one, as the injection of a discrete plug of sample was not necessary because preconcentration was performed at the head of the stationary phase, precluding for the need of a sample waste reservoir.

For the first time in chip format, Pumera et al. evaluated an organically modified negatively-charged sol added to the BGE and acting as a pseudo-stationary phase for tuning selectivity, as the analyte mobilities were modified thanks to sol-solute interactions [227]. Indeed, the introduction of negatively-charged sol in a phosphate buffer allowed the separation of TNT and DNB. It is worthwhile to note that the presence of sols in the BGE did not alter the EC detection. The linearity and the precision of the response were satisfactory. A decrease in current intensity was observed in the presence of the sol, indicating lower diffusion coefficients in the sol-modified buffer. The sols were found to be stable for more than 6 months whereas the stability of micellar phases is limited, and a minimum surfactant concentration is not required in contrast to CMC thresholds.

Chips were also involved for immunoassay of TNT, in the direct, competitive, displacement or sandwich formats, immobilizing anti-TNT antibodies onto the surface of the chip [228]. Determinations of TNT were achieved with LODs between 1 and 20 ppb according the immunoassay formats. Another study extended the application to TNT analogues for measurement of binding and dissociation rate constants [229]. High-throughput immunoassays were next implemented thanks to a radial array electrophoretic chip comprising 96 channels [230].

As in capillary format, UV detection can be used in chips, especially with a deuterium lamp coupled to an optical fiber and a UV transmission microscope objective to collect the light at 254 nm [226]. The path length was increased to 100 µm by the design of a bubble cell on the chip, whereas injection and separation channels were etched to an approximate depth of 50 µm. Another study reported the spectrophotometric determination of three trinitroaromatic explosives (TNT, TNB, and tetryl) in the presence of ten other explosives and explosive derivatives by non-aqueous zone electrophoresis [231]. The electrolyte was composed of 2.5 mM NaOH in acetonitrile-methanol mixture (87.5/12.5, v/v), which reacted with the three trinitroaromatic compounds to form ionized red-colored derivatives that were detected using a green light emitting diode (LED) on the chip. All other explosives and degradation products were colorless throughout this wavelength range. The color formation seemed to be especially sensitive to trinitroaromatic compounds. Acetonitrile was selected as solvent as it promoted the chemical reaction with sodium hydroxide and methanol was added to increase the NaOH solubility in the medium. As conductivities are significantly lower in acetonitrile than in aqueous electrolytes, deeper channels could be employed (100 µm instead of 20 µm), permitting simple absorbance detection to be made with a LED. Some SDS (1 mM, i. e. below the CMC value) was also added to the electrolyte in order to improve the separation selectivity thanks to solvophobic interactions between the surfactant and analyte molecules. The applicability of the procedure was demonstrated with the off-line SPE and chip analysis of trinitroaromatic compounds dissolved at trace levels in seawater.

With electrophoretic chips, more sensitive detection modes, such as LIF or electrochemical detection, were also used. Even if LIF has dominated the detection in microchips, in the case of explosives, EC has received much more attention, thanks to the oxido-reductive properties of the nitroaromatic compounds [232]. Indeed, EC detection offers great advantages for chip systems such as high sensitivity, inherent miniaturization of both the detection and control instrumentations, and low cost. Therefore, the first paper published on CE chip dedicated to explosive analysis involved an electrochemical detection [233]. It combined a separation chip and a thick-film carbon strip, a planar screen-printed carbon line electrode mounted perpendicularly to the flow direction. Such coupling obviates the need for permanent attachment of the detector and allows easy and fast replacement of the working electrode, which can be particularly advantageous with applications that induce severe electrode fouling. Different carbon inks were evaluated, and the best one gave a LOD of about 0.06-0.2 ppm. An improvement in sensitivity was needed as in insulation between separation and detection electric field, because an increase in the electric field strength induced a decrease in migration times and peak heights, as expected, but also an increase in background noise, revealing incomplete insulation, which constitutes the bottle-neck of the hyphenation of CE separation and EC detection.

This chip was implemented in repetitive fast and total analysis for screening purposes of nitroaromatic explosives to provide a timely warning, and was able to switch to a separation mode when harmful compounds were individually detected for fingerprinting identification [234]. Switching between the screening and separation modes was accomplished by rapidly exchanging SDS-free for SDS-containing buffers in the separation channel, likewise switching from zone electrophoresis to MEKC mode. Even if this chip was not used with real samples, the paper demonstrated the ability to use a single-channel chip for both the individual and total explosive compound determination, with analysis rates of 30 and 360 per hour, respectively. The high specificity of EC detection was there a key point for preventing from false alarm. This thick-film detector design could also be used to perform linear-scan, square-wave, and adsorptive-stripping voltammetric protocols for determination of TNT [235]. The performance of the working electrode is strongly influenced by the electrode nature. A diamond electrode was evaluated and compared to the thick-film carbon arrangement used previously [236]. It offered some enhanced sensitivity, lower noise levels, and, moreover, improved resistance to surface fouling (negligible adsorption of organic compounds) and greater insulation from high separation voltages. Wang and Pumera also compared thick-film carbon, gold, and mercury/gold amalgam electrodes [237]. The thick-film carbon electrode resulted in a higher background signal, compared to the two other electrodes. Most favorable signal-to-noise ratios were observed on Hg/Au amalgam electrode. The Hg/Au electrode displayed linear response over 20-100 ppb range and a very low LOD of 7 ppb for TNT.

For the first time in chips, Hilmi and Luong carried out an electroless deposition procedure for fabricating gold electrodes just at the outlet of the separation channel to serve as working electrode [238]. They use this set-up for the separation and determination of 4 nitroaromatic compounds. This approach obviates the need for a coupling mechanism or tedious alignment procedures that is indeed often problematic, but this is not useful for applications that require frequent surface cleaning or electrode replacement due to severe surface fouling. This is why, rather than fixing or integrating the detector permanently to the chip, these authors also developed a specially designed detection cell allowing to remove the gold electrode from its sensing area just at the outlet of the separation channel [239]. Because of the large diameter of the detecting electrode (0.3 mm) as compared with the internal width of the separation channel (50 µm), good electrochemical efficiency was achieved without a precise alignment procedure. However, to ensure repeatable measurements, the distance between the electrode and the channel outlet must be controlled. This was performed by monitoring the detector background current before sample introduction. A new approach for the separation channel-electrode alignment was presented by Yao et al. [240]. It involved Plexiglas holders for housing the separation chip, and the detection reservoir was fitted with three electrodes allowing their convenient replacement and reproducible positioning.

Finally, Wang and Pumera combined both previously presented approaches for low- and high-explosives: they carried out the simultaneous electrophoretic analysis of nitroaromatic and cationic explosives, involving a chip with a dual detection system based on simultaneous conductivity and amperometric measurements [224]. The analysis of a mixture containing 4 nitroaromatic explosives (TNB, TNT, 2,4-DNT, and 2-ADNT) and the explosive-related ammonium, methylammonium, and sodium ions was performed in less than 2 min (Figure I-II-17), which offers great promise for obtaining the desired forensic information in a fast and simple manner. Therefore, the literature about the chip analysis of explosives is rich and highly relevant.

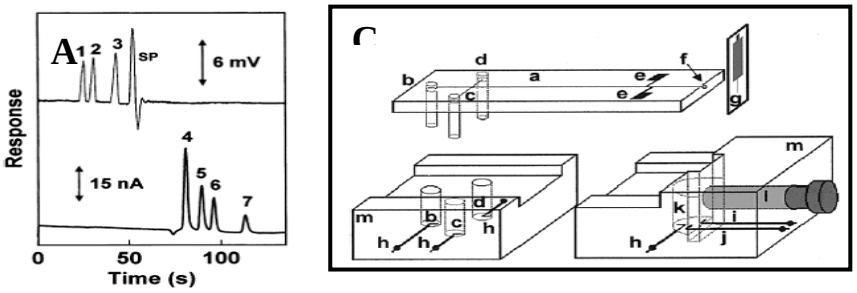


Figure I-II-17. Electrophoregrams showing the simultaneous measurement of low- and high-energy explosives, as recorded with conductivity (A) and amperometric (B) detectors. BGE: MES/His buffer (20 mM, pH 6.1) containing 15 mM LiDS. 1, ammonium. 2, methylammonium. 3, sodium. 4, TNB. 5, TNT. 6, 2,4-DNT. 7, 2-ADNT. SP, system peak. Explosive concentration, 2 mM (1,2,3) and 15 ppm (4,5,6,7). (C) microchip system with a dual amperometric/conductivity detection system: (a) glass microchip, (b) run buffer reservoir, (c) sample reservoir, (d) unused reservoir, (e) aluminum electrodes for contactless conductivity detection, (f) channel outlet, (g) thick-film working electrode for amperometric detection, (h) high voltage power electrodes, (i) counterelectrode, (j) reference electrode, (k) outlet reservoir, (l) plastic screw, (m) Plexiglas holder. From [224].

Table I-II-3: Analysis of explosives by chip electrophoresis.

Compounds	Separation mode	BGE	Detection	LOD (ppb)	Analysis time (s)	Ref.[b]
Explosive related ions						
K^+, Na^+, Ba^{2+}, Li^+; Cl^-, SO_4^{2-}, F^-, CH_3COO^-, PO_4^{3-}	CZE	20 mM histidine, 20 mM MES, pH 6.1	CCD	100-250	40; 100	[220]
K^+, NH_4^+, Na^+, MMA; NO_3^-, Cl^-, ClO_4^-	CZE	20 mM histidine, 20 mM MES, 7.5 mM 18-C-6, pH 6.1	CCD	10	25 (each)	[221]
K^+, NH_4^+, Na^+, MMA; NO_3^-, Cl^-, ClO_4^- (simultaneously)	CZE	20 mM histidine, 20 mM MES, pH 6.1	CCD	N/A[p]	60	[222]
NH_4^+, Na^+, MMA, NO_3^-, Cl^-, ClO_4^- (simultaneously)	CZE	20 mM histidine, MES 20 mM, pH 6.1	CCD	1500	60	[223]
Organic explosives						
DNB, 2,4-DNT, 2,6-DNT, 4-NT, TNT	MEKC	15 mM borate, 25 mM SDS, pH 8.7	EC (carbon)	600-2000	210	[233]
2,4-DNT, 2,6-DNT, 2,3-DNT, RDX, TNT	MEKC	15 mM borate, 25 mM SDS, pH 8.7	EC (Au)	110-200	400	[239]
2-ADNT, 4-ADNT, DNB, 2,4-DNT, 2,6-DNT, HMX, NB, NT, RDX, tetryl, TNB, TNT	MEKC	50 mM borate, 50 mM SDS, 5 µM Cy7, pH 8.5	Indirect LIF	1000	60	[217]
2,4-DNT, 2,6-DNT, 2,3-DNT, TNT	MEKC	15 mM borate, 25 mM SDS or 25 mM MES, pH 8.7	EC (Au)	24-36	130	[238]
2-ADNT, 4-ADNT, DNB, 2,4-DNT, TNB, TNT	MEKC	15 mM borate, 20 mM SDS, pH 9.2	EC (carbon)	60	150	[234]
Tetryl, TNB, TNT	NACE[c]	ACN[d] – MeOH[e] (87.5/12.5), 2.5 mM NaOH, 1 mM SDS	UV 505 nm	60-220 or 0.19-0.34 (SPE)	20	[231]
1,3-DNB, 2,4-DNT, TNT,	MEKC	15 mM borate, 15 mM SDS, pH 9.2	EC (diamond)	70-110	45	[236]
DNT, TNB, TNT	MEKC	15 mM borate, 15 mM SDS, pH 9.2	EC (carbon)	450-800	140	[218]
DNB, TNB, TNT	MEKC	15 mM borate, 15 mM SDS, pH 9.2	EC (carbon)	N/A	170	[219]
TNT	CZE	15 mM borate, pH 9.2	EC (Au, Hg/Au, carbone)	7	24	[237]
TNT	CZE	10 mM borate, pH 10.5	EC	10000	N/A	[235]
2,4-DNT, NB, 4-NT TNT	MEKC	15 mM borate, 15 mM SDS, pH 9.2	EC (carbon)	12-52	120	[240]

Table I-II-3 *(continued)*

Compounds	Separation mode	BGE	Detection	LOD (ppb)	Analysis time (s)	Ref.[b]
1,3-DNB, 2,4-DNP, 2,4-DNT, PA, TNB, TNT	IA[f]	phosphate buffer, pH 7.6	LIF	1	50	[229]
TNT	IA	acetate buffer, Tris, EDTA, pH 8.2	LIF	1	55	[230]
DNB, 2,4-DNT, 3-NT, RDX, 1,3,5-TNB, TNT	CEC	20 mM Tris, 40% ACN, pH 10	UV 254 nm	N/A	150	[226]
DNB, TNT	sol in BGE	40 mM phosphate, 13% MeOH, 175 mM TETT[g]-based sol, pH 10.1	EC	120	650	[227]
Inorganic and organic explosives						
MMA, NH_4^+, Na^+, TNB, TNT, 2,4-DNT, 2-ADNT	CZE / MEKC	20 mM histidine, 20 mM MES, 15 mM LiDS, pH 6.1	CCD + EC (carbon)	10	120	[224]

[a]ref: reference; [b]N/A: not available; [c]NACE: non-aqueous capillary electrophoresis; [d]ACN: acetonitrile; [e]MeOH: methanol; [f]IA: immunoassay; [g]TETT: N-(trimethoxysilylpropyl)ethylenediamine triacetic acid.

Conclusion

This review is intended to illustrate that electrophoretic techniques are perfectly well-adapted for explosive determination, in a capillary or chip format. The development of the methods for the separation of explosive compounds has completely followed the instrumental evolutions of electrophoretic techniques with time. Indeed, depending on the nature of explosives, ionized or neutral compounds are concerned, requiring CZE, MEKC or CEC-based separation mechanisms, and the environmental or terrorist context has created a recurrent demand for up-to-date electrophoretic methods. No doubt that this evolution will keep on going.

Currently, one of the targeted key points is a "mobile laboratory" where miniaturization is highly required and the question is: chip or capillary format? It seems that a capillary approach has outstanding advantages, including simplicity, ease of capillary replacement and low cost. It involves most often very short capillaries (< 10 cm) mounted on platforms that form devices often similar to microfluidic chips that allow integration with other functional parts such as injection and detection [241]. Therefore, all the new technologies developed in one given field (chips, portable CE, and even sensors [242]) may keep on going to improve electrophoretic approaches of explosive analysis for environmental or forensic purposes.

4. Conclusion

Compte tenu de la très grande variété des composés susceptibles d'être retrouvés après une explosion, il est très difficile de limiter le nombre de techniques analytiques nécessaires pour analyser chaque résidu. La détection des composés organiques peut être réalisée grâce à la chromatographie en phase gazeuse pour les plus volatils ou plus communément par chromatographie en phase liquide. La détection par spectrométrie de masse a connu un essor très important dans le domaine de la recherche d'explosifs et paraît aujourd'hui totalement incontournable. Afin d'orienter l'analyste vers les techniques les plus à même à répondre à son problème, une analyse par chromatographie sur couche mince est souvent employée.
Les composés inorganiques peuvent, eux, être analysés conjointement par la chromatographie ionique et l'électrophorèse capillaire
Cette synthèse démontre que les différentes méthodes électrophorétiques (mises en œuvre avec des appareillages conventionnels) sont parfaitement appropriées à l'analyse d'explosifs inorganiques ou organiques. Les résultats présentés dans la littérature confirment bien que la CE est complémentaire de l'IC ou de l'HPLC. Les améliorations apportées au couplage CE-MS offrent de nouvelles perspectives pour l'analyse des molécules organiques.
Au cours de cette étude bibliographique, il est apparu que pour l'analyse en CE des ions inorganiques, aucune étude n'a été faite sur les potentiels effets de matrice, qui peuvent avoir un effet délétère sur l'étape de quantification (pourtant, les matrices sont de nature très variées et complexes dans ce domaine). De plus, certains ions caractéristiques des explosifs n'ont pas été intégrés dans les mélanges étudiés jusqu'ici, tel que l'anion azoture. Ainsi, l'un des premiers objectifs de cette thèse sera de répondre à ces problématiques.
Enfin, les peroxydes n'ont pas été encore analysés en CE. Or, cela serait certainement possible en couplant à la fois une étape de dégradation dans le capillaire, par photoirradiation ou par hydrolyse chimique, des peroxydes sous formes d'eau oxygénée, qui peut ensuite être ensuite analysée en CE via une étape de complexation avec des ions borate. Ainsi, il apparaît que de nombreuses choses peuvent encore être faites en CE dans le domaine de l'analyse des explosifs.

5. Références

[1] Twibell J.D., Home J.M., Smalldon K.W., Higgs D.G., *J. Forensic Sci*., 27 (**1982**) 783.
[2] Warren D., Hiley R.W., Philipps S.A., Ritchie K., *Science & Justice*, 39 (**1999**) 11.
[3] Kolla P., Sprunkel A., *J. Forensic Sci*., 40 (**1995**) 406.
[4] Twibell J.D., Wright T., Sanger D.G., Bramley R.K., Lloyd J.B.F., Downs N.S., *J. Forensic Sci.*, 29 (**1984**) 277.
[5] Lloyd J.B.F., *J. Chromatogr. A*, 261 (**1983**) 391.
[6] Thompson R.Q., Fetterolf D.D., Miller M.L., Motherhead R.F., *J. Forensic Sci.*, 44 (**1999**) 795.
[7] Rudolph T.L., Bender E.C., *A scheme for the analysis of explosives and explosive residues*, Proceedings of the 3rd International Symposium on Analysis and Detection of Explosives, Mannheim-Neuostheim, **1989.**
[8] Garner D.D., Fultz M., Byall E.B., *J. Energ. Mater.*, 4 (**1986**) 133.
[9] Deak J.S., Clark H., Dagenais C., Jones S., McClure D., Richardson B.W., *Post-blast residue analysis in the RCMP laboratories : some pratical observation*, Proceedings of the 3rd International Symposium on Analysis and Detection of Explosives, Mannheim-Neuostheim, **1989**.
[10] Beveridge A.D., Greenlay W.R.A., Shaddick R.C., *Identification or reaction products in explosive residues*, Proceedings of the 1st International Symposium on Analysis and Detection of Explosives, Quantico, **1983**.
[11] Douse J.M.F., *J. Chromatogr. A*, 464 (**1989**) 178.
[12] Lloyd J.B.F., *J. Chromatogr. A*, 328 (**1985**) 145.
[13] Sigman M.E., Ma C.-Y., Ilgner R.H., *Anal. Chem*., 73 (**2001**) 792.
[14] Sigman M.E., Ma C.-Y., *Anal. Chem*., 71 (**1999**) 4119.
[15] Sanchez C., Carlsson H., Colmsjo A., Crescenzi C., Battle R., *Anal. Chem*., 75 (**2003**) 4639.
[16] Battle R., Carlsson H., Holmgren E., Colmsjo A., Crescenzi C., *J. Chromatogr. A*, 963 (**2002**) 73.
[17] Battle R., Carlsson H., Tollbäck P., Colmsjo A., Crescenzi C., *Anal. Chem*., 75 (**2003**) 3137.
[18] Furton K.G., Almirall J.R., Bi M., Wang J., Wu L., *J. Chromatogr. A*, 885 (**2000**) 419.
[19] Barshick S.A., Griest W.H., *Anal. Chem*., 70 (**1998**) 3015.
[20] Kirkbride K.P., Klass G., Pigou P.E., *J. Forensic Sci*, 43 (**1998**) 76.
[21] Calderara S., Gardebas D., Martinez F., *Forensic Sci. Int*., 137 (**2003**) 6.
[22] Monteil-Rivera F., Beaulieu C., Deschamps S., Paquet L., Hawari J., *J. Chromatogr. A*, 1048 (**2004**) 213.
[23] Wu L., Amirall J.R., Furton K.G., *J. High Resolut. Chromatogr.*, 22 (**1999**) 279.
[24] Harvey S.D., *J. Chromatogr. A*, 1213 (**2008**) 110.
[25] Furton K.G., Wu L., Almirall J.R., *J. Forensic Sci*., 45 (**2000**) 857.
[26] Perr J.M., Furton K.G., Almirall J.R., *J. Sep. Sci*., 28 (**2005**) 177.
[27] Lai H., Guerra P., Joshi M., Almirall J.R., *J. Sep. Sci*., 31 (**2008**) 402.
[28] Guerra P., Lai H., Almirall J.R., *J. Sep. Sci.*, 31 (**2008**) 2891.
[29] Lai H., Leung A., Magee M., Almirall J.R., *Anal. Bioanal. Chem*., 396 (**2010**) 2997.
[30] Muller D., Levy A., Shelef R., Abramovich-Bar S., Sonenfeld D., Tamiri, *J. Forensic Sci.*, 49 (**2004**) 935.
[31] Armitt D., Zimmermann P., Ellis-Steinborner S., *Rapid Commun. Mass Spectrom*., 22 (**2008**) 950.
[32] Kende A., Lebics F., Eke Z., Torkos K., *Microchim. Acta*, 163 (**2008**) 335.
[33] Schulte-Ladbeck R., Karst U., *Anal. Chim. Acta*, 482 (**2003**) 183.
[34] Lloyd J.B.F., King R.M., *J. Forensic Sci.*, 35 (**1990**) 956.
[35] Kolla P., *J. Forensic Sci*., 36 (**1991**) 1342.
[36] Harvey S.D., Fellows R.J., Cataldo D.A., Bean R.M., *J. Chromatogr. A*, 630 (**1993**) 167.
[37] Harvey S.D., Fellows R.J., Campbell J.A., Cataldo D.A., *J. Chromatogr. A*, 605 (**1992**) 227.
[38] Williford C.W., Bricka R.M., *J. Hazard. Mater*. 66 (**1999**) 1.
[39] Jenkins T.F., Grant C.L., *Anal. Chem*., 59 (**1987**) 1326.
[40] Walsh M.E., Ramsey C.A., Jenkins T.F., *Chemosphere*, 49 (*2002*) 1267.
[41] Larson S.L., Weiss C.A., Escalon B.L., Parker D., *Chemosphere*, 38 (**1999**) 2153.
[42] Hawari J., Paquet L., Zhou E., Halasz A., Zilber B., *Chemosphere*, 32 (**1996**) 1929.
[43] Halasz A., Groom C., Zhou E., Paquet L., Beaulieu C., Deschamps S., Corriveau A., Thiboutot S., Ampleman G., Dubois C., Hawari J., *J. Chromatogr. A*, 963 (**2002**) 411.
[44] Engelhardt H., Zapp J., Kolla P., *Chromatographia*, 32 (**1986**) 527.
[45] Martinez G., Ho C.H., Griest W.H., *Anal. Lett.*, 28 (**1995**) 1499.
[46] Zhang B., Pan X., Cobb G.P., Anderson T.A., *J. Chromatogr. B*, 824 (**2005**) 277.
[47] Pan X., Zhang B., Cobb G.P., *Talanta*, 67 (**2005**) 816.
[48] Pan X., Zhang B., Cox S.B., Anderson T.A., Cobb G.P., *J. Chromatogr. A*, 1107 (**2006**) 2.
[49] Campbell S., Ogoshi R., Uehara G., Li Q.X., *J. Chromatogr. Sci*., 41 (**2003**) 284.
[50] Ragnvaldsson D., Brochu S., Wingfors H., *J. Hazard. Mater*., 142 (**2007**) 418.
[51] Kjellström A., Brantlind M., Eldsäter C., Chemosphere, 71 (2008) 1701.

[52] Holmgren E., Carlsson H., Goede P., Crescenzi C., *J. Chromatogr. A*, 1099 (**2005**) 127.
[53] Feltes J., Levsen K., *J. Chromatogr.*, 518 (**1990**) 21.
[54] Leggett D.C., Jenkins T.F., Miyares P.H., *Anal. Chem.*, 62 (**1990**) 1355.
[55] Jenkins T.F., Miyares P.H., Myers K.F., McCormick E.F., Strong A.B., *Anal. Chim. Acta*, 289 (**1994**) 69.
[56] Babaee S., Beiraghi A., *Anal. Chim. Acta*, 662 (**2010**) 9.
[57] Pichon V., *Techniques de l'ingénieur*, (**2006**) 1420.
[58] Douse J.M.F., *J. Chromatogr. A*, 234 (**1982**) 415.
[59] Douse J.M.F., *J. Chromatogr. A*, 328 (**1985**) 155.
[60] Douse J.M.F., *J. Chromatogr. A*, 410 (**1987**) 181.
[61] Strobel R.A., Tontarski R.E., *Organic solvent extract of explosive debris: clean-up procedures using bonded phase sorbents*, Proceedings of the 1st International Symposium on Analysis and Detection of Explosives, Quantico, **1983.**
[62] Charles P.T., Dingle B.M., Van Bergen S., Geuger P.R., Patterson C.H., Kusterbeck A.W., *Field Anal. Chem. Technol.*, 5 (**2001**) 272.
[63] Lloyd J.B.F., *J. Chromatogr. A*, 330 (**1985**) 121.
[64] Godejohann M., Preiss A., Levsen K., Wollin K.M., Mügge C., *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, 26 (**1998**) 330.
[65] Astratov M., Preiss A., Levsen K., Wunsch G., *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, 167/168 (**1997**) 481.
[66] Tachon R., Pichon V., Barbe Le Borgne M., Minet J.J., *J. Chromatogr. A*, 1185 (**2008**) 1.
[67] Marple R.L., LaCourse W.R., *Talanta*, 66 (**2005**) 581.
[68] Bunte G., Hürttlen J., Pontius H., Hartlieb K., Krause H., *Anal. Chim. Acta*, 591 (**2007**) 49.
[69] Alizadeh T., Zare M., Ganjali M.R., Norouzi P., Tavana B., *Biosens. Bioelectron.*, 25 (**2010**) 1166.
[70] Roeseling D., Tuercke T., Krause H., Loebbecke S., *Org. Process. Res. Dev.*, 13 (**2009**) 1007.
[71] Bunte G., Heil M., Röseling D., Hürttlen J., Pontius H., Krause H., *Propell. Explos. Pyrotech.*, 34 (**2009**) 245.
[72] Xie C., Zhang Z., Wang D., Guan G., Gao D., Liu J., *Anal. Chem.*, 78 (*2006*) 8339.
[73] Gao D., Zhang Z., Wu M., Xie C., Guan G., Wang D., *J. Am. Chem. Soc.*, 129 (**2007**) 7859.
[74] Qu Y., Liu Y., Zhou T., Shi G., Jin L., *Chin. J. Chem.*, 27 (**2009**) 2043.
[75] Walker N.R., Linman M.J., Timmers M.M., Dean S.L., Burkett C.M., Lloyd J.A., Keelor J.D., Baughman B.M., Edmiston P.L., *Anal. Chim. Acta*, 593 (**2007**) 82.
[76] Xie C., Liu B., Wang Z., Gao D., Guan G., Zhang Z., *Anal. Chem.*, 80 (**2008**) 437.
[77] Edmiston P.L., Campbell D.P., Gottfried D.S., Baughman J., Timmers M.M., *Sens. Actuators B*, 143 (**2010**) 574.
[78] Lordel S., Chapuis-Hugon F., Eudes V., Pichon V., *J. Chromatogr. A*, 1217 (**2010**) 6674.
[79] Lordel S., Chapuis-Hugon F., Eudes V., Pichon V., *Anal. Bioanal. Chem.*, 399 (**2011**) 449.
[80] Gaurav D., Kumar Malik A., Rai P.K., *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 37 (**2007**) 227.
[81] Gaurav D., Kumar Malik A., Rai P.K., *J. Hazard. Mater.*, 172 (**2009**) 1652.
[82] Dalby O., Birkett J.W., *J. Chromatogr. A*, 1217 (**2010**) 7183.
[83] Guan W., Xu F., Liu W., Zhao J., Guan Y., *J. Chromatogr. A*, 1147 (**2007**) 59.
[84] Psillakis E., Kalogerakis N., *J. Chromatogr. A*, 907 (**2001**) 211.
[85] Psillakis E., Kalogerakis N., *J. Chromatogr. A*, 938 (**2001**) 113.
[86] Psillakis E., Mantzavinos D., Kalogerakis N., *Anal. Chim. Acta*, 501 (**2004**) 3.
[87] Pristera F., Halik M., Castelli A., Fredericks W., *Anal. Chem.*, 32 (**1960**) 495.
[88] Felt D.R., Larson S.L., Valente E.J., *Chemosphere*, 49 (**2002**) 287.
[89] Cheng C., Kirkbridge T.E., Batchelder D.N., Lacey R.J., Sheldon T.G., *J. Forensic Sci.*, 40 (**1995**) 31.
[90] Sands H.S., Hayward I.P., Kirkbride T.E., Bennett R., Lacey R.J., Batchelder D.N., *J. Forensic Sci.*, 43 (**1998**) 509.
[91] Akhavan J., *Spectrochim. Acta*, 47A (**1991**) 1247.
[92] Hayward I.P., Kirkbride T.E., Batchelder D.N., Lacey R.J., *J. Forensic Sci.*, 40 (*1995*) 883.
[93] Green R.L., Hargreaves M.D., Brown C.D., *Spectroscopy*, Special issues, **April 2010**.
[94] Sword D., *Spectroscopy*, Special issues, **April 2009**.
[95] Yinon J., Zitrin S., *Modern methods and applications in analysis of explosives*, Wiley, New York, **1993**.
[96] Burns D.T., Lewis R.J., *Anal. Chim. Acta*, 300 (**1995**) 221.
[97] King J.D., *Explosives detection – the case for magnetic resonance*, Advances in Analysis and detection of explosives, Kluwer Academic, Netherlands, **1993**, p 351-359.
[98] Gudmundson E., Jakobsson A., Poplett I.J.F., Smith J.A.S., *detection and classification of liquid explosives using NMR*, 2009 IEEE Internation conference on acoustics, speech and signal processing, **2009**.
[99] Buess M.L., Garroway A.N., Miller J.B., Yesinowski J.P., *Explosives detection by ^{14}N pure NQR*$^{+}$, Advances in Analysis and detection of explosives, Kluwer Academic, Netherlands, **1993**, p 361-368.

[100] Fraissard J., Lapina O., *Explosive detection using magnetic and nuclear resonance techniques*, Proceedings of the NATO Advanced research workshop on explosives detection using magnetic and nuclear resonance techniques, Saint Petersbourg, Russie, **7-9 Juillet 2008**.
[101] Nieto S., Gomez L.M., Santana A., Briano J.G., Mina N., Hernandez-Rivera S.P., Castro M.E., *The chemistry of TNT on clean and hydroxyl-precovered Ottawa sand particles*, Proceedings of SPIE-The International Society for Optical Engineering, 5415 (**2004**) 1400.
[102] Choi N-J., Kwak J-H., Lim Y-T., Bahn T-H., Yun K-Y., Kim J-C., Huh J-S., Lee D-D., *Sens. Actuator B-Chem.*, 108 (**2005**) 298.
[103] Nakamura J., *International forensic seminar on investigation of explosions and bombing scene*, National Research Institue of Police Science Report, Tokyo, **2007**.
[104] Beveridge A., *Forensic investigation of explosions, Recovery of material from the scene of an explosion and its subsequent forensic laboratory contamination – A team approach*, Taylor & Francis, London, **1998**, p.100-131.
[105] Yinon J., *Modern methods and applications in analysis of explosives, Analysis of explosive residues*, Wiley, Chichester, **1993**, p.163-209.
[106] Bader M., Göen T., Müller J., Angerer J., *J. Chromatogr. B*, 710 (**1998**) 91.
[107] Sigman M.E., Ma C.Y., *J. Forensic Sci.*, 46 (**2001**) 6.
[108] Perr J.M., Furton K.G., Almirall J.R., *Talanta*, 67 (**2005**) 430.
[109] Hable M., Stern C., Asowata C., Williams K., *J. Chromatogr. Sci*., 29 (**1991**) 131.
[110] Calderara S., Gardebas D., Martinez F., Khong S.P., *J. Forensic Sci*., 49 (**2004**) 1005.
[111] Fine D.H., Yu W.C., Goff E.U., Bender E.C., Reutter D.J., *J. Forensic Sci*., 29 (**1984**) 732.
[112] Collin O.L., Niegel C., DeRhodes K.E., McCord B.R., Jackson G.P., *J. Forensic Sci*, 51 (**2006**) 815.
[113] Keto R.O., Analysis of the eastern block explosives Semtex-H, Proceedings of the 3rd International Symposium on Analysis and Detection of Explosives, Mannheim-Neuostheim, 1989.
[114] Reardon M.R., Bender E.C., *Differentiation of composition C-4 based on the analysis of the process oil*, Proceedings of the 8th International Symposium on Analysis and Detection of Explosives, Ottawa, **2004**.
[115] Philips J.H., Coraor R.J., Prescott S.R., *Anal. Chem.*, 55 (**1983**) 889.
[116] Brill T.B., James K.J., Chawla G., Nicol G., Shukla A., Futrell J.H., *J. Phys. Org. Chem.*, 12 (**1999**) 819.
[117] Stambouli A., El Bouri A., Bouayoun T., Bellimam M.A., *Forensic Sci. Int.*, 146S (**2004**) S191.
[118] Armitt D., Zimmermann P., Ellis-Steinborner S., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 22 (**2008**) 950.
[119] McDonald J.G., Mount K.H., Egan J.M., Egan G.L., Miller M.L., *Mass spectral confirmation of nitro-based explosives using negative chemical ionization mass spectrometry with alternate reagent gases*, Proceedings of the 8th International Symposium on Analysis and Detection of Explosives, Ottawa, **2004**.
[120] Yinon J., *The analysis of explosives, Thin-Layer Chromatography*, Pergamon, Oxford, **1981**, p59-85.
[121] Bausinger T., Preuss J., *J. Hazard. Mater*., 162 (**2009**) 1578.
[122] McCord B.R., Whitehurst F.W., *J. Forensic Sci*., 76 (**1992**) 1574.
[123] Lang M.J., Burns S.E., *J. Chromatogr. A*, 849 (**1999**) 381.
[124] Kaiser M., *Propell. Explos. Pyrotech*., 23 (**1998**) 309.
[125] Borch T., Gerlach R., *J. Chromatogr. A*, 1022 (**2004**) 83.
[126] Emmrich M., Kaiser M., Ruden H., Sollinger S., *J. Chromatogr. A*, 645 (**1993**) 89.
[127] Hennion M.-C., *J. Chromatogr. A*, 885 (**2000**) 73.
[128] Hennion M.-C., Coquart V., Guenu S., Sella C., *J. Chromatogr. A*, 712 (**1995**) 287.
[129] Vial J., Hennion M.-C., Fernandez-Alba A., Agüera A., *J. Chromatogr. A*, 937 (**2001**) 21.
[130] Ochsenbein U., Zeh M., Berset J.D., *Chemosphere*, 72 (**2008**) 974.
[131] Paull B., Roux C., Dawson M., Doble P., *J. Forensic Sci*., 49 (**2004**) 1181.
[132] Renner T., Baumgarten D., Unger K.K., *Chromatographia*, 45 (**1997**) 199.
[133] Gaurav D., Kumar Malik A., Rai P.K., *J. Hazard. Mater*., 172 (**2009**) 1652.
[134] Oehrle S.A., *J. Energ. Mater*., 26 (**2008**) 197.
[135] Hilmi A., Luong J.H., Nguyen A.L., *J. Chromatogr. A*, 844 (**1999**) 97.
[136] Schulte-Ladbeck R., Edelmann A., Quintas G., Lendl B., Karst U., *Anal. Chem.*, 78 (**2006**) 8150.
[137] Caroll D.I., Dzidic I., Stillwell R.N., Haegele K.D., Horning E.C., *Anal. Chem*., 47 (**1975**) 2369.
[138] Zhao X., Yinon J., *J. Chromatogr. A*, 946 (**2002**) 123.
[139] D'Agostino P.A., Provost L.R., *Mass Spectrum*, 15 (**1989**) 553.
[140] Xu X., van de Craats A.M., de Bruyn P., *J. Forensic Sci*., 49 (**2004**) 1171.
[141] Gapeev M., Sigman J., Yinon J., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 17 (**2003**) 943.
[142] Crowson A., Beardah M.S., *Analyst*, 126 (**2001**) 1689.
[143] Widmer L., Watson S., Schlatter K., Crowson A., *Analyst*, 127 (**2002**) 1627.
[144] Song L., Bartmess J.E., *Rapid Commun. Mass Spectrom*., 23 (**2009**) 77.
[145] Crescenzi C., Albinana J., Carlsson H., Holmgren E., Battle R., *J. Chromatogr. A*, 1153 (**2007**) 186.

[146] Yinon J., *Forensic Application of mass spectrometry*, **1995**, ed. J. Yinon.
[147] Casetta B., Garofolo F., *Org. Mass Spectrom.*, 29 (**1994**) 517.
[148] Cassada D.A., Monson S.J., Snow D.D., *J. Chromatogr. A*, 74 (**2002**) 1879.
[149] Schmidt A.C., Niehus B., Matysik F.M., Engewald W., *Chromatographia*, 63 (**2006**) 1.
[150] Evans C.S., Sleeman R., Luke J., Keely B.J., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 16 (**2002**) 1883.
[151] Yinon J., McClellan J.E., Yost R.A., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 11 (**1997**) 1961.
[152] Hall K.E., McCord B.R., *J. Forensic Sci.*, 38 (**1993**) 928.
[153] Doyle J.M., Miller M.L., McCord B.R., McCollam D.A., Mushrush G.W., *Anal. Chem.*, 72 (**2000**) 2302.
[154] Klassen S.E., Massis T.M., Boespflug E.P., Montoya B.M., Reif J.L., *Thermochim. Acta*, 384 (**2002**) 329.
[155] Reutter D.J., Buechele R.C., Rudolph T.L., *Anal. Chem.*, 55 (**1983**) 1468A.
[156] Green M.J., *LC Mag.*, 3 (**1985**) 894.
[157] McCord B.R., Hargadon K.A., Hall K.E., Burmeister S.G., *Anal. Chim. Acta*, 288 (**1994**) 43.
[158] Burns D.T., Lewis R.J., Bridges J., *Anal. Chim. Acta*, 375 (**1998**) 255.
[159] Canella L., Austin C., Beavis A., Maynard P., Dawson M., Roux C., Doble P., *Rapid post-blast inorganic explosive analysis by suppressed ion chromatography*, http://projects.nfstc.org/trace/docs/Trace%20Presentations%20CD-2/doble.pdf, **2007**.
[160] Johns C., Shellie R.A., Potter O.G., O'Reilly J.W., Hutchinson J.P., Guijt R.M., Breadmore M.C., Hilder E.F., Dicinoski G.W., Haddad P.R., *J. Chromatogr. A*, 1182 (**2008**) 205.
[161] Harakuwe A.H., Haddad P.R., *J. Chromatogr. A*, 834 (**1999**) 213.
[162] Izake E.L., *Forensic Sci. Int.*, 202 (**2010**) 1.
[163] Wang J., *Electroanal.*, 19 (**2007**) 415.
[164] Almirall J.R., *J. Chromatogr. Sci.*, 38 (**2000**) 297.
[165] Wood M., Laloup M., Samyn N., Ramirez Fernandez M., de Bruijn E. A., Maes R. A. A., De Boeck, G., *J. Chromatogr. A*, 1130 (**2006**) 3.
[166] Gaurav D., Kaur V., Kumar Malik A., Rai P.K.,. *J. Hazard. Mater.*, 147 (**2007**) 691.
[167] *Test methods for evaluating solid waste, Physical/chemical method, proposed update II Method 8330*, US EPA, Washington DC, EPA report SW846, 3rd ed. (**1992**).
[168] Pumera M., *Electrophoresis*, 27 (**2006**) 244.
[169] Pumera M., *Electrophoresis*, 29 (**2008**) 269.
[170] Cruces-Blanco C., Gamiz-Gracia L., Garcia-Campana A.M., *Trends Anal. Chem.*, 26 (**2007**) 215.
[171] Schulte-Ladbeck R., Vogel M., Karst, U., *Anal. Bioanal. Chem.*, 386 (**2006**) 559.
[172] Germain M.E., Knapp M.J., *Inorg. Chem.*, 47 (**2008**) 9748.
[173] Malashikhin S., Finney N.S., *J. Am. Chem. Soc.*, 130 (**2008**) 12846.
[174] Laine D.F., Cheng I.F., *Microchem. J.*, 91 (**2009**) 125.
[175] Hutchinson J.P., Evenhuis C.J., Johns C., Kazarian A.A., Breadmore M.C., Macka M., Hilder E.F., Guijt R.M., Dicinoski G., Haddad P.R., *Anal. Chem.*, 79 (**2007**) 7005.
[176] Royds D., Lewis S.W., Taylor A.M., *Talanta*, 67 (**2005**) 262.
[177] Effenhauser C.S., Manz A., Widmer M., *Anal. Chem.*, 65 (**1993**) 2637.
[178] Fan Z.H., Harrison D.J., *Anal. Chem.*, 66 (**1994**) 177.
[179] Wu D., Qin J., Lin B., *J. Chromatogr. A*, 1184 (**2008**) 542.
[180] Pumera M., Merkoci A., Alegret S., *Anal. Chem.*, 49 (*2007*) 873.
[181] Johns C., Macka M., Haddad P.R., *Electrophoresis*, 65 (**2003**) 2150.
[182] Timerbaev A.R., Buchberger W., *J. Chromatogr. A*, 834 (**1999**) 117.
[183] Hargadon K.A., McCord B.R., *J. Chromatogr.*, 602 (**1992**) 241.
[184] Kishi T., Nakamura J., Arai H., *Electrophoresis*, 19 (**1998**) 3.
[185] Hopper K.G., McCord B.R., *J. Forensic Sci.*, 50 (**2005**) 307.
[186] Feng J., Guo B., Lin J.M., Xu J., Zhou H., Sun Y., Liu Y., Quan Y., Lu X., *Chin. J. Chromatogr.*, 26 (**2008**) 667.
[187] Hopper K.G., Leclair H., McCord B.R., *Talanta*, 67 (**2005**) 304.
[188] Doyle J.M., McCord B.R., *J. Chromatogr. B*, 714 (**1998**) 105.
[189] Hutchinson J.P., Johns C., Breadmore M.C., Hilder E.F., Guijt R.M., Lennard C., Dicinoski G., Haddad P.R., *Electrophoresis*, 29 (**2008**) 4593.
[190] Zemann A.J., *Electrophoresis*, 24 (**2003**) 2125.
[191] Solinova V., Kasicka V., *J. Sep. Sci.*, 29 (**2006**) 1743.
[192] Kuban P., Kuban P., Kuban V., *J. Chromatogr. A*, 836 (**1999**) 75.
[193] Soga T., Ross G.A., *J. Chromatogr. A*, 834 (**1999**) 65.
[194] Johns C., Yang W., Macka M., Haddad P.R., *J. Chromatogr. A*, 1050 (**2004**) 217.
[195] Pappas T.J., Gayton-Ely M., Holland L.A., *Electrophoresis*, 26 (**2005**) 719.
[196] Silva M., *Electrophoresis*, 30 (**2009**) 50.

[197] Northrop D.M., Martire D.E., MacCrehan W.A., *Anal. Chem*., 63 (**1991**) 1038.
[198] Oehrle S.A., *J. Chromatogr. A*, 745 (**1996**) 233.
[199] Oehrle S.A., *Electrophoresis*, 18 (**1997**) 300.
[200] Groom C.A., Beaudet S., Halasz A., Paquet L., Hawari, J., *Environ. Sci. Technol*., 34 (**2000**) 2330.
[201] Kleibohmer W., Cammann K., Robert J., Mussenbrock E., *J. Chromatogr*., 638 (**1993**) 349.
[202] Groom C.A., Beaudet S., Halasz A., Paquet L., Hawari, J., *J. Chromatogr. A*, 909 (**2001**) 53.
[203] Casamento S., Kwok B., Roux C., Dawson M., Doble P., *J. Forensic Sci*., 48 (**2003**) 1075.
[204] Luong J.H.T., Guo Y., *J. Chromatogr. A*, 811 (**1998**) 225.
[205] Groom C.A., Halasz A., Paquet L., D'Cruz P., Hawari, J., *J. Chromatogr. A*, 999 (**2003**) 17.
[206] Groom C. A., Halasz A., Paquet L., Thiboutot S., Ampleman G., *J. Chromatogr. A*, 1072 (**2005**) 73.
[207] Bailey C.G., Yan, C., *Anal. Chem*., 70 (**1998**) 3275.
[208] Bailey C.G., Wallenborg S.R., *Electrophoresis*, 21 (**2000**) 3081.
[209] Giordano B.C., Copper C.L., Collins G.E., *Electrophoresis*, 27 (**2006**) 778.
[210] Yang Y.Y., Liu J.T., Lin, C.H., *Electrophoresis*, 30 (**2009**) 1.
[211] Kennedy S., Caddy C., Douse J.M.F., *J. Chromatogr. A*, 726 (**1996**) 211.
[212] Hilmi A., Luong J.H.T., Nguyen A., *Anal. Chem*., 71 (**1999**) 873.
[213] Hilmi A., Luong J.H.T., *Electrophoresis*, 21 (**2000**) 1395.
[214] Schmitt-Kopplin P., Frommberger M., *Electrophoresis*, 21 (**2003**) 1395.
[215] Gaspar A., Englmann M., Fekete A., Harir, M., *Electrophoresis*, 29 (**2008**) 66.
[216] Rodriguez-Robledo V., Smyth W.F., *Electrophoresis*, 30 (**2009**) 1647.
[217] Wallenborg S.R., Bailey C.G., *Anal. Chem*., 72 (**2000**) 1872.
[218] Chen G., Wang J., *Analyst*, 129 (**2004**) 507.
[219] Wang J., Siangproh W., Thongngamdee S., Chailapakul, O., *Analyst*, 130 (**2005**) 1390.
[220] Pumera M., Wang J., Opekar F., Jelinek I., Feldman J., Lowe H., Hardt S., *Anal. Chem*., 74 (**2002**) 1968.
[221] Wang J., Pumera M., Collins G., Opekar F., Jelinek I., *Analyst*, 127 (**2002**) 719.
[222] Wang J., Chen G., Muck Jr. A., *Anal. Chem*., 75 (**2003**) 4475.
[223] Wang J., Chen G., Muck Jr. A., Collins G.E., *Electrophoresis*, 24 (**2003**) 3728.
[224] Wang J., Pumera M., *Anal. Chem*., 74 (**2002**) 5919.
[225] Wang J., Chen G., Muck A., *Talanta*, 78 (**2009**) 208.
[226] Giordano B.C., Terray A., Collins G.E., *Electrophoresis*, 27 (**2006**) 4295.
[227] Pumera M., Wang J., Grushka E., Lev O., *Talanta*, 72 (**2007**) 711.
[228] Sapsford K.E., Charles P.T., Patterson Jr. C.H., Ligler F.S., *Anal. Chem*., 74 (**2002**) 1061.
[229] Bromberg A., Mathies R.A., *Anal. Chem*., 75 (**2003**) 1188.
[230] Bromberg A., Mathies, R.A., *Electrophoresis*, 25 (**2004**) 1895.
[231] Lu Q., Collins G.E., Smith M., Wang J., *Anal. Chim. Acta*, 469 (**2002**) 253.
[232] Chen G., Lin Y., Wang J., *Talanta*, 68 (**2006**) 497.
[233] Wang J., Tian B., Sahlin E., *Anal. Chem*., 71 (**1999**) 5436.
[234] Wang J., Pumera M., Chatrathi M.P., Escarpa A., Musameh M., Collins G., Mulchandani A., Lin Y., Olsen K., *Anal. Chem*., 74 (**2002**) 1187.
[235] Wang J., Polsky R., Tian B., Chatrathi M.P., *Anal. Chem*., 72 (**2000**) 5285.
[236] Wang J., Chen G., Chatrathi M.P., Fujishima A., Tryk D.A. Shin D., *Anal. Chem*., 75 (**2003**) 935.
[237] Wang J., Pumera M., *Talanta*, 69 (**2006**) 984.
[238] Hilmi A., Luong J.H.T., *Anal. Chem*., 72 (**2000**) 4677.
[239] Hilmi A., Luong J.H.T., *Environ. Sci. Technol*., 34 (**2000**) 3046.
[240] Yao X., Wang J., Zhang L., Yang P., Chen G., *Talanta*, 69 (**2006**) 1285.
[241] Ryvolova M., Preisler J., Brabazon D., Macka, M., *Trends Anal. Chem*., 29 (**2010**) 339.
[242] Singh S., *J. Hazard. Mater*., 144 (**2007**) 15.

PARTIE II – ANALYSE D'ANIONS ET DE CATIONS INORGANIQUES DANS DES RESIDUS PRE- ET POST-EXPLOSION PAR ELECTROPHORESE CAPILLAIRE

INTRODUCTION

Après explosion, les anions inorganiques, tels que le chlorate, le perchlorate, le thiosulfate ou bien encore le phosphate, ou les cations inorganiques comme l'ammonium, le baryum ou le strontium, sont des éléments clés pour remonter à la composition d'origine de la charge explosive quand ils sont détectés dans des résidus. Ces ions, qui ne sont pas naturellement présents dans les différentes matrices récoltées (sol, plastique, tissu, métal…) s'avèrent donc être des marqueurs importants.

Au Laboratoire Central de la Préfecture de Police, la chromatographie d'échange d'ions est la seule technique disponible pour quantifier ces espèces dans les extraits post-attentats. Afin de confirmer leur présence, une seconde technique d'analyse, ayant un mécanisme de séparation totalement orthogonal, est fortement recommandée. C'est dans cette optique que l'électrophorèse capillaire, technique séparative reconnue pour l'analyse de composés inorganiques ionisés, a été utilisée car son potentiel a déjà été démontré dans ce cadre dans la Partie I. Malgré toutes les publications existantes dans ce domaine, le développement de nouvelles méthodes adaptées à l'analyse de mélanges contenant des ions inédits, tel l'azoture, est indispensable, tout comme l'évaluation des effets de matrices éventuels lors d'analyses d'échantillons réels.

Ce chapitre propose ainsi le développement d'une nouvelle méthode d'analyse d'anions par CE, utilisant un électrolyte de forte force ionique à base de chromate et de tampon Tris, puis une méthode d'analyse des cations, impliquant un électrolyte à base de guanidine et un capillaire modifié par une double couche ionique et enfin une nouvelle méthode d'analyse rapide et simultanée des espèces anioniques (anions Cl^- et NO_3^-) et cationiques (cation Al^{3+}) présentes dans des résidus récoltés après une explosion mettant en œuvre une réaction chimique entre un acide chlorhydrique ou nitrique avec des feuilles d'aluminium.

Une part importante de l'étude a été consacrée à la validation quantitative de ces méthodes et à l'étude, par une approche chimiométrique, des effets de matrice permettant la quantification des anions ou des cations présents dans des extraits de tissus, de métal, de papier, de verre, de sol, de plastique ou de cotons, en présence parfois d'une quantité très importante d'interférents.

Enfin, des analyses d'extraits issus d'échantillons réels seront présentées et les résultats de quantification seront comparés à ceux obtenus par chromatographie d'échange d'ions.

CHAPITRE I : Identification et détermination d'anions et de cations inorganiques dans des résidus pré- et post-explosions

1. Article – Identification et détermination d'anions inorganiques dans des extraits issus de résidus pré- et post-explosion par électrophorèse capillaire

IDENTIFICATION AND DETERMINATION OF INORGANIC ANIONS IN REAL EXTRACTS FROM PRE- AND POST-BLAST RESIDUES BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Cédric Sarazin[a,b], Nathalie Delaunay[b], Anne Varenne[b], Jérôme Vial[b], Christine Costanza[a]
Véronique Eudes[a], Jean-Jacques Minet[a], Pierre Gareil[b]

Journal of Chromatography A, 1217 (2010) 6971-6978

[a]Laboratoire Central de la Préfecture de Police, 39 bis rue de Dantzig, 75015 Paris, France.
[b]Laboratoire Physicochimie des Electrolytes, Colloïdes et Sciences Analytiques (PECSA), UPMC Univ Paris 06, Chimie-ParisTech, ESPCI ParisTech, CNRS.

Keywords: Capillary zone electrophoresis (CZE), inorganic-based explosives, field amplified sample stacking (FASS), field-enhanced sample injection (FESI)

Abstract

Fast, selective, and sensitive analysis of inorganic anions is compulsory for the identification of explosives in post-blast or environmental samples. For the last twenty years, capillary electrophoresis (CE) has become a valuable alternative to ion chromatography (IC) for the analysis of inorganic-based explosives because of its low running costs and its simplicity of use. This article focuses on the development and validation of a CE method for the

simultaneous analysis of 10 anions (chloride, nitrite, nitrate, thiosulphate, perchlorate, chlorate, thiocyanate, carbonate, sulphate, and phosphate which can be found in post-blast residues), plus for the first time azide anion, possibly present in the composition of detonators, and the internal standard (formate) in 20 min total runtime. Intermediate precisions were 2.11 % for normalized areas and 0.72 % for normalized migration times. Limits of detection close to 0.5 ppm for all anions were obtained with the use of preconcentration techniques, thanks to a fast and simple sample preparation allowing the analysis of a large variety of matrices with the developed generic CE method. The matrix effects were statistically studied for the first time in the explosive field for different matrices, containing interfering anions and cations, sometimes at high levels. In fact, no significant matrix effect occurred (tests with blank matrix extracts of soil, cloth, glass, plastic, paper, cotton, and metal). Finally, analyses of real post-blast residues and real detonator extracts were performed. The CE results were compared with those obtained with the IC method used routinely and showed excellent correlation.

1. Introduction

Many kinds of explosives can be used to perpetrate a blast or an explosion. The main composition of these explosives consists in a mixture of organic explosives and inorganic salts such as the ammonium nitrate fuel oil (ANFO) mixture or the black powder. The detection of organic explosives can be carried out by GC coupled to a thermal energy analyzer [1], IR spectrometry [2], X-ray detection [3], and HPLC or CE coupled to UV or MS detection [4,5]. For analyzing inorganic salts, X-ray [6], IR [7], CE, or IC can be used. For many years, IC has been the most powerful technique used for these separations [8] but it has suffered from the lack of an additional technique to confirm the presence of putative ions. An approach to resolve this problem was to combine two different IC columns and detection techniques, for example on the one hand a classical ion analysis column with suppressed conductivity detection and, on the other hand, a single ion analysis column with UV detection [9].

Since 20 years, CE, with UV [10] and conductivity [11] detection, has known a real development for ion analysis and has provided a complementary technique. The complementarity of IC and CE was first studied by Hargadon and McCord. for the analysis of a black powder with an indirect UV detection [12]. Afterwards, CE was considered in several papers for the analysis of different inorganic ion mixtures in various matrices [13-15]. Rapid and highly efficient separations were obtained. As most inorganic ions are UV transparent, the indirect UV detection mode was generally implemented but this approach lacks

sensitivity. Different stacking methods were thus used such as field amplified sample stacking (FASS) [16] or field-enhanced sample injection (FESI) [17].

In recent years, attention was focused on developing protocols enabling fast analysis directly on the explosion site. Hutchinson et al. [18,19] described anion and cation analysis methods with portable CE and diode or contactless conductivity detection . Fast screening is also possible with the onset of microchip systems. Wang et al. [20] presented a dual opposite injection of three inorganic cations and three inorganic anions, for their simultaneous detection, in polymethylmethacrylate chip. Different papers reviewed the applications of CE for the analysis of explosives [21-25].

The main purpose of this work was to develop a CE method that would be complementary to the IC protocol used by French police for the analysis of a given mixture of anions in pre- and post-blast residue aqueous extracts. The chromate-based background electrolyte (BGE) proposed by Hutchinson et al. [18], which allowed the analysis of the main anions of this study, was first tested and then modified in order to separate 10 anions plus for the first time azide anion, this anion being absent in Hutchinson's mixture. Additionally, adapted, fast, and simple sample preparation procedures were studied with a view of analysing the largest variety of matrix aqueous extracts by a generic method that would simultaneously provide improved sensitivity. Finally, analyses of real pre- and post-blast residues were performed and the results were compared with those produced by IC.

2. Experimental

2.1 Standards and electrolytes

All anionic standards used were purchased from Sigma-Aldrich (L'Isle d'Abeau, France). Anionic chromophore used for the indirect UV detection was prepared from chromium (VI) oxide and sodium chromate (Fluka, Lyon, France) and the BGE was buffered with tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris), purchased from Sigma-Aldrich. Organic solvents, methanol and ethanol (analytical grade), were supplied by VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Hexadimethrine bromide (HDMB) used as electroosmotic flow (EOF) reversal reagent was purchased from Sigma-Aldrich.

1000 mg L^{-1} individual anionic standard solutions were prepared weekly by volumetric dissolution of sodium salts in ultra-pure water delivered by a Direct-Q3 UV system (Millipore, Molsheim, France). A standard mixture of the 12 anions was prepared daily (15 mg L^{-1} each in ultra-pure water). HDMB solution was prepared by dissolving 0.25 g in 100 mL of ultra-pure water.

The final composition of the BGE was: 100 mM Tris, 25 mM CrO_3, 25 mM Na_2CrO_4 in ultra-pure water (pH 8.2), mixed weekly, and 6 % ethanol was added just before the analysis.

2.2 Apparatus

The development of the CE method was carried out with an Agilent $HP^{3D}CE$ system (Massy, France) equipped with a diode array detector (deuterium lamp) set at 254 nm, whereas the validation and the real sample analyses were achieved with a Beckman Coulter P/ACE MDQ system (Villepinte, France) equipped with a fixed wavelength UV detector (mercury lamp) at 254 nm. A Dionex ICS-2000 (Voisins-Le-Bretonneux, France) ion chromatograph equipped with a suppressed conductivity detector (Dionex ASRS suppression and conductivity cell) was used for comparison purposes. Instrument control and data acquisition were performed using Chromeleon 6.7® software. A 25-µL loop was employed for the anion injection.

2.3 Electrophoretic procedures

Electrophoretic separations were performed using 50 µm I.D. bare fused-silica capillaries purchased from Polymicro (Photonlines, Marly-Le-Roi, France). Total capillary lengths varied from 68 to 97 cm, according to experiments, for the Agilent system and was fixed at 87 cm for the Beckman one. A detection window was created for the UV detection at 8.5 cm and 10 cm from the anodic end for the Agilent and Beckman systems respectively. Before first use, capillaries were conditioned by successive percolations under 1 bar with 1 M NaOH for 20 min, 0.1 M NaOH for 20 min, ultra-pure water for 20 min, HDMB solution for 20 min and then BGE for 10 min. Between each run, capillaries were rinsed with the BGE under 1 bar for 7 min. Then, every 10 analysis, capillaries were flushed with the HDMB solution to keep EOF constant (RSD value equal to 0.6%, but increasing up to 2.3% if the flush with the HDMB solution was done only every 15 runs). Injections were performed hydrodynamically under 50 mbar or electrokinetically at -2 kV with variable injection times. Separations were run at 15, 20 or 25 °C, according to cases, under -30 kV.

2.4 Chromatographic procedures

Chromatographic separations were performed at 30 °C with a Dionex AS19 column (250 x 4 mm) equipped with a Dionex AG19 guard column (50 x 4 mm) coupled to a ASRS suppressor. Eluent gradients were generated using the Dionex ECG-KOH Elu GenII cartridge. The optimized eluent gradient was: 0-2 min: 10 mM isocratic; 2-16 min: gradient from 10 to

25 mM; 16-26 min: gradient from 25 to 40 mM; 26-35 min: gradient from 40 to 45 mM; 35-40 min: 45 mM isocratic, with a flow-rate of 1 mL min^{-1}. Separations were monitored by suppressed conductivity detection at 35 °C with continuously regenerated cation trap column (Dionex CR-ATC) inserted after the separation column. All this procedure was previously optimized and conducted routinely.

2.5 Real samples preparation

Post-blast residues and blank samples were extracted in hot water placed in a sonication bath for 10 min. The obtained solutions were filtered through a 150-µm cellulose filter (Les Filtres Durieux, Marne-la-Vallée, France) and a 0.45-µm nylon syringe filter (Teknokroma, A.I.T. France, Houilles, France). A small volume of high ionic strength BGE was added to the extract solutions, with a proportion of extract and BGE equal to (9/1) in order (i) to match the conductivities of the different extracts and (ii) to reach a conductivity value close to a tenth of the BGE conductivity for stacking purposes. The studied matrices were soil, plastic, paper, cloth, cotton, metal, and glass. Post-blast residues were collected after a criminal explosion either directly or via cotton swabs. The first step of this last procedure consisted in the purification of usual hydrophilic cotton swabs by assisted solvent extraction using an ASE 200 instrument (Dionex), with one cycle of 5 min at 100 °C and 100 bar with water and next with acetone. Cotton swabs moistened with water were next wiped over samples and were used for inorganic analysis, after extraction with hot water for 10 min under sonication. Blank samples were collected in or near the laboratory.

2.6 Conductivities

The conductivity values of the samples and BGEs were determined with the CE apparatus, by measuring current intensity as a function of the applied voltage. Conductivity κ was derived from Ohm's law :

$$\kappa = \frac{4LI}{\pi d_c^2 V} \qquad (1)$$

where L is the capillary length, I the measured current intensity, d_c the inner diameter and V the voltage applied across the capillary. Calibration was done with solutions of 0.1 and 0.01 M KCl (κ = 1.2103 and 0.1365 S m^{-1} at 25°C, respectively).

2.7 Statistical approach of matrix effects

Statistical studies of matrix effects were carried out with five repeated injections for five different anion concentrations (2, 4, 5, 10, and 20 mg L^{-1}) in ultra-pure water for the standard calibration and three repeated injections for five anion concentrations (2, 4, 6, 10, and 20 mg L^{-1}) in given blank matrix extracts. When matrices already contained some anions, additional spiking was performed. Statistical parameters of the regression lines were computed with Excel® software (Microsoft).

3. Results and discussion

3.1 CE method development

A method for the separation of fifteen anions (acetate, benzoate, carbonate, chlorate, chloride, chlorite, cyanate, fluoride, nitrate, nitrite, perchlorate, phosphate, sulphate, thiocyanate, and thiosulfate) potentially present in post-blast residues was developed by Hutchinson et al. [18], but azide anion, which is a primary explosive present in the composition of some detonators, was missed. Thus, the BGE developed by Hutchinson was first evaluated for the separation of an original anionic mixture differing from Hutchinson's one by the absence of acetate, benzoate, chlorite, cyanate, and fluoride anions, which are very rarely used in the explosive compositions, and conversely the presence of azide anion. The obtained electropherogram is presented in Figure II-I-1.

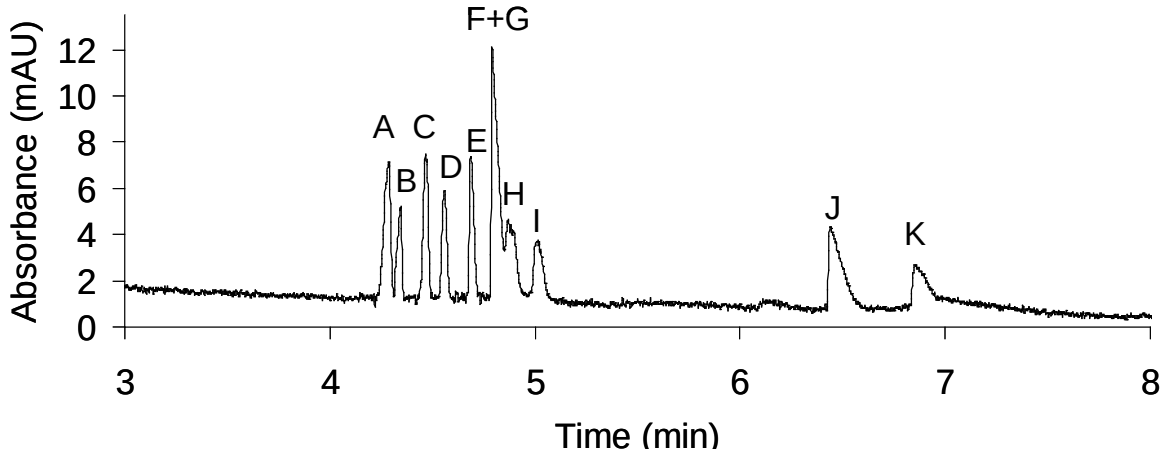


Figure II-1-1. CE analysis of a standard mixture of anions in ultra-pure water based on the method developed by Hutchinson et al. [16]. Bare fused-silica capillary, 50 µm I. D. × 68 cm (UV detection at 59.5 cm) modified with HDMB at 0.25 g in 100 mL ultra-pure water. BGE: 10 mM CrO_3, 10 mM Na_2CrO_4 and 40 mM Tris (pH 8.2). Temperature, 25 °C; applied voltage, -30 kV; hydrodynamic injection, 12 s, 50 mbar. Indirect UV detection at 254 nm. Anion concentration, 20 mg L^{-1} each in ultra-pure water. Identification, chloride (A), thiosulphate (B), nitrite (C), nitrate (D), sulphate (E), azide (F), perchlorate (G), thiocyanate (H), chlorate (I), phosphate (J), and carbonate (K).

The method developed by Hutchison et al. was not adapted to the mixture of the 11 anions of interest. Indeed, comigrations were observed for azide (F), perchlorate (G), and thiocyanate (H). Some modifications of the separation conditions were thus necessary to improve the resolution and the sensitivity. The modified parameters were temperature, electric field via the applied voltage and the capillary length, BGE composition, and ionic strength.

3.1.1 Temperature

Upon decreasing temperature, the BGE viscosity increases by 2-3 % per °C [26]. This increase induces a reduction of the electroosmotic and electrophoretic mobilities, and hence a slowdown of the anion migration. Separations were performed at 15 °C, 20 °C, and 25 °C. The decrease in temperature allowed an improvement of the resolution between thiocyanate and (perchlorate + azide) peaks (R_s = 0.8 at 25 °C and R_s = 1.3 at 15 °C), but the comigration of azide and perchlorate anions remained. Consequently, the following separations were performed at 15 °C but other parameters needed to be altered for analysis optimization.

3.1.2 Electric field

Resolution is expected to depend slightly on field strength through variation in efficiency. Electric field can be varied either by varying applied voltage at constant capillary length or by varying capillary length at constant voltage. For a capillary length fixed at 68 cm, four applied voltages were tested (-30, -25, -20 and -15 kV) without any improvement in resolution between azide and perchlorate anions. Furthermore, peaks efficiencies were improved upon increasing voltage, with for example in the case of thiosulphate anion plate numbers of 99,900, 105,000, 112,000, and 115,000 for V = -15 kV, -20 kV, -25 kV, and -30 kV, respectively. A voltage of -30 kV was thus retained as it gave the fastest separation and without observed Joule heating.
Three capillary lengths (76, 86, and 96 cm) were then tested. The comigration of azide and perchlorate anions still occurred but the resolution between the (azide + perchlorate) and the thiocyanate peaks was improved to 1.6 with the 96 cm length capillary. This value was thus retained for further optimization.

3.1.3 Ionic strength

Increasing ionic strength I is a way of decreasing the actual mobility of anions. But, according to Hutchinson et al. [18], a 1:2 ratio of CrO_3/Tris provided the best resolution. So, this ratio

was kept constant in the different tested BGE compositions. Four BGEs were evaluated: BGE #1, 5 mM CrO_3, 5 mM Na_2CrO_4, and 20 mM Tris (pH 8.2); BGE #2, 15 mM CrO_3, 15 mM Na_2CrO_4, and 60 mM Tris (pH 8.2); BGE #3, 25 mM CrO_3, 25 mM Na_2CrO_4, and 100 M Tris (pH 8.2); BGE #4, 50 mM CrO_3, 50 mM Na_2CrO_4, and 200 M Tris (pH 8.2). Their respective ionic strengths are 30, 90, 150, and 200 mM.

Figure II-I-2 presents the electropherograms obtained for the five anions that were the most difficult to separate according to Figure II-I-1 (sulphate, perchlorate, thiocyanate, azide, and chlorate) with the BGEs #1, #2, and #3. The identification was not carried out. Increasing ionic strength resulted in increased analysis time, as expected, and improved resolution. At a 150 mM ionic strength, creating a current of - 31 µA, the overall resolution became more satisfactory. With the BGE #4 (results not shown), Joule effect appeared at -25 kV; the resulting courant being equal to - 79 µA. Thus, BGE#3 was preferred.

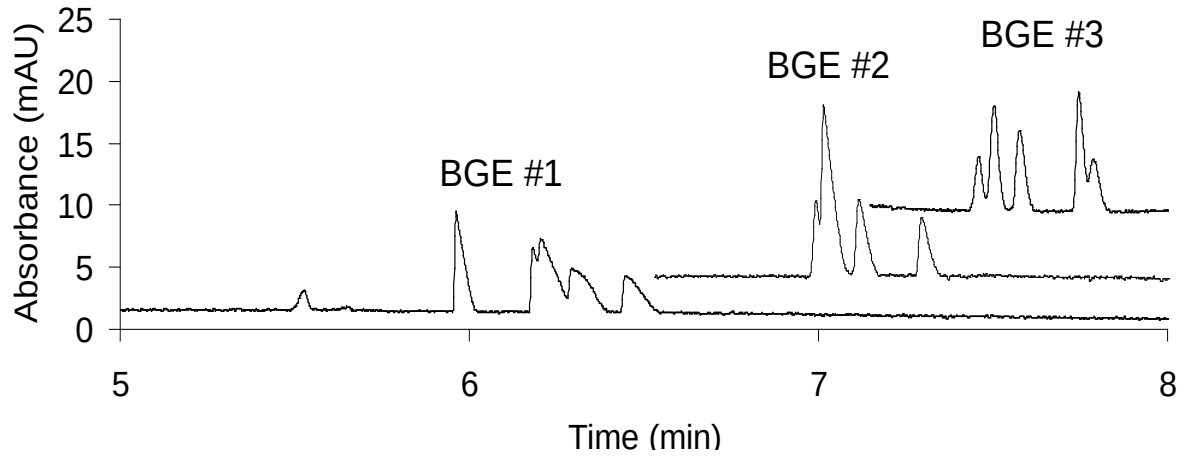


Figure II-I-2. Separation of sulphate, perchlorate, thiocyanate, azide, and chlorate anions with three BGEs. Bare fused-silica capillary, 50 µm I. D. × 96 cm (UV detection at 88.5 cm) modified with HDMB at 0.25 g in 100 mL ultra-pure water. BGE #1: 5 mM CrO_3, 5 mM Na_2CrO_4 and 20 mM Tris (pH 8.2); BGE #2: 15 mM CrO_3, 15 mM Na_2CrO_4 and 60 mM Tris (pH 8.2); BGE #3: 25 mM CrO_3, 25 mM Na_2CrO_4 and 100 mM Tris (pH 8.2). Temperature, 15 °C; applied voltage, -30 kV; hydrodynamic injection, 20 s, 50 mbar. Indirect UV detection at 254 nm. Anion concentration, 20 mg L^{-1} each in ultra-pure water. Peaks were not identified.

3.1.4 Solvent composition

To complete the resolution of the anion separation, the addition of an organic solvent in the BGE was tested. According to Harakuwe and Haddad [27], Sarmini and Kenndler [28], and Descroix et al. [29], organic solvents can have different effects on the BGE. First, it may change analyte solvation, pKa values, and ion pairing phenomena, so that the electrophoretic mobilities of the anions may be modified. It may also alter the electroosmotic flow by modifying the BGE viscosity and the zeta potential. In order to evaluate the optimal solvent composition of the BGE more easily, the relative variation of the anion effective mobilities

(excepted carbonate and phosphate anions) with respect to formate (internal standard) mobility ($\Delta\mu = \mu_{anion} - \mu_{formate}$) was studied as a function of solvent content.
With methanol, the optimal content was 2 % (v/v) but as methanol is a volatile solvent, this low content in the BGE could lead to non-robust analytical conditions. Thus ethanol was evaluated. The best resolution was obtained with 6 % ethanol (Figure II-I-3).
Indeed, with 5, 7 or 9 %, at least two anions comigrated. With 6 % ethanol, the 11 anions were separated, even if azide mobility was very close to those of chlorate and thiocyanate (R_s(azide/thiocyanate)=1.13; R_s(chlorate/azide)=1.3). The final composition of the optimized BGE was: 25 mM CrO_3, 25 mM Na_2CrO_4, 100 mM Tris (pH 8.2), to which 6 % (v/v) EtOH was finally added.

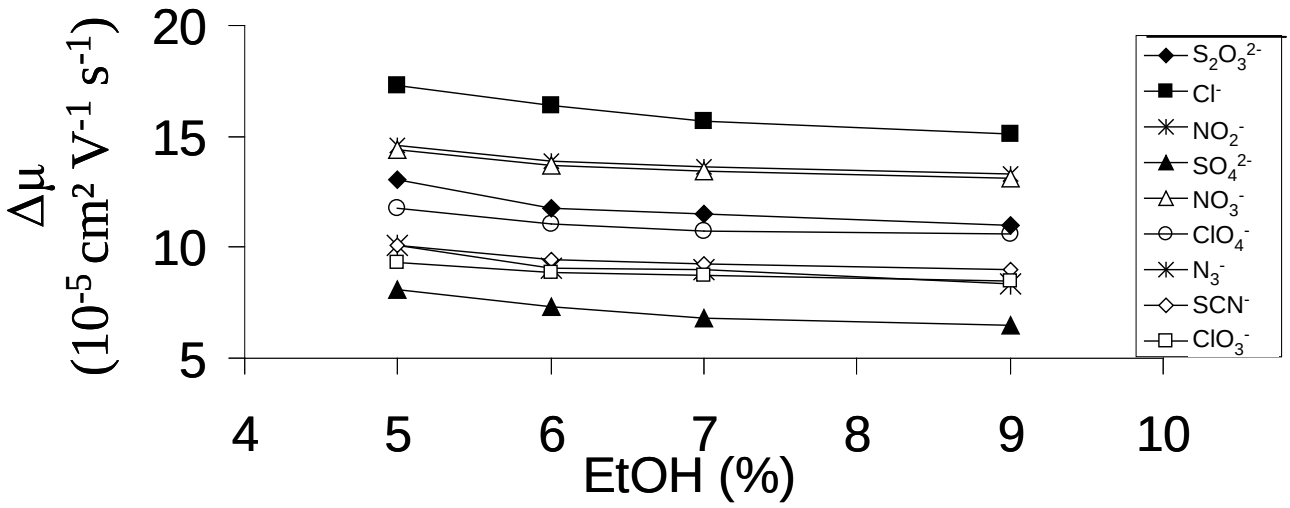


Figure II-I-3. Variations of the relative electrophoretic mobility ($\Delta\mu = \mu_{anion} - \mu_{formate}$) of the anions of interest as a function of the ethanol content for BGE #3.

3.1.5 Sensitivity

In order to test the preconcentration techniques, a first injection in standard conditions was carried out with anions at 15 mg L^{-1} directly prepared in the BGE. Then, sensitivity improvement was achieved by on-line preconcentration employing either FASS or FESI. FASS consists in hydrodynamically injecting the sample in a capillary filled with a BGE of higher conductivity than that of the sample [30]. The difference between the zone conductivities creates a higher electric field in the injected sample zone, inducing a high analyte velocity in this zone. Analytes are therefore slowed down when they penetrate the BGE zone, so that they focus and preconcentrate. The optimal ratio of the BGE to sample conductivity (named γ) was shown to be around 10 [30]. Indeed, if the sample conductivity is

too low, the electric field in this zone will generate Joule heating, which alters the flat velocity profile and reduces preconcentration efficiency, and may also induce bubles and analyte degradation. Experimentally, to obtain a conductivity ratio of 10, analytes were prepared in an ultra-pure water/BGE (9:1) mixture. Such a conductivity ratio of 10 allows the injection of a larger sample volume in the capillary, so that injection time should be optimized. For 50 mbar pressure, injection times of 20, 40, 60, and 80 s were investigated. For chloride anion, from 20 to 60 s, peak height linearly varied from 1.7 to 7 mAU. For 80 s, the linearity is broken and the peak height value was 6.6 mAU. Beyond 60 s, the decrease of the peak height was related to the increase of its width due to the injection dispersion. The same phenomenon was observed for all anions. The best injection time was 60 s, which led to an injected volume represented 3 % of the total capillary volume.

In FESI, analytes are introduced electrokinetically. Therefore analytes with superior apparent mobilities penetrate in larger amount in the capillary. A discrimination and preconcentration also take place during the injection. The applied voltage was fixed at -2 kV in order to limit the sample degradation. As previously, four injection times were studied (20, 40, 50, and 60 s) and chloride peak height was monitored. The peak height linearly varied with injection time from 20 to 50 s and for 60 s the linearity was broken. The optimized injection parameters were thus -2 kV for 50 s.

A constant enrichment factor of 6 was yielded for FASS whereas a factor ranging from 23 for chloride anion to 15 for phosphate anion was obtained in the case of FESI. Anions with a superior apparent mobility are injected in a more important amount, their enrichment factors were also maximized. FESI led to improved detection limits, and was thus selected. Furthermore, the electrokinetic injection limited the introduction of low-mobility matricial compounds which may reduce precision on quantitative analysis of real samples. Finally, the electropherogram obtained under optimized conditions is presented in Figure II-I-4.

3.2 Instrumentation and laboratory transfer

The protocol was then transferred from the university laboratory using an Agilent instrument to the police laboratory, where a Beckman instrument was available. Whereas capillary length was not limited on the Agilent apparatus, the capillary length in the Beckman instrument was limited to 87 cm due to the coolant cartridge length. Other parameters had to be also adjusted to keep the same resolution with the same electrolyte. Injection time was thus adapted to -2 kV for 40 s. The Beckman instrument led to similar resolutions for critical pairs of anions with a shorter capillary length. This could not be explained by differences in thermal regulation systems, because separations were performed with both instruments between linear range of Ohm’s law. It may be linked to different geometries of optical apertures. Indeed, the

resolution between nitrite and nitrate was 1.3 on Agilent HP^{3D}CE and 1.2 on Beckman PACE. Obtained LODs on Beckman instrument (calculated at a signal to noise ratio of 3) were in a range from 0.3 mg L^{-1} to 0.7 mg L^{-1} (see Table II-I-1). LODs were improved by a factor of 2 with the Beckman PACE instrument.

3.3 Elements of method validation

The validation of the developed method was carried out to prove the method could be applied routinely to the quantitative analysis of anions in real extracts with a quantitation limit of 2 mg L^{-1}. This validation was primarily carried out for all anions except azide anion, which has a migration time close to thiocyanate and chlorate anions. Azide anion was then validated in a mixture of all anions, except thiocyanate and chlorate anions. Precision and accuracy of the method had to be better than 5 % and 20 % respectively, the usual criteria used by the French police laboratory.

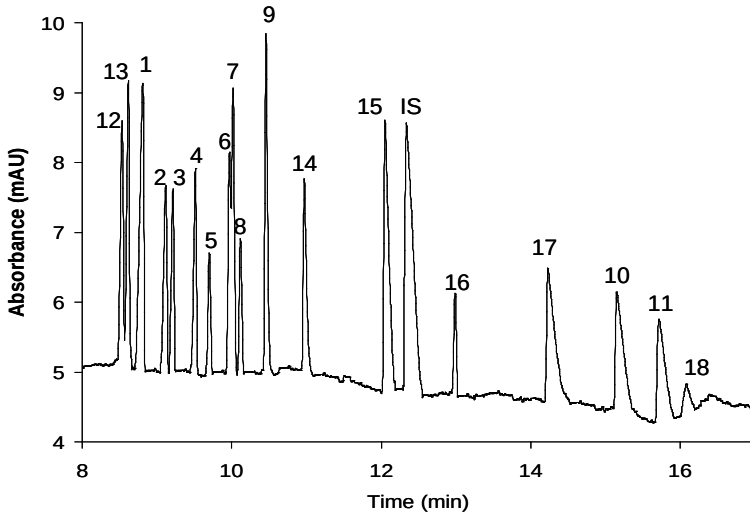


Figure II-I-4. Electropherogram of the 11 anions of interest + formate + 7 supplementary anions (potentially found in post-blast residues or interfering anions). Electrokinetic injection, 50 s, -2 kV. Bare fused-silica capillary, 50 µm I. D. × 96 cm (UV detection at 88.5 cm) modified with HDMB at 0.25 g in 100 mL ultra-pure water. BGE: 25 mM CrO_3, 25 mM Na_2CrO_4 and 100 mM Tris (pH 8.2), supplemented with 6 % EtOH (v/v). Temperature, 15 °C. Applied voltage, -30 kV. Indirect UV detection at 254 nm. Anion concentration, 20 mg L^{-1} each in ultra-pure water/BGE (9:1) mixture. Identification: chloride (1), nitrite (2), nitrate (3), thiosulphate (4), perchlorate (5), thiocyanate (6), azide (7), chlorate (8), sulphate (9), carbonate (10), phosphate (11), iodide (12), bromide (13), cyanate (14), fluoride (15), chlorite (16), acetate (17), oxalate (18), and formate (IS).

3.3.1 Selectivity

The CE method was developed with a mixture containing 11 targeted anions plus an internal standard anion (formate). The study was next completed by the analysis of a more complex mixture containing 7 other anions potentially found in post-blast residues or being present in

real matrices (and therefore possibly being interfering anions). Figure II-I-4 presents the resulting electropherogram obtained for the analysis of the 19 anions. No co-migration appeared and the added anions were fully resolved, showing the good selectivity of the CE method and its versatility.

3.3.2 Precision

The precision of the method was evaluated for a mixture of about 20 mg L^{-1} concentration for each anion by making three repeated analyses (n = 3) on three different days. Thus, standard mixtures and electrolytes were prepared daily. The responses measured on each electropherogram were the normalized area (A_i / $A_{formate}$) and the normalized migration time (t_{Mi} / $t_{M\ formate}$) of each peak. Method repeatability was characterized by the intra-day RSD and method intermediate precision was characterized by the intermediate precision RSD. One way analysis of variance (ANOVA) [31] was used to determine the intra-day (Eq. (2)) and the day-to-day (Eq. (3)) contributions. In the present study the day factor always appeared significant ($\alpha = 0.05$). The intra-day standard-deviation was denoted σ_r and the standard-deviation due to the day factor was denoted σ_d. The intermediate precision RSD, corresponding to the variability of a single determination carried out on a single day (Eq.(4)) was then calculated.

$$\mathrm{RSD}_{\text{intra-day}}\ (\%) = \frac{\sigma_r}{\bar{x}} \times 100 \qquad (2)$$

$$\mathrm{RSD}_{\text{day-to-day}}\ (\%) = \frac{\sigma_d}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{with} \quad \sigma_d^2 = \frac{q_d - q_r}{n} \qquad (3)$$

$$\mathrm{RSD}_{\text{intermediate precision}}\ (\%) = \frac{\sqrt{\sigma_d^2 + \sigma_r^2}}{\bar{x}} \times 100 \qquad (4)$$

where $\bar{x}$ is the mean of the response, and q_d and q_r the mean square of the day factor and the residual mean square of the ANOVA respectively.

To provide overall characterization of the method, pooled values of the RSDs for all the anions were also computed.

Results for normalized area and migration times are presented in Table II-I-1. For migration time, overall method repeatability was 2 % and overall method intermediate precision was 2.3 % but when the migration times were normalized by formiate migration time, the overall method repeatability RSD went down to 0.59 % and overall method intermediate precision to 0.72 % . Such quite acceptable values always inferior to 1% for normalized migrations times, should allow an easy and fast identification of peaks. If a doubt persisted on a peak identification, IC technique allowed the confirmation of its presence or absence. For normalized peak areas, overall method repeatability was 1.65 % and overall method

intermediate precision was 2.11 %. Moreover, all the intermediate precision RSD values ranged from 0.7 to 3.6 % which is always inferior to 5 %. Thus, the performances of the method complied requirements.

3.3.3 Linearity

The linear range of the method response function for the anions was expected between 2 and 20 mg L^{-1}. Indeed, this is the range used with the IC certified (ISO/CEI 17025) routine method at the police laboratory because, in most cases, the targeted anions are at this concentration level in the aqueous sample extracts, except for chloride and sulphate anions which are most often more concentrated. In this last case, the sample is analyzed a second time, after dilution with water by appropriate factor. This is why eventually this linear range over 1 order of magnitude is adapted to the requested applications. As the CE method was developed here with the goal of being complementary to the IC protocol used by French police, the linearity range was kept. The linearity of the method was evaluated by plotting the normalized area for each anion against the injected concentrations. Linear regressions were performed and coefficients of determination R^2 and residual standard deviations of the regressions were calculated and are given in Table II-I-1. It was checked that residuals of the regression were randomly distributed (for each calibration curve). This allowed to establish linearity for all the anions in the working range.

3.3.4 Limits of quantitation

For a signal to noise ratio of 10, the limits of quantitation (LOQ) were experimentally predetermined at 2 mg L^{-1} for all anions as in IC. Thus, these LOQs were checked with five solutions of all anions at 2 mg L^{-1} injected twice. At this concentration level, the maximum bias obtained for anions did not exceed 20 %, the higher limit fixed by the laboratory. Precision was also estimated and values for anions ranged between 2 and 9 % which fulfilled specifications. 2 mg L^{-1} level can be defined as low value of the quantitation range.

3.3.5 Sample stability

Sample stability was tested with two injections of the same sample of anions at 20 mg L^{-1} after a time space of one week. No significant modification in the normalized area was noted, except for carbonate and phosphate anions, for which the normalized areas varied from 0.83 to 1.12 and from 0.88 to 0.83, respectively. Carbonate anion can be used in some explosive

mixtures, but it may be also a contaminant, appearing within time, of the water used to extract the residues. Some care must be taken to limit its natural generation, such as properly closing the sample vials and totally filling them. For the case of phosphate anion, partial precipitation is anticipated and standard solutions should be prepared every day or two days.

3.3.6 Matrix effects

To evaluate potential matrix effects, the calibration lines with standards in pure water and in a given aqueous matrix extract were compared. The comparison was carried out on a statistical approach, based on the comparison of the two regression lines obtained from least-squares linear regression [32,33]. It involves three successive steps: (i) the residual variances of the regression must be homogeneous (bilateral F-test), (ii) in case residual variances were homogeneous, it was then possible to compare the slopes of the regression lines (bilateral t-test using the pooled standard-deviation of the slopes as denominator), and (iii) in case slopes were the same, it was finally possible to compare intercepts (bilateral t-test using the pooled standard-deviation of the intercepts as denominator). Statistically, it could be considered that two calibration lines were not significantly different only if residual variances of the regression lines, slopes, and intercepts could be considered simultaneously not significantly different. All statistical tests were carried out with a first kind risk α set at 1 %. All the results and conclusions are gathered in Table II-I-2 for the 11 tested matrices, of which the aqueous extracts varied in nature and ion contents. They were considered as blank matrices as they were not coming from post-blast places. Table II-I-3 also presents the conductivity values of the aqueous blank matrix extracts and also of real post-blast residues, either directly collected or via a cotton swab. It appears that the conductivity of the real soil extract belongs to the range of the tested blank soil extracts. Looking at the conductivity values of the different cotton extracts, the same conclusion can be drawn. This indicates that the samples used to evaluate matrix effect are closed to real post-blast residues extracts. In case a significant matrix effect was observed, the consequences of neglecting this matrix effect were evaluated by the maximum bias value (expressed as a percentage) that it could generate in routine analysis. This bias was calculated and the maximum acceptable value is 20 %. Among the 11 tested matrices, only plaster lead to aqueous extracts showing a non-negligible matrix effect according to anion quantitation as the bias was 24%, which was eventually a value not so far from the acceptation limit, especially considering the very high concentrations of sulphate and calcium ions present in its aqueous extract. Actually, about 75% of real residues are collected by the Police laboratory via a cotton swab, which is next extracted with water. Here, the 3 blank cotton extracts gave no or negligible matrix effect (the bias was inferior to the maximum acceptable value of 20 %).

Table II-I-1: Figures of merit for the analysis of the 11 anions of interest: intra-day (n = 3), day-to-day (n = 3) and intermediate precision, LODs, and detection linearity in the 2-20 ppm range.

Anions	normalized area			normalized t_M			LOD (mg L^{-1})	Least-squares linear regressions (n = 15)		
	RSD (%) intra-day	RSD (%) day-to-day	RSD (%) interme-diate precision	RSD (%) intra-day	RSD (%) day-to-day	RSD (%) interme-diate precision		equation	R^2	Residual standard deviation
Cl^-	0.64	0.23	0.68	0.44	0.62	0.76	0.50	0.0585x+0.0027	0.995	0.027
NO_2^-	1.28	0.33	1.32	0.47	0.64	0.78	0.39	0.0291x+0.0011	0.997	0.011
NO_3^-	1.94	0.65	2.07	0.97	0.51	1.09	0.61	0.0218x-0.0005	0.990	0.015
$S_2O_3^{2-}$	1.75	0.85	1.94	0.61	0.55	0.81	0.29	0.0364x-0.0141	0.992	0.022
ClO_4^-	2.85	2.22	3.61	0.72	0.34	0.79	0.43	0.0203x-0.0020	0.993	0.011
SCN^-	1.59	0.79	1.78	0.41	0.13	0.54	0.31	0.0358x-0.0153	0.998	0.014
N_3^-	0.96	0.89	1.31	0.56	0.23	0.61	0.37	0.0418x-0.0382	0.992	0.022
ClO_3^-	1.36	1.41	1.96	0.57	0.25	0.63	0.33	0.0284x+0.0174	0.991	0.019
SO_4^{2-}	1.21	1.34	1.81	0.54	0.22	0.59	0.64	0.0480x-0.0192	0.995	0.021
HCO_3^-	2.23	1.21	2.54	0.47	0.22	0.52	0.51	0.0345x+0.0214	0.987	0.017
HPO_4^{2-}	1.04	2.46	2.67	0.57	0.15	0.59	0.34	0.0102x-0.0140	0.991	0.021
Pooled	1.65	1.31	2.11	0.59	0.40	0.72				

Table II-I-2: Matrix and aqueous extract description, evaluation of matrix effects based on statistical analysis of calibration lines and the maximum bias value, expressed as a percentage, that it could be generated on quantitation in routine analysis.

Matrix	**Composition of the matrix aqueous extract (mg L^{-1})**		**Residual Variance homogeneity**	**Equality of slopes**	**Equality of intercepts**	**Matrix effect**	**Bias (%)**
	Anions	Cations					
Soil (blank 1)	NO_3^-: 20, HCO_3^-: 15-20, Cl^-: 3, SO_4^{2-}: 2	Nd[a]	Yes	No	No	Yes	15
Soil (blank 2)	NO_3^-: 61, Cl^-: 15, HCO_3^-: 15-20	Ca^{2+}: 28, Na^+: 7	Yes	No	No	Yes	17
Paper (blanm)	HCO_3^-: 15-20, Cl^-: 3, SO_4^{2-}: 2	Nd	Yes	Yes	Yes	No	0
Plastic (blank)	HCO_3^-: 15-20	Nd	Yes	Yes	Yes	No	0
Glass (blank)	HCO_3^-: 15-20	Nd	Yes	Yes	Yes	No	0
Metal (blank)	HCO_3^-: 15-20, Cl^-: 4, SO_4^{2-}: 3	Nd	Yes	No	No	Yes	18
Cloth (blank)	HCO_3^-: 15-20, Cl^-: 2, NO_3^-: ~1, SO_4^{2-}: ~1	Nd	Yes	No	No	Yes	17
Plaster (blank)	SO_4^{2-}: 435	Ca^{2+}: 760	Yes	No	No	Yes	24
Cotton (blank)	HCO_3^-: 15-20, Cl^- < LOQ	Ca^{2+} & Na^+ < LOQ	Yes	Yes	Yes	No	0
Cotton wiped over metal (blank)	HCO_3^-: 15-20, Cl^-: 2, SO_4^{2-}: 3	Ca^{2+}: 36, K^+: 6, Na^+: 2 & interfering metal cations	Yes	No	No	Yes	15
Cotton wiped over cloth (blank)	HCO_3^-: 15-20, Cl^-: 4, NO_3^-: 2	Na^+: 6, K^+: 2	Yes	No	No	Yes	9

[a]Nd: not determined.

So, it can be concluded that calibration lines obtained in pure water can be used for quantitative analyses of the aqueous matrix extracts by CE. For the few cases of samples having very high levels of some ions, and thus a high conductivity value inducing non-negligible bias on quantitation, only the results of IC would be considered, as the CE method is always performed in parallel with IC. It is worthwhile to note that during the full study, more than 15 highly different matrix extracts were analyzed and no relevant migration time shift was observed. Indeed, the RSDs of normalized migration time were in the range of 0.4-0.75% for all anions, even with the extracts obtained with plaster or cotton wiped over metal (blank), which are the 2 matrices leading to high level of some ions in their aqueous extracts. The peak shape stayed also correct. The developed electrophoretic method for the identification and the quantification of anions in real post-blast residues was thus validated. Its performances were in agreement with its requirements.

Table II-I-3: Conductivity (κ) and BGE to sample conductivity ratio (γ) values for blank matrices, crater soil extracts and several real post-blast residue extracts without and with a BGE addition to the sample. Values obtained at 25 °C. (κ_{BGE} = 0.709 S m^{-1})

Extract	Without BGE addition		With BGE addition	
	κ (S m^{-1})	γ (κ_{BGE}/ κ_i)	κ (S m^{-1})	γ (κ_{BGE}/ κ_i)
Soil (blank 1)	0.097	7.3	0.159	4.4
Soil (blank 2)	0.083	8.5	0.136	5.2
Soil (real)	0.078	9.8	0.132	5.4
Paper (blank)	0.008	90.9	0.077	9.2
Plastic (blank)	0.005	157.5	0.077	9.2
Glass (blank)	0.005	157.5	0.076	9.3
Metal (blank)	0.007	109.1	0.077	9.2
Cloth (blank)	0.009	77.9	0.081	8.7
Plaster (blank)	0.202	3.5	0.341	2
Cotton (blank)	0.004	177.2	0.076	9.3
Cotton wiped over metal (blank)	0.133	5.3	0.214	3.3
Cotton wiped over cloth (blank)	0.013	54	0.089	7.9
Cotton 1 wiped over metal (real)	0.008	90.9	0.084	8.4
Cotton 2 wiped over metal (real)	0.011	67.5	0.087	8.2
Cotton 3 wiped over platic (real)	0.018	40.1	0.091	7.8
Cotton 4 wiped over metal (real)	0.009	74.4	0.082	8.2

3.4 Applications to real samples

3.4.1 Matrix conductivities and interest of BGE addition

The studied aqueous matrix extracts, even of similar initial matrix nature, can have very different electric conductivities, which can create stacking or destacking phenomena and so

lead to non-reproducible analysis for different matrices. To insure reproducible injections, the BGE to sample conductivity ratios (noted γ) have to be close for each aqueous matrix extract. Table II-I-3 presents the experimental conductivity (κ) and γ values of blank and post-blast residue extracts obtained at 25 °C. The κ values were very scattered but always inferior to the BGE conductivity (κ_{BGE} = 0.709 S m^{-1}). As the sample conductivity is inferior to the BGE one, FESI can be implemented, but with variable enrichment factors, depending on matrix conductivity. The addition of 10 % BGE (v/v) in the extract before its injection may lead to matching the κ values, which gives, in that case, more reproducible electrokinetic injections and preconcentrations (see Table II-I-3), except for matrices having initially very high conductivities, as soil residue.

3.4.2 Real sample analysis

3.4.2.1 Detonator analysis

The analysis of detonators is only possible if the explosion fails. . In order to identify the employed detonators, an anion analysis can be carried out. Figure II-I-5 presents the analysis of a detonator composition, after extraction in pure water, with the developed method.The presence of lead in the extract created a yellow precipitate with chromate anion in the vial after the addition of 10 % (v/v) of BGE and only the supernatant was injected. The analysis of this extract showed the presence of azide anion at a low content (18 mg L^{-1}) and a large amount of nitrate anion, possibly due to its oxidation. Azide (stemming from lead azide) is one of the main anions entering the composition of detonators.

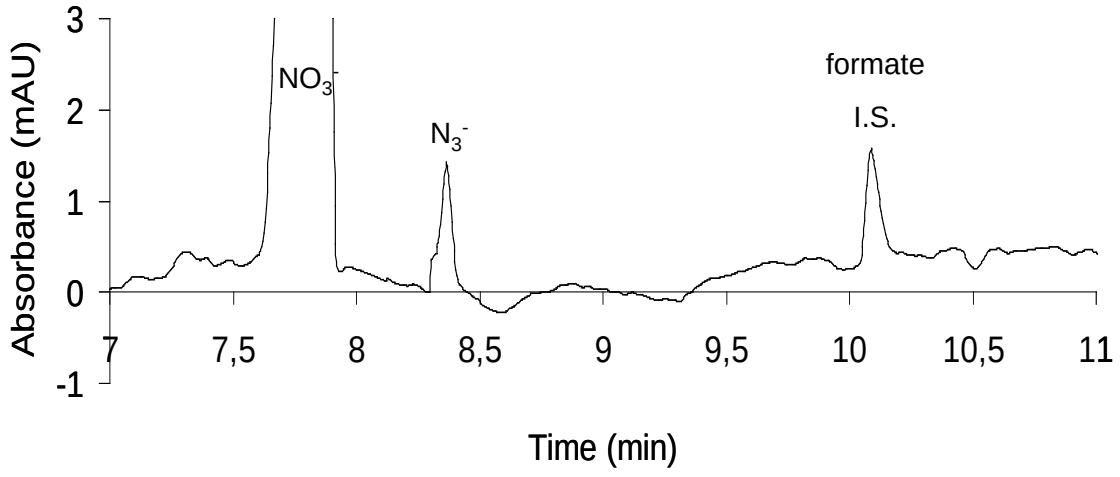


Figure II-I-5. Analysis of a detonator sample extract. Quantitation by this method yields 18 mg L^{-1} for azide anion and 2300 mg L^{-1} for nitrate anion. Separation conditions: see Figure II-I-4.

3.4.2.2 Analysis of real pipe-bomb residue cotton swabs : comparison with IC

After criminal explosion of pipe-bombs in public place, many residues were taken by cotton swabs which were next extracted with water. One representative extract corresponding to the swab of one pipe-bomb piece was analyzed after its dilution at 1/10 in ultra-pure water, in order to fix anion concentrations in the concentration linear range, and then after addition of 10 % of BGE before the injection. The obtained electropherograms and chromatograms are presented Figure II-I-6. Quantitative analysis by IC was performed with a calibration method previously developed in the police laboratory. The electropherogram from the pipe-pomb residues was characterized by the presence of chloride and chlorate anions at approximatively 16 and 30 mg L^{-1} respectively. Chlorate salts are often used in explosive compositions, their presence in a large amount clearly demonstrated its use in the explosive mixture. Other analyses performed on this sample such as cations and organic analyses determined that the explosive composition was a mixture of sodium chlorate and sugars. This sample also showed a high content of carbonate (26 mg L^{-1}). This anion, which was not searched in IC, can be used in some explosive mixtures, but it may also simply be a contaminant of the water used to extract the residues. Nevertheless, the fact that the carbonate content was superior to its natural rate suggests its use in an explosive composition. The content of sulphate and nitrate anions was so weak that it was impossible to determine if they were used in the conception of an explosive or naturally present in the matrix. Finally, quantitative results given by both techniques were close: on the chloride and chlorate peaks the obtained concentration difference between IC and CE was 5 % and 13 %, respectively. IC results were confirmed by CE, which also allows to reveal the potential presence of carbonate. As compared to IC, CE provides faster separation with less electrolyte consumption and under more cost-effective conditions.

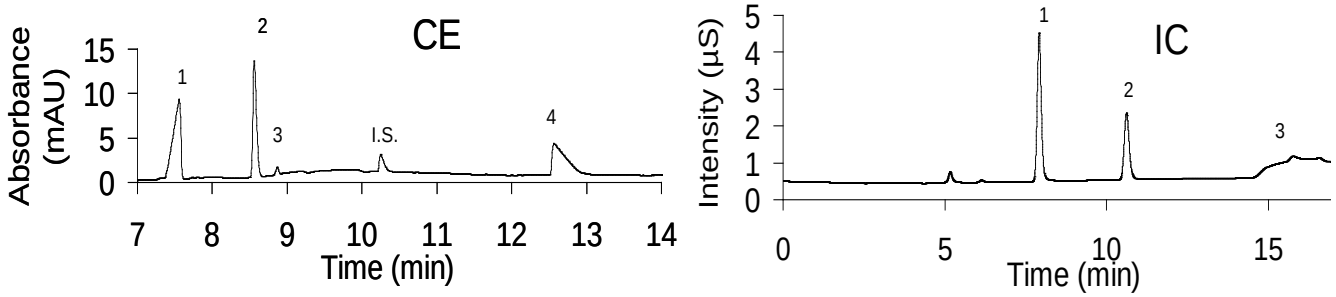


Figure II-I-6. CE and IC analysis of anions from an aqueous sample extract issued from post-blast residues. CE conditions, see Figure II-I-4. IC conditions, see section 2.4. Identification: (1) chloride (CE, 16.5 mg L^{-1}; IC, 15.7 mg L^{-1}), (2) chlorate (CE, 27.4 mg L^{-1}; IC, 31.3 mg L^{-1}), (3) sulphate (CE, < LOQ; IC, masked by the baseline), (4) carbonate (CE, 26 mg L^{-1}; IC, not searched), I.S.: formate.

3.4.2.3 Soil analysis

A soil sample originating from a crater created by explosions described previously was also directly extracted and analyzed in CE. After dilution of the aqueous extract at 1/50 in water in order to fix anion concentration in the linear range and the addition of 10 % BGE, the obtained electropherogram presented in Figure II-I-7 showed the same qualitative anionic composition that separation presented Figure II-I-6. Nevertheless, nitrate anion was detected (4 mg L^{-1}). This anion, is often naturally present in blank soil samples and thus in this analysis, nitrate anion was principally considered as an interfering anion. Chloride, chlorate, and sulphate anions were determined at about the same relative concentrations and within the same concentration range as those found in section 3.4.2.2. Some differences can be caused by a natural presence of these anions in soil, which increased their concentration. Unfortunately, no blank soil sample was taken near the explosion to confirm these anions presences.

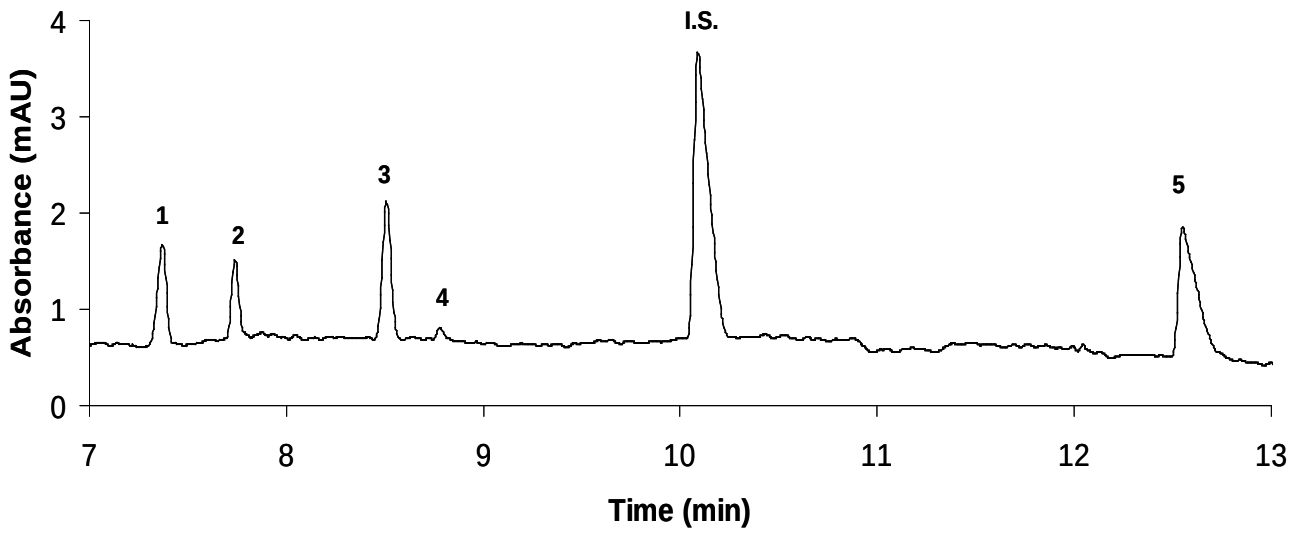


Figure II-I-7. CE analysis of anions in an aqueous extract of a soil originating from a pipe-bomb explosion crater. CE conditions, see Figure II-I-4. Identification: (1) chloride (3.8 mg L^{-1}), (2) nitrate (4 mg L^{-1}), (3) chlorate (10.4 mg L^{-1}), (4) sulphate (between LOD and LOQ), (5) carbonate (9 mg L^{-1}), I.S.: formate.

4. Conclusions

A CE method suitable for anions analysis in pre- and post-blast residues was developed. This method allowed the simultaneous separation of 19 targeted anions in less than 20 min.

Enrichment factors up to 20 were obtained by FESI with the addition of 10 % (v/v) of BGE in sample extracts before injection, which allowed to obtain LODs close to 0.5 mg L^{-1}. This method was validated and a substantial amount of work was dedicated to potential interfering anions and to the influence of matrix effects. Soil, metal, and cloth matrices presented significant matrix effects, but the maximum bias induced never exceeded 20 %, so these effects can be tolerated, considering the method requirements. Then real pre- and post-blast residue extracts originating from detonator and pipe-bomb explosions were analysed, showing good consistency with IC.

References

[1] Kolla P., *J. Chromatogr. A* 674 (**1994**) 309.
[2] Orson J. A., Bagby W. F.,. Perram G. P, *Infrared Phys. Tech*. 44 (**2003**) 101.
[3] Yang Y., Li Y., Wang H., Li T., Wu B., *Nucl. Instr. And Meth.A* 579 (**2007**) 400.
[4] Monteil-Rivera F., Beaulieu C., Deschamps S., Paquet L., Hawari J., *J. Chromatogr. A* 1048 (**2004**) 213.
[5] Groom C. A., Halasz A., Paquet L., Thiboutot S., Ampleman G., Hawari J., *J. Chromatogr. A* 1072 (**2005**) 73.
[6] Green M. C., Partain L. D., *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng*. 5048 (**2003**) 63.
[7] Sharma S. P., Lahiri S. C., *J. Energ. Mater.* 23 (**2005**) 239.
[8] McCord B. R., Hargadon K. A., Hall K. E., Burmeister S. G., *Anal. Chim. Acta*, 288 (**1994**) 43.
[9] Rudolph T. L., *Proceedings of the International Symposium on the Analysis and Characterization of Explosives, FBI Academy, Quantico, VA, March 29-31*, **1983**, FBI Quantico, VA, 1893, p. 213.
[10] Johns C., Macka M., Haddad P. R., *Electrophoresis* 24 (**2003**) 2150.
[11] Zemann A. J., *Trends Anal. Chem*. 20 (**2001**) 346.
[12] Hargadon K. A., McCord B. R., *J. Chromatogr*., 602 (**1992**) 241.
[13] Kishi T., Nakamura J., Arai H., *Electrophoresis* 19 (**1998**) 3.
[14] Doyle J. M., McCord B. R., *J. Chromatrogr. B*, 714 (**1998**) 105.
[15] Feng J., Guo B., Lin J. M., Xu J., Zhou H., Sun Y., Liu Y., Quan Y., Lu X., *Chin. J. Chromatogr*. 26 (**2008**) 667.
[16] Mikkers F. E. P., Everaerts F. M., Verheggen Th. P. E. M., *J. Chromatogr*. 169 (**1979**) 11.
[17] Chien R. L., Burgi D. S., *J. Chromatogr.* 559 (**1991**) 141.
[18] Hutchinson J. P., Evenhuis C. J., Johns C., Kazarian A. A., Breadmore M. C., Macka M., Hilder E. F., Guijt R. M., Dicinoski G. W., Haddad P. R., *Anal. Chem*. 79 (**2007**) 7005.
[19] Hutchinson J. P., Johns C., , Breadmore M. C., Hilder E. F., Guijt R. M., Lennard C., Dicinoski G., Haddad P. R., *Electrophoresis* 29 (**2008**) 4593.
[20] Wang J., Chen G., Muck Jr A., Collins G. E., *Electrophoresis* 24 (**2003**) 3728.
[21] Thormann W., Lurie I. S., McCord B., Marti U., Cenni B., Malik N., *Electrophoresis* 22 (**2001**) 4216.
[22] Tagliaro F., Bortolotti F., *Electrophoresis* 27 (**2006**) 231.
[23] Pumera M., *Electrophoresis* 27 (**2006**) 244.
[24] Tagliaro F., Bortolotti F., *Electrophoresis* 29 (**2008**) 260.
[25] Pumera M., *Electrophoresis* 29 (**2008)** 269.
[26] Heiger D. N., *High Performance Capillary Electrophoresis – An introduction*, Hewlett Packard Company, Waldbronn (Germany), **1992**.
[27] Harakuwe A. H., Haddad P. R., *J. Chromatogr. A* 834 (**1999**) 213.
[28] Sarmini K., Kenndler E., *J. Chromatogr. A* 792 (**1997**) 3.
[29] Descroix S., Varenne A., Adamo C., Gareil P., *J. Chromatogr. A* 1032 (**2004**) 149.
[30] Burgi D. S., Chien R. L., *Anal. Chem.* 63 (**1991**) 2042.
[31] Massart D. L., Vandeginste B. G. M, Buydens L. M. C, De Jong S., Lewi P. J., Smeyers-Verbeke J., Analysis of Variance, in *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, Part A*, Amsterdam, Elsevier, **1997**, pp121-150.
[32] Massart D. L., Vandeginste B. G. M, Buydens L. M. C, De Jong S., Lewi P. J., Smeyers-Verbeke J., Comparison of the slopes of two regression lines, in *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, Part A,* Amsterdam, Elsevier, **1997**, pp208-209.
[33] Commissariat à l'énergie atomique, Comparaison de plusieurs droites de régression, in *Statistique appliquée à l'exploitation des mesures*, Tome 2, Paris, Masson, **1978**, pp368-379.

2. Article – Analyse par électrophorèse capillaire de cations inorganiques dans des résidus post-explosion avec un électrolyte à base de guanidine et un capillaire modifié par une double-couche ionique

CAPILLARY ELECTROPHORESIS ANALYSIS OF INORGANIC CATIONS IN POST-BLAST RESIDUE EXTRACTS APPLYING A GUANIDINIUM-BASED ELECTROLYTE AND BILAYER-COATED CAPILLARIES

Cédric Sarazin[1,2], Nathalie Delaunay[2], Christine Costanza[1], Véronique Eudes[1], Pierre Gareil[2]

Electrophoresis, 32 (2011), 1282-1291

[1]Central Laboratory of the Préfecture de Police of Paris, 39 bis rue de Dantzig, 75015 Paris, France.
[2]Chimie-ParisTech, Laboratory of Physicochemistry of Electrolytes, Colloids and Analytical Sciences (PECSA), UMR 7195 CNRS, Paris06, Chimie-ParisTech, 11, rue Pierre et Marie Curie, 75231 Paris cedex 05, France

Keywords: CZE, inorganic-based explosives, fireworks, guanidinium cation, Successive Multiple Ionic-polymer Layer (SMIL)
Non standard abbreviations: Carcinogenic, Mutagenic and Reprotoxic (CMR), Dextran sulphate (DS), Hexadimethrine bromide (HDMB), Ion Chromatography (IC), Monomethylammonium (MMA), Polyvinylsulfonate (PVS), Successive Multiple Ionic-polymer Layer (SMIL).

Abstract

A new CE method was developed for the identification and quantitation of inorganic cations in post-blast residues. The simultaneous analysis in 20 min total runtime of 8 cations in post-blast residues (ammonium, potassium, monomethylammonium, calcium, sodium, magnesium, strontium), plus lithium cation as internal reference, was carried out with a BGE involving a non-CMR (carcinogenic, mutagenic, and harmful to reproduction) chromophore (guanidinium

cation) and a double-layer modified capillary (hexadimethrine bromide / polyvinylsulfonate). A study of UV detection conditions using guanidinium ion as probe led us to set the analysis and reference wavelengths and their associated bandwidth as well as the probe concentration fixed at 15 mM. The successive multiple ionic-polymer layer (SMIL) approach limited the cation adsorption on capillary wall and improved the EOF stability. These caused a significant improvement in method repeatability. Intermediate precisions were 2.4 % for corrected areas and 1.3 % for normalized migration times. Limits of detection close to 1 mg L^{-1} for all cations were obtained. The matrix effects were studied with chemometric approach for different matrices representative of those collected after explosion. Tests with blank matrix extracts of soil, cloth, and with simulated matrix extract containing 800 mg L^{-1} Ca^{2+} and 500 mg L^{-1} Fe^{2+} were carried out and no significant matrix effects were observed. Finally, analyses of real residues collected after cash dispenser and homemade firework explosions demonstrate excellent correlation between the CE results and those obtained with the ion chromatography method used routinely.

Introduction

The determination of cations, such as ammonium, monomethylammonium (MMA), potassium, and alkaline-earth cations in post-blast residues is critical for the characterization and identification of original explosive compositions. Indeed they can be used in commercial explosives, such as Ammonium Nitrate-Fuel Oil [1], improvised explosives, black powder, and fireworks [2]. Ion Chromatography (IC) has been currently used for determining the main components of inorganic explosives [1, 3-5] but there is a need for an additional technique to confirm the presence of interest ions such as scanning electron microscopy-energy dispersion analysis X-Ray [6], infrared [7], X-Ray diffraction [8]. Since twenty years, CE, in capillary or, more recently, in microfluidic chip formats, has provided a complementary technique as is described in several reviews [9-13]. For cation analyses in explosives and post-blast residues published in literature, only indirect UV and conductivity detection modes have been involved and all the separations have been carried out in bare fused-silica capillaries [14-18].
This work was focused on the development of a CE method allowing the analysis of 9 targeted cations (ammonium, potassium, monomethylammonium, calcium, sodium, magnesium, strontium, barium, and aluminum), 9 interfering cations (iron(II), iron(III), copper, cesium, lead, zinc, nickel, cobalt, and manganese), and lithium (internal reference). This method had to be complementary to the IC method used by the laboratory of the Prefecture de Police of Paris for the analysis of cations in aqueous extracts from post-blast residues and was aimed to complete the previously published CE method for the analysis of the inorganic anions [19]. The method consisted in the CE separation and indirect UV

detection of 19 anions with a chromate-based electrolyte. A fast and simple sample preparation and injection steps were involved allowing the analysis of a large variety of matrices without matrix effect and with LODs close to 0.5 ppm thanks to an electrokinetic preconcentration step.

The lack of UV absorbance of cations of interest oriented us towards the indirect UV approach, which places a major role on the choice of the chromophore. Imidazole and pyridine are probes which are classified as CMR, also, their uses are not recommended for laboratories. Creatinine and ephedrine were not classified CMR but they have too low electrophoretic mobilities compared to those of the cations of interest, which is not favourable for the separation efficiency [20-21]. Guanidinium cation is a non-CMR compound and described as the best chromophore with respect to sensitivity for alkali and alkaline-earth cations due to its high electrophoretic mobility ($64x10^{-5}$ cm^2 V^{-1} s^{-1} at 25 °C) close to those of the targeted cations [21]. Therefore, this chromophore was selected in this study.

For the first time for inorganic cation analyses, a double layer modified capillary was also used. Generally, inorganic cation analyses were carried out with bare-fused silica capillaries and a BGE of rather low pH [20]. But such pH values can create unstable EOF and bare-fused capillary walls may also adsorb targeted analytes. For these reasons, the SMIL approach, which created a non-covalent anionic bilayer coating, was tested [22-25]. Applying this method along with a simple and fast procedure of sample preparation, a large variety of matrix aqueous extracts were analysed. The matrix effects were checked with chemometric approach for different matrices. Finally, CE results obtained for real sample extracts, from cash dispensers attacked with explosives in Paris suburb and pyrotechnic devices, were compared with those produced by IC.

1. Materials and methods

1.1. Standards and electrolytes

All cationic standard samples were purchased from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). 1000 mg L^{-1} individual cation solutions in 3 % HNO_3 were prepared weekly by volumetric dissolution in ultra-pure water delivered by a Direct-Q3 UV system (Millipore, Molsheim, France). A standard mixture of the cation of interest was prepared daily (15 mg L^{-1} each in ultra-pure water). BGE was prepared with guanidinium acetate (Sigma-Aldrich, L'Isle d'Abeau, France), used as cationic chromophore buffered with acetic acid (VWR), and 18-Crown-6 ether (18-C-6) (Sigma-Aldrich) used as selectivity modifier. The final composition of the background electrolyte (BGE) was: 15 mM guanidine acetate adjusted at pH 4.0 with acetic acid, and 3 mM 18-C-6 mixed daily. Hexadimethrine bromide (HDMB, or polybrene) used as first layer coating agent, and dextran sulphate sodium salt (DS) (M_w 9000 – 20,000)

and polyvinylsulfonic acid sodium salt (PVS) (25 % w/w in H_2O), used as second layer agent, were purchased from Sigma-Aldrich.
HDMB and DS solutions at 1 g / 100 mL and 0.1 g / 100 mL, respectively, were prepared by dissolving the appropriate amounts in ultra-pure water. PVS solutions at the desired concentrations were prepared by volumetric dilution in ultra-pure water.

1.2. Real samples preparation

Real samples were obtained after explosive attack against cash dispensers in Paris suburb and after homemade explosions of firecrackers of K1 category and pyrotechnic fountain. Firecrackers and pyrotechnic fountain explosions were carried out simultaneously on blank matrices (soil, cloth and metal plate) collected in or near the laboratory. Blank matrices and post-explosion residues were collected either directly or via cotton swabs. The first step of this last procedure consisted in the purification of usual hydrophilic cotton swabs by assisted solvent extraction using an ASE 200 instrument (Dionex), with one cycle of 5 min at 100 °C and 100 bar with water and next with acetone. Cotton swabs moistened with water were next wiped over samples and were used for inorganic analysis. Post-blast residues, cotton swabs, and blank samples were next extracted in hot water placed in a sonication bath for 10 min. The obtained solutions were filtered through a 150-µm cellulose filter (Les Filtres Durieux, Marne-la-Vallée, France) and a 0.45-µm nylon syringe filter (Teknokroma, A.I.T France, Houilles, France) just before the injection.

1.3. Apparatus

Development and validation of the CE method were carried out with a Beckman Coulter P/ACE MDQ system (Villepinte, France) equipped with a DAD set at 190 nm (analysis wavelength) and 300 nm (reference wavelength) and with bandwidths set at ± 4 nm and ± 40 nm, respectively. Vials in polypropylene were used to stock cation solutions in the apparatus. Instrument control and data acquisition were performed using 32 Karat® software. A Dionex DX120 (Voisins-Le-Bretonneux, France) ion chromatograph equipped with a suppressed conductivity detector (Dionex CSRS-4 mm suppression and conductivity cell) was used for comparison purposes. Instrument control and data acquisition were performed using Chromeleon 6.8® software. A 25-µL loop was employed for the cation injections. A Varian Cary 100 UV spectrometer, purchased from Bioserv (Thiais, France), was used to monitor guanidinium UV spectrum.

1.4. Electrophoretic procedures

Electrophoretic separations were performed using 75 µm id x 80 cm bare fused-silica Polymicro capillaries purchased from Photonlines (Marly-Le-Roi, France). A detection window was created for the UV detection at 10 cm from the anodic end. Before first use, capillaries were conditioned by successive flushing with 1 M NaOH, 0.1 M NaOH, ultra-pure water, HDMB solution, PVS or DS solution, and finally BGE, each under 2.8 bar for 3 min (12 capillary volumes), except for PVS or DS flushes which were under 1.4 bar for 5 min (10 capillary volumes) in order to have a better coating due to a lowest reaction kinetics. Every ten analyses, the double layer coating was removed and regenerated by percolating successively 1 M HCl, 0.1 M NaOH, and ultra-pure water under 2.8 bar for 3 min (12 capillary volumes), HDMB solution under 2.8 bar for 1 min (4 capillary volumes), PVS or DS solution under 1.4 bar for 3 min (7 capillary volumes), and BGE under 2.8 bar for 3 min (12 capillary volumes). Between each run, PVS or DS layers were renewed (1.4 bar for 3 min), and followed by the percolation of BGE (2.8 bar for 3 min). Injections were performed hydrodynamically under 50 mbar for 4 s (0.6 % of the capillary volume). Separations were run at 20 °C or 25 °C, according to cases, under 30 kV. BGE was changed between each run.

1.5. Chromatographic procedures

Chromatographic separations were performed at 32 °C with a Dionex CS12 column (250 x 4 mm) equipped with a Dionex CG12 guard column (50 x 4 mm) coupled to a CSRS-4 mm suppressor. Eluent gradients were generated using the Dionex ECG II-MSA cartridge, used as mobile phase. The optimized eluent gradient of the mobile phase was: 0-2 min: 20 mM isocratic; 2-10 min: gradient from 20 to 35 mM; 10-25 min: 35 mM isocratic, with a flow-rate of 0.8 mL min^{-1}. Separations were monitored by suppressed conductivity detection at 35 °C with continuously regenerated anion trap column (Dionex CR-ATC) inserted after the separation column. All this procedure was previously optimized and conducted routinely (certification ISO/CEI 17025).

1.6. Chemometric approach of matrix effects

Chemometric studies of matrix effects were carried out with five repeated injections for five different cation concentrations (2, 5, 10, 20, and 30 mg L^{-1}) in ultra-pure water for the standard calibration and three repeated injections for five cation concentrations (2, 5, 10, 20, and 30 mg L^{-1}) in given blank matrix extracts (cloth, soil, and cotton) and in simulated matrices containing iron(II) and calcium ions. When matrices already contained some cations,

additional spiking was performed. Statistical parameters of the regression lines were computed with Excel® software (Microsoft).

2. Results and discussion

2.1. Optimization of indirect UV detection conditions with guanidinium cation as chromophore

The use of guanidinium cation as chromophore in CE has not been so much documented in the literature. In order to separate the alkali and alkaline-earth cations, and transition metals in the best conditions, the influence on S/N of several detection conditions was investigated.

2.1.1 Wavelengths and bandwidths

The UV spectrum of the guanidinium probe was recorded in aqueous solution of 10 mM guanidinium acetate, adjusted at pH 4.0 with acetic acid. As shown in Figure II-I-8A, a single narrow absorbance band maximum at around 190 nm was obtained. Then, the choice of the UV detection conditions with the DAD was made with the calculation of S/N for MMA at 15 mg L^{-1} and for different analysis and reference wavelengths and bandwidths (Figure II-I-8B). S/N was thus maximum for an analysis wavelength fixed at 190 nm and a bandwidth of ± 4 nm (ε = 500 L mol^{-1} cm^{-1}). S/N decreased by a factor of 2 when it was fixed at 195 nm for all reference wavelengths (400 nm on Figure II-I-8B1). Beckman apparatus does not allow measurements below 190 nm. An increase in S/N was obtained when the reference wavelength was varied from 400 nm to 300 nm and the highest S/N was calculated for a reference bandwidth of ± 40 nm. Finally, best UV detection conditions were met at $\lambda_{analysis}$ = 190 ± 4 nm and $\lambda_{reference}$ = 300 ± 40 nm.

2.1.2. Guanidinium concentration

With the optimized UV detection conditions, the variation of the BGE absorbance was plotted against guanidinium concentration. The absorbance was linear from 0 to about 18 mM. This narrow linearity range can be explained by the steepness of the absorbance UV spectrum at the detection wavelength, resulting in important variation in extinction coefficient over the selected bandwidth. The efficiency of the MMA peak was next measured as a function of guanidinium cation concentration over the range 2-15 mM. The efficiency varied from 65,000

at 5 mM to 121,000 at 10 mM and 198,000 at 15 mM. A guanidinium concentration of 15 mM was thus retained for further experiments.

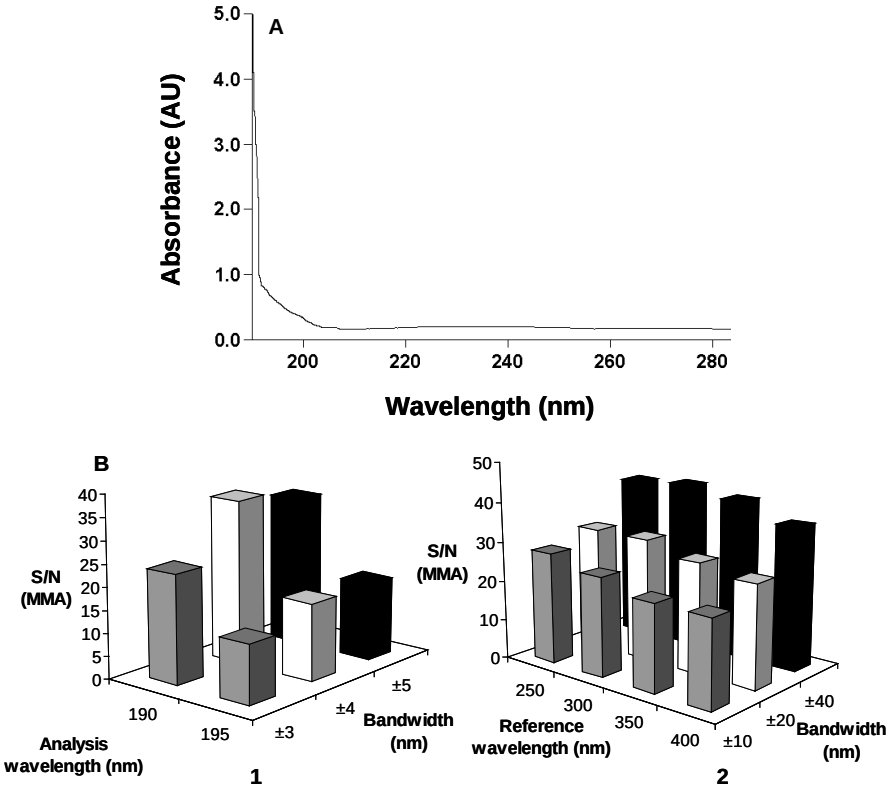


Figure II-I-8. (A) UV spectrum of an aqueous solution of 10 mM guanidinium acetate adjusted at pH 4.0 with acetic acid. Optical path length: 1.0 cm. (B) variation of S/N for MMA with the analysis wavelength and its bandwidth ($\lambda_{reference}$ fixed at 400 ± 10 nm) (1) and with reference wavelength and its bandwidth ($\lambda_{analysis}$ fixed at 190 ± 4 nm) (2). Separation conditions: bare fused-silica capillary, 75 µm id × 80 cm (UV detection at 70 cm); BGE: 10 mM guanidinium acetate adjusted at pH 4.0 with acetic acid; temperature, 25 °C; applied voltage, +30 kV; hydrodynamic injection, 50 mbar, 4 s; MMA concentration, 15 mg L^{-1} in ultra-pure water.

2.2. Implementation of the SMIL approach: choice of PVS as second layer coating agent

The presence of silanol groups on the capillary wall favors the adsorption of cations, and this may results in irreproducible EOF especially with sample matrices having high level of mono and multivalent cations. Thus, the SMIL approach was used to limit this phenomenon. The SMIL approach consisted in the creation of a stable, pH-independent and negatively charged capillary. The first cationic HDMB layer is sandwiched between the capillary wall and an anionic polymer coating, DS or PVS. This SMIL approach was thus evaluated with HDMB / DS and HDMB / PVS coatings. With a BGE composed of 15 mM guanidinium acetate adjusted at pH 4.0 with acetic acid, the electroosmotic mobility measured in a bare fused-

silica capillary was unstable (μ_{EOF} = 4.2 ± 2.3 x 10^{-5} $cm^2 V^{-1} s^{-1}$, n = 5). Moreover, electroosmotic mobilities measured with 15 mM ionic strength guanidinium acetate buffers between pH 3.0 and pH 6.0 decreased from pH 6.0 (μ_{EOF} = 8.4 ± 1.8x10^{-5} $cm^2 V^{-1} s^{-1}$, n = 5) to pH 3.0, where it was almost suppressed at pH 3.0 (μ_{EOF} = 0.8 ± 1.1x10^{-5} $cm^2 V^{-1} s^{-1}$, n = 5). After coating with HDMB / DS or HDMB / PVS solutions, μ_{EOF} was stable at around 35 ± 2.2x10^{-5} $cm^2 V^{-1} s^{-1}$ and 28 ± 1.4x10^{-5} $cm^2 V^{-1} s^{-1}$, respectively (n = 3). A pH-independent cathodic EOF was thus obtained with this approach.

The influence on EOF stability, peak efficiency and capillary-to-capillary reproducibility of the nature of the second layer coating (PVS or DS), after a first coating with HDMB solution, was studied. The EOF stability was first evaluated for a same capillary with five replicate EOF measurements in acetate buffer at pH 4.0 containing 15 mM guanidinium and between each measurement, the double coatings were totally regenerated. The RSD on μ_{EOF} was inferior with PVS solution (1.4 % for PVS and 3.4 % for DS). Moreover, MMA and Ca^{2+} at 15 mg L^{-1} gave peak efficiencies which are superior with PVS solution (204,000 against 175,000 for MMA peak and 254,000 against 197,000 for Ca^{2+} peak). Next, the study of the capillary-to-capillary double coating reproducibility led to the conclusion that PVS coating was more reproducible than DS coating (RSD (PVS) = 1.1 % and RSD (DS) = 2.5 %, n = 3). For these reasons, PVS was chosen as second layer for the SMIL approach.

2.3. Resolution optimization

2.3.1. PVS concentration in the second layer solution

The PVS concentration in the second layer solution affects the electroosmotic velocity. Indeed, the higher is the charge density on the capillary wall, the faster is the electroosmotic velocity, which may deteriorate peak resolution. For PVS contents higher than 0.1 % (w/w), EOF mobility was constant at a value around 35x10^{-5} $cm^2 V^{-1} s^{-1}$ (BGE: 15 mM guanidinium acetate adjusted at pH 4.0 by acetic acid) which should correspond to the plateau of the adsorption isotherm. Under this high EOF condition, the set of the 11 cations migrated under only 3 peaks. A decrease in the PVS content in the second layer solution induced a decrease in the EOF and the best separation was obtained for a PVS concentration of 0.01 % (w/w) in the second layer solution. At this concentration, potassium and ammonium cations, which almost have the same electrophoretic mobility, comigrated, as well as strontium and sodium cations. The repeatability of this coating was checked by repeatedly measuring EOF in the BGE, after total regeneration of the double layer, and a value of 12x10^{-5} $cm^2 V^{-1} s^{-1}$ was obtained for μ_{EOF} with a RSD of 1.5 % (n = 10).

2.3.2. Addition of 18-C-6 in BGE

As it is well known, the separation between K^+/NH_4^+ and Sr^{2+}/Na^+ is favoured by complex formation with 18-C-6 [15, 26-28]. In fact, the ionic radii of potassium (1.38 Å), barium (1.36 Å), and to a lesser extent strontium (1.16 Å) are very similar to the cavity size of 18-C-6 (1.38 Å) [28]. Therefore, cations fit inside the cavity of the 18-C-6 ether, slowing down their migrations. The influence of the 18-C-6 concentration on the selectivity was studied in the 0-6 mM range, keeping the guanidinium concentration constant (15 mM) in the acetate buffer at pH 4.0. Figure II-I-9 presents a plot of normalized migration time, referenced to lithium ion, versus 18-C-6 concentration. As expected, potassium, strontium, and barium cations were the most affected by 18-C-6 concentration. Thus, an increase in the 18-C-6 concentration induced a modification of selectivity and the analytes were well-resolved with an 18-C-6 concentration of 3 mM.

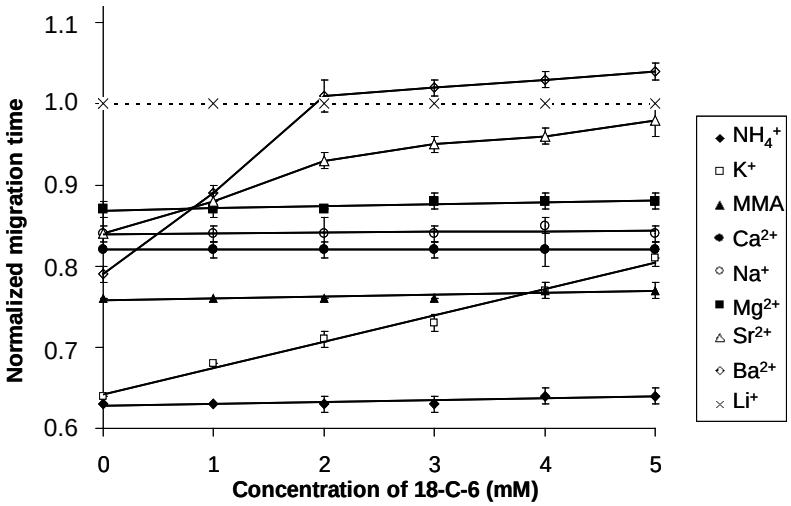


Figure II-I-9. Variations of the normalized migration time (t_i / t_{Li}) of the cations of interest as a function of the concentration of 18-C-6 in the BGE (15 mM guanidine acetate adjusted at pH 4.0 with acetic acid).

2.3.3. Effect of temperature

With the developed BGE (15 mM guanidine acetate adjusted at pH 4.0 with acetic acid plus 3 mM 18-C-6), the resolution between Ca^{2+} and Na^+ was only 1.0 at 25 °C. However, according to the records of the police laboratory, these cations are likely to be present in large amount in real samples. An improvement in the resolution was mandatory in order to avoid peak overlap. As no effect of pH between 3.5 and 4.5 was observed, the effect of temperature was investigated. In effect, a decrease in temperature is expected to increase BGE viscosity (2-3 % per °C) and to reduce electrophoretic and electroosmotic mobilities, thus improving

resolution. Actually, resolution between Ca^{2+} and Na^{+} at 20 °C was raised to 2.6. Consequently, all the separations were next performed at 20 °C.

An electropherogram obtained with previously fixed parameters is shown Figure II-I-10. All cations of interest (arabic numbers) migrated in less than 9 min, and no comigration with interfering cations (capital letters) was noticed. Obtained LODs (calculated for a S/N of 3) varied from 0.6 mg L^{-1} (25 µM) for sodium cation to 1.1 mg L^{-1} (8 µM) for barium cation, which is in the range requested by the police laboratory. The performances obtained with microchip format were almost similar: LODs were in the range of 1-50 µM and even if the speed of analysis was shorter, the detected peaks were less numerous (4 peaks in 50 s for chip format versus 13 peaks in 9 min for capillary format) [29,30]. The separation developed on portable CE with conductivity detection by Hutchinson et al. appeared more sensitive (30 µg L^{-1}) but similar in linearity range and reproducibilty [18]. It was important to note, that with the used BGE, aluminum and iron(III) cations were not detected, probably due to their precipitation at pH 4.0. Iron(III) was considered as interfering cation and its absence in the electropherogram was an advantage, whereas for aluminum cation, which can be used in explosive compositions, a CE method was already developed by our group and conducted routinely when the presence of aluminum is suspected [31].

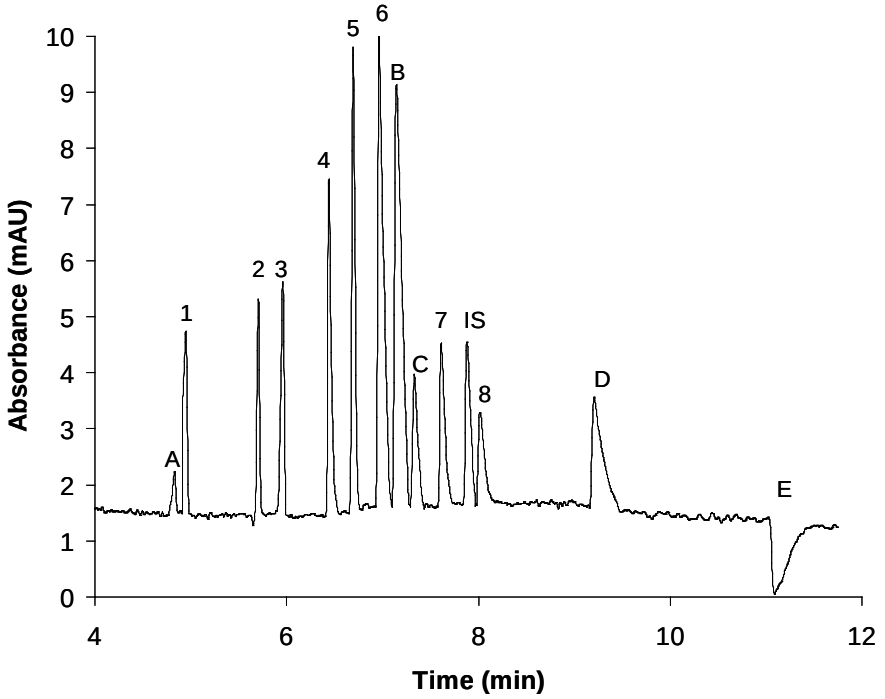


Figure II-I-10. Electropherogram of the 9 cations of interest (1-8) + lithium (IS) + 9 supplementary cations potentially found in post-blast residues or interfering cations (A-E). Bare fused-silica capillary, 75 µm id × 80 cm (UV detection at 70 cm) modified by (i) 1 g / 100 mL HDMB solution and (ii) 0.01 % (w/w) PVS. BGE: 15 mM guanidinium acetate adjusted at pH 4.0 with acetic acid. Temperature, 20 °C. Applied voltage, +30 kV. Hydrodynamic injection, 4 s, 50 mbar. Indirect UV detection at 190 nm. Cation concentrations, 15 mg L^{-1}, except for Li^{+}, 2 mg L^{-1}, and lead(II), 50 mg L^{-1}. Identification: ammonium (1), K^{+} (2), monomethylammonium (3), Ca^{2+} (4), Na^{+} (5), Mg^{2+} (6), Sr^{2+} (7), Ba^{2+} (8), Cs^{+} (A), iron(II) + cobalt(II) + manganese(II) + nickel(II) (B), zinc(II) (C), copper(II) (D), lead(II) (E), and Li^{+} (IS). Iron(III) and aluminum(III), non detected.

2.4. Validation

The validation of the developed method was carried out in order to establish that it could be applied routinely to the quantitative analysis of cations in post-blast residue extracts. Precision and accuracy of the method had to be better than 5 % and 20 %, respectively, the usual criteria used by the laboratory of the Prefecture de Police of Paris.

2.4.1. Selectivity

The selectivity of the developed method was checked by adding to the sample 9 other cations potentially found in post-blast residue extracts or present in real matrices (see Figure II-I-10). No co-migration appeared between cations of interest and interfering cations. Iron(II), cobalt, manganese, and nickel cations migrated under a single peak due to their close electrophoretic mobilities [32]. Lead was detected as a negative peak due to its complexation with acetate, which directly absorb. The selectivity and the versatility of the CE method were proved.

2.4.2. Precision

The precision of the method was evaluated for each cation with a mixture at about 15 mg L^{-1} each by making five repeated analyses (n = 5) on three different days. Standard mixtures, electrolytes, and bilayer coating solutions were prepared daily. The corrected peak areas (areas divided by migration times) and normalized migration times (reference Li^+ peak) were measured on each electropherogram. Method repeatability was characterized by the intra-day RSD, and intermediate precision by the intermediate precision RSD, which corresponded to the variability of a single determination carried out on a single day. ANOVA was used to determine the intra-day and the day-to-day contributions [33]. The pooled values of RSDs for all cations were also computed to characterize the method. Obtained results are presented in Table II-I-4. For migration times, overall method repetability was 3.2 % and overall intermediate precision was 3.8 %, but with the normalization by lithium ion migration time, the overall method repeatability went down to 0.75 % RSD and overall intermediate precision to 1.27 % RSD. These results should allow an easy and fast identification of peaks. IC results and spiking can confirm the identification if a doubt persists. For corrected areas, all the intermediate precision RSD values ranged from 1.33 and 3.45 % RSD and overall method repeatability was 1.87 % RSD, which is inferior to 5 %. The performances of the method complied requirements.

2.4.4. Linearity

The expected linear range of the response was 3-30 mg L^{-1}, which is that exploited in the certified (ISO/CEI 17025) IC method used in routine at the police laboratory. This range corresponded generally to the concentration level of targeted cations in aqueous sample extracts, except for sodium and calcium cations which are most often more concentrated. In this case, a second analysis is carried out with an appropriate dilution factor. The linearity of the method was evaluated by plotting the corrected area for each cation against the injected concentrations. Linear regressions were performed and coefficients of determination R^2 and residual standard deviations of the regressions were calculated and are presented in Table II-I-4. It was checked that residuals of the regression were randomly distributed (for each calibration curve). This allowed establishing linearity for all the cations in the working range.

2.4.4. Limits of quantitation

For a signal to noise ratio of 10, the LOQs of the method were experimentally predetermined at around 3 mg L^{-1} for all cations. These LOQs were next checked with five solutions of all cations at 3 mg L^{-1}, injected twice on five days. The maximum bias obtained for cations did not exceed 20 %, the highest requested value fixed by the police laboratory. 3 mg L^{-1} can be considered as the low level of the quantitation range.

2.4.5. Matrix effects

Currently, in the police laboratory, 85 % of real residues consisted of soil, metal, plaster, and cloth matrices. For metal, plaster, and cloth matrices, the extraction can be carried out directly in water or via a cotton swab, itself extracted in water. So, matrix effects were evaluated in five representative blanks or simulated matrices: soil, cotton and cotton swab wiped over cloth blanks, and 500 mg L^{-1} iron(II) or 800 mg L^{-1} calcium solutions simulating metal and plaster matrix extracts, respectively. The ionic composition of these matrices is presented in Table II-I-5. To evaluate potential matrix effects, the calibration lines with standards in pure-water and in given aqueous matrix extracts were compared. The comparison was carried out using a statistical strategy, based on the comparison of the two least-squares linear regression lines obtained [34]. This involves three successive steps: (i) the residual variances of the regression must be homogeneous (bilateral F-test), (ii) if yes, it was then possible to compare the slopes of the regression lines (bilateral t-test using the pooled standard-deviation of the slopes as denominator), and (iii) in case slopes were the same, it was finally possible to

Table II-I-4. Figures of merit for the analysis of the 8 cations of interest: intra-day (n = 5), day-to-day (n = 5) and intermediate precision, LODs, and detection linearity in the 3-30 ppm range.

Anions	corrected areas			normalized migration times			LOD (mg L^{-1})	Least-squares linear regressions		
	RSD (%) intra-day	RSD (%) day-to-day	RSD (%) interme-diate precision	RSD (%) intra-day	RSD (%) day-to-day	RSD (%) interme-diate precision		Equation (x in mg L^{-1})	R^2	Residual standard deviation
NH_4^+	1.24	0.98	1.33	1.18	0.03	2.39	0.9	161.1x+110.2	0.997	91.6
K^+	1.65	0.74	1.99	1.10	0.01	1.76	1.0	81.7x+73.35	0.994	64.8
MMA	1.74	0.47	2.35	0.95	0.02	1.27	0.9	111.6x+65.7	0.995	83.7
Ca^{2+}	1.29	1.23	2.21	0.62	0.03	1.82	0.8	154.4x+56.4	0.996	108.5
Na^+	3.21	2.22	3.45	0.65	0.02	1.18	0.6	171.8x+153.2	0.990	185.9
Mg^{2+}	1.12	0.41	1.47	0.63	0.01	1.14	0.7	310.4x+3.54	0.998	159.3
Sr^{2+}	2.21	0.69	2.65	0.55	0.02	1.20	1.0	95.2x-0.87	0.992	90.2
Ba^{2+}	2.32	0.74	2.57	0.12	0.01	0.24	1.1	63.7x+31.6	0.996	42.6
Pooled	1.87	1.01	2.39	0.75	0.02	1.27				

compare intercepts (bilateral t-test using the pooled standard-deviation of the intercepts as denominator). Statistically, it could be considered that two calibration lines were not significantly different only if residual variances of the regression lines, slopes, and intercepts could be considered simultaneously not significantly different. All statistical tests were carried out with a first kind risk α set at 1 %. All the results and conclusions are presented in Table II-I-5 for the tested matrices.

The low injected sample volume (~0.7 % capillary volume) prevented from potential electric field perturbation caused by introducing a potential high-conductivity plug. Indeed, no variation of normalized migration times and efficiencies was noticed according to the matrices. A significant matrix effect on reduced areas was observed for the matrix extracts having high level of Fe^{2+} or Ca^{2+}. Nevertheless, this resulting bias was lower than or equal to 9 %, which is inferior to the laboratory specification fixed at 20 %. Thus calibration lines obtained in ultra-pure water can be used for the quantitation of cations. It is worthwhile to note that with simulated iron- and calcium-based matrices, the high content of matricial cations did not prevent the detection and quantitation of close migrating cations (sodium, magnesium, and strontium).

The developed electrophoretic method for the identification and quantitation of cations in post-blast residues was thus validated. Its performances were in agreement with the requirements of the police laboratory.

2.5. Real sample analysis

2.5.1. Explosive residues collected after attacks on cash dispensers - Comparison with IC results

After explosive attacks on cash dispensers in Paris suburb, many residues were wiped with cottons which were next extracted with water. Two representative extracts corresponding to swabs carried out on a cash dispenser (extract 1) and on the wall close to the cash dispenser (extract 2) were analyzed by IC and CE. Extract 1 was analyzed without dilution, whereas extract 2 was analyzed with a dilution factor of 100, in order to fix cation concentrations in the concentration linear range. The obtained electropherograms and chromatograms are presented in Figure II-I-11. Quantitative analysis by IC was performed with calibration method previously developed in the laboratory. The electropherogram from the extract 1 was characterized by the presence of 5 cations of interest in low amount.

Table II-I-5. Evaluation of matrix effects based on statistical analysis of calibration lines and the maximum bias value, expressed as a percentage, that it could be generated on quantitation in routine analysis.

Matrices	**Composition of the matrix aqueous extract (mg L^{-1})[1]**		**Residual Variance homogeneity**	**Equality of slopes**	**Equality of intercepts**	**Matrix effect**	**Bias (%)**
	Cations	Anions					
Soil (blank)	Ca^{2+}: 41, Na^{+}: 37, Mg^{2+}: 4, K^{+}: 3	NO_3^-: 72, Cl^-: 35, HCO_3^-: 20	Yes	Yes	Yes	No	0
Cloth (blank)	Ca^{2+}: 5, Na^{+}: 12, Mg^{2+}: 8	Cl^-: 6, SO_4^{2-}<LOQ	Yes	Yes	Yes	No	0
Cotton wiped over cloth (blank)	Ca^{2+} & Na^{+} < LOQ	Cl^- & SO_4^{2-} < LOQ	Yes	Yes	Yes	No	0
Ca^{2+} matrix	Ca^{2+}: 800	SO_4^{2-}: 1900	Yes	No	No	Yes	9
Fe^{2+} matrix	Fe^{2+}: 500	SO_4^{2-}: 850	Yes	No	No	Yes	7

[1] Determined by CE

The presence of potassium, calcium, sodium, and magnesium cations was probably due to their natural presence on the cash dispenser, but the detection of ammonium cation, even in low quantity (0.16 mM), suggests its use in the explosive material because ammonium should not be naturally present on a cash dispenser. Ammonium salt, as ammonium nitrate, is often used in explosive compositions. The anion analysis, carried out with the electrophoretic method previously published [19], confirmed the presence of nitrate anion in the extract at 11 mg L^{-1} (0.17 mM). The molar correlation between ammonium cation and nitrate anion implied that ammonium nitrate was used in this explosion. The analysis of the wall matrix extract (extract 2) showed a large presence of calcium and sodium cations due to the presence of plaster in the wall composition. Comparisons with a blank wall extract, however, showed the same composition as those obtained in the extract 2. Thus, extract 2 did not allow the characterization of cations used in the explosive composition.

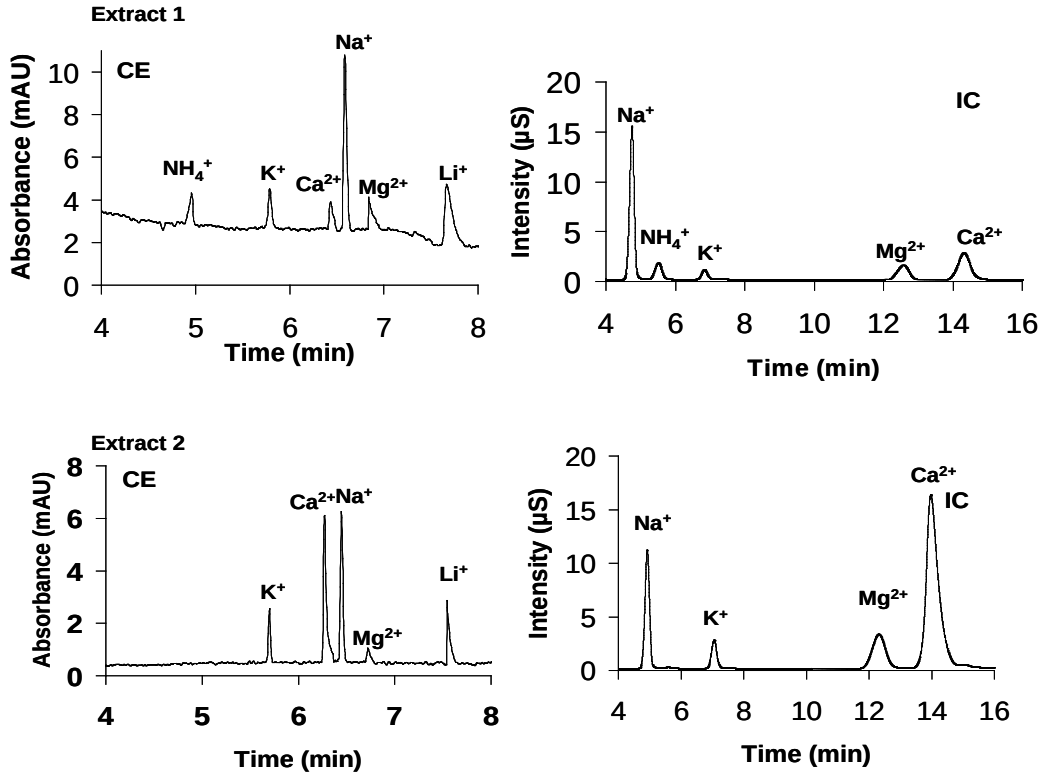


Figure II-I-11. CE and IC separations of cations contained in an aqueous sample extracts from a cash dispenser (extract 1, recovered using a cotton swab) and from a plaster wall around (extract 2, diluted 100 fold) after explosive attack. CE conditions, see Figure II-I-10. IC conditions, see section 2.4. Quantitation, see Table II-I-6.

Finally, quantitative results (Table II-I-6) given by both techniques were not significantly different and it can be considered that IC results were well confirmed by CE in a shorter analysis time and under more cost-effective conditions.

Table II-I-6. Comparison of quantitative results obtained by CE and IC for the analyses of aqueous sample extracts from cotton swab on cash dispenser (extract 1, recovered from a cotton swab) and a plaster wall around (extract 2, diluted 100 times). nd: not determined. The confidence interval was fixed at 20 % for lowest concentrations (< 15 mg L^{-1}) and 10 % for highest concentrations (> 15 mg L^{-1}).

Concentration (mg L^{-1})	NH_4^+	K^+	Ca^{2+}	Na^{2+}	Mg^{2+}
Extract 1					
CE	2.8 ± 0.6	3.1 ± 0.6	3.3 ± 0.6	11.3 ± 2.2	4.2 ± 0.8
IC	2.1 ± 0.4	2.5 ± 0.6	4.1 ± 0.8	10.4 ± 2.0	2.2 ± 0.4
Extract 2 (dilution 1/100)					
CE	nd	3.8 ± 0.8	22.4 ± 2.2	6.5 ± 1.2	3.3 ± 0.6
IC	nd	3.2 ± 0.6	21.8 ± 2.2	7.4 ± 1.4	3.9 ± 0.8

2.5.2. Firework residues

The method was also evaluated for the analyses of residues from homemade explosions. Thus, firecracker and firework explosions were simultaneously carried out on different matrices (soil, cloth, and metal). Figure II-I-12 shows the electropherograms obtained for the analyses of firecracker residue extracts (A) and firework residue extracts (B), both collected after explosions, and for pre- and post-explosion soil (C) and metal (D) matrix analyses. Soil samples were directly extracted in hot water whereas metal and cloth samples were wiped by cotton swabs before the extraction. The results for the cationic quantitations are presented in Table II-I-7.

The direct analyses of firecracker and firework residue extracts collected after the explosion allowed the anticipation of the ionic species likely to be found in the matrices collected around. The results given in Table II-I-7 are in agreement with the known main components of standard firecrackers, viz. potassium and magnesium in elemental form as a reactant [2]. Anionic species as chloride, perchlorate, nitrate, nitrite, thiosulphate, sulphate, chlorate anions were detected with the method previously developed [19] and their presences should be markers of pyrotechnic materials as black powder. Potassium perchlorate seemed to be the main component of firecrackers.

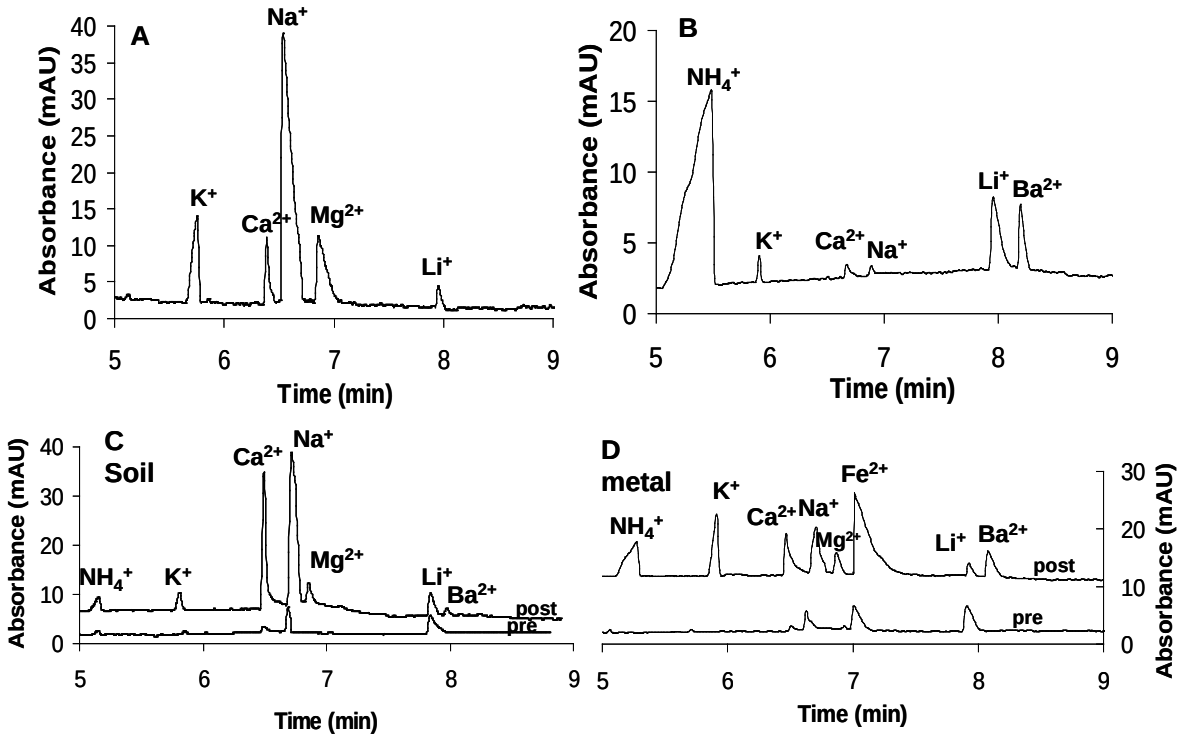


Figure II-I-12. CE analyses of (A) firecrackers residue extract, (B) firework residue extract, both collected after explosion, (C) pre- and post-explosion soil extracts and (D) pre- and post-explosion cotton swab extracts of metal. CE conditions and identification, see Figure II-I-10. Quantitation, see Table II-I-7.

The cationic analysis obtained for fireworks is also consistent with their classical initial composition, made up with ammonium perchlorate, an oxidizer used in the fireworks industry to make excellent propellants and coloured flames [2], and with barium used to produce the green colour. Other cations were detected in small quantity. Traces of these characteristic cations were also found in the post-explosion extracts. In fact, Figure II-I-12 and Table II-I-7 showed that ammonium, potassium, calcium, sodium, magnesium, and barium cations were detected in superior amount in post-explosion residue extracts, as compared with pre-blast residue extracts collected just before explosions. Finally, the use of pyrotechnic materials can be proven with the developed method. A satisfactory quantitative correlation was obtained between the anionic and cationic CE analyses, demonstrating the effectiveness of both.

Table II-I-7. Quantitative results for the analyses of firecracker and firework residue extracts and matrices collected around. nd: non detected.

Matrix and solutions	**Composition of the matrix aqueous extract (mg L^{-1})**					
	NH_4^+	K^+	Ca^{2+}	Na^+	Mg^{2+}	Ba^{2+}
Firecrackers residue extract	nd	80	8	120	20	nd
Firework residue extract	200	5	3	< LOQ	nd	22
Cotton (blank)	nd	nd	< LOQ	< LOQ	nd	nd
Soil						
pre-explosion	< LOQ	3	3	3	< LOQ	nd
post-explosion	9	15	50	120	4	3
Cotton wiped over cloth						
Pre-explosion	< LOQ	3	3	20	<LOQ	nd
Post-explosion	< LOQ	19	13	25	3	nd
Cotton wiped over metal	.					
Pre-explosion	< LOQ	nd	< LOQ	8	< LOQ	nd
Post-explosion	35	60	25	19	8	30

2.6 Concluding remarks

A new CE method based on a non-CMR chromophore (guanidinium cation) and a double-layer coated capillary was developed for the detection of 8 inorganic cations of interest, 9 interfering cations, and lithium as internal standard in post-blast residue extracts in less than 10 min, providing LODs around 1 mg L^{-1}. The performances of the guanidinium cation as chromophore in CE was documented and the optimization of the SMIL approach was done with respect to overall resolution of cations of interest and potential interferences. This method was then validated and the influence of matrix effects was checked. Due to the small injected volume (~ 0.7 % of the capillary volume), no significant matrix effects were observed. Thus, the developed method fully complied requirements. Finally, real post-blast residue extracts originating from explosive attack on cash dispensers and homemade firework explosions in several matrices were analysed, showing good consistency with IC.

3. References

[1] Henderson I. K., Saari-Nordhaus R., *J. Chromatogr. A*, 602 (**1992**) 149.
[2] Conkling J. A., *Chemistry of pyrotechnics, basic principles and theory*, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, **1985**.
[3] Dicinoski G. W., Shellie R. A., Haddad P. R., *Anal. Lett.*, 39 (**2006**) 639.
[4] Meng H., Wang T., Guo B., Hashi Y., Guo C., Lin J., *Talanta*, 76 (**2008**) 241.
[5] Johns C., Shellie R. A., Potter O. G., O'Reilly J. W., Hutchinson J. P., Guijt R. M., Breadmore M. C., Hilder E. F., Dicinoski G. W., Haddad P. R., *J. Chromatogr. A*, 1182 (**2008**) 205.
[6] Royds D., Lewis S. W., Taylor A. M., *Talanta*, 67 (**2005**) 262.
[7] Sharma S. P., Lahiri S. C., *J. Energ. Mater*., 23 (**2005**) 239.
[8] Green M. C., Partain L. D., *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.*, 5048 (**2003**) 63.
[9] Thormann W., Lurie I. S., McCord B., Marti U., Cenni B., Malik N., *Electrophoresis*, 22 (**2001**) 4216.
[10] Tagliaro F., Bortolotti F., *Electrophoresis*, 27 (**2006**) 231.
[11] Pumera M., *Electrophoresis*, 27 (**2006**) 244.
[12] Pumera M., *Electrophoresis*, 29 (**2008**) 269.
[13] Sarazin C., Delaunay N., Varenne A., Costanza C., Eudes V., Gareil P., *Sep. Purif. Rev.*, 39 (**2010**) 63.
[14] Kishi T., Nakamura J., Arai H., *Electrophoresis*, 19 (**1998**) 3.
[15] Doyle J. M., McCord B. R., *J. Chromatogr. B*, 714 (**1998**) 105.
[16] Hopper K. G., LeClair H., McCord B. R., *Talanta*, 67 (**2005**) 304.
[17] Hutchinson J. P., Evenhuis C. J., Johns C., Kazarian A. A., Breadmore M. C., Macka M., Hilder E. F., Guijt R. M. Dicinoski, G. W. Haddad,P. R., *Anal. Chem.*, 79 (**2007**) 7005.
[18] Hutchinson J. P., Johns C., Breadmore M. C., Hilder E. F., Guijt R. M., Lennard C., Dicinoski G. W., Haddad P. R., *Electrophoresis*, 29 (**2008**) 4593.
[19] Sarazin C., Delaunay N., Varenne A., Costanza C., Eudes V., Minet J. J., Gareil P., *J. Chromatogr. A*, 1217 (**2010**) 6971.
[20] Pacakova V., Coufal P., Stulik K., *J. Chromatogr. A*, 834 (**1999**) 257.
[21] Aupiais J., *Chromatographia*, 44 (**1997**) 303.
[22] Katayama H., Ishihama Y., Asakawa N., *Anal. Chem.*, 70 (**1998**) 2254.
[23] Katayama H., Ishihama Y., Asakawa N., *Anal. Chem.*, 70 (**1998**) 5272.
[24] Bendahl L., Hansen S. H., Gammelgaard B., *Electrophoresis*, 22 (**2001**) 2565.
[25] Catai J. R., Somsen G. W., de Jong G. J., *Electrophoresis*, 25 (**2004**) 817.
[26] Francois C., Morin Ph., Dreux M., *J. Chromatogr. A*, 706 (**1995**) 535.
[27] Francois C., Morin Ph., Dreux M., *J. Chromatogr. A*, 717 (**1995**) 393.
[28] Oehrle S. A., *J. Chromatogr. A*, 745 (1996) 87.
[29] Wang J., Pumera M., Collins G., Opekar F., Jelinek I., *Analyst*, 127 (**2002**) 719.
[30] Wang J., Pumera M., *Anal. Chem.*, 74 (**2002**) 5919.
[31] Sarazin C., Delaunay N., Varenne A., Costanza C., Eudes V., Gareil P., *J. Sep. Sci.*, 33 (**2010**) 3177.
[32] Marcus Y., Ion transport, in *Ion properties*, Marcel Dekker, Inc., New York, **1997**, pp168-169.
[33] Massart D. L., Vandeginste B. G. M., Buydens L. M. C., De Jong S., Lewi P. J., Smeyers-Verbeke J., Analysis of variance, in *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*, Part A, Elsevier, Amsterdam, **1997**, pp121-150.
[34] Massart D. L., Vandeginste B. G. M., Buydens L. M. C., De Jong S., Lewi P. J., Smeyers-Verbeke J., Comparison of the slopes of two regression lines, in *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*, Part A, Elsevier, Amsterdam, **1997**, pp208-209.

CHAPITRE II : Article - Analyse simultanée par électrophorèse capillaire d'anions et de cations inorganiques dans des résidus issus d'explosion de mélanges d'acide et d'aluminium

SIMULTANEOUS CAPILLARY ELECTROPHORETIC ANALYSIS OF INORGANIC ANIONS AND CATIONS IN POST-BLAST EXTRACTS OF ACID-ALUMINUM MIXTURES

Cédric Sarazin[1,2], Nathalie Delaunay[2], Anne Varenne[2], Christine Costanza[1], Véronique Eudes[1], Pierre Gareil[2]

Journal of Separation Science, 33 (2010), 3177-3183

[1]Central Laboratory of the Prefecture de Police, 39 bis rue de Dantzig, 75015 Paris, France. [2]Chimie-ParisTech, Laboratory of Physicochemistry of Electrolytes, Colloids and Analytical Sciences (PECSA), UMR 7195 CNRS-Paris6-ENSCP, 11, rue Pierre et Marie Curie, 75231 Paris cedex 05, France

Nonstandard abbreviations: HDMB, hexadimethrine bromide; PDC, 2,6-pyridinedicarboxylic acid.

Keywords: acid-aluminum mixtures, CZE, post-blast residues, 2,6-pyridinedicarboxylic acid, speciation diagram

Abstract

Bursts resulting from the chemical reaction between hydrochloric or nitric acid with aluminum foils are very often committed by the young delinquency in western countries because of its easiness of achievement. A fast, simple, selective, and cost-effective method allowing the simultaneous detection of chloride and nitrate anions and aluminum(III) was thus required. This article focused on the development and validation of a CE method using a BGE containing 2,6-pyridinedicarboxylic acid (PDC) acting as both an anionic chromophore and as

an aluminum(III) complexing agent. First, the achievement of the speciation diagram of Al(III) in the presence of PDC allowed the choice of pH conditions for which aluminum(III) was globally anionic. The study of the selectivity for Al(III) in the presence of 10 other cationic species potentially present in post-blast residues dictated the choice of the PDC concentration at 20 mM. The validation step next demonstrated the figures of merit of the method, with an intermediate precision for Al(III) of 2 % on normalized migration times and 3.5 % on corrected areas. Finally this method was used for analyses of real post-blast extracts from acid-aluminum mixtures.

1. Introduction

Bursts caused by acid and aluminum mixtures are often used by the petty crime. For instance, since 2007, almost fifty blasts have been recorded in Paris and its suburb. The contact between an acid, hydrochloric or nitric, (it is important to note that sulphuric acid does not react with Al(III)) and aluminum foils in a plastic bottle, causes an important gaseous release leading to the bottle explosion and acid projections that can dramatically hurt citizens. Therefore, an effective and fast analytical method is mandatory to confirm the presence of aluminum and identify the acid in the explosive devices. Detection of inorganic cations and anions in post-explosion residues generally requires two IC [1] or two CE methods [2-4]. But in order to decrease the total analysis time and as only three compounds were searched, the detection of aluminum(III) and nitrate and chloride anions using a single method would be welcome. IC has been already used for the simultaneous detection of inorganic anions and cations [5] using either multi-column- single-column approaches. In the multi-column approach, anion- and cation-exchange columns can be arranged either in parallel using a switching valve and several ion chromatographs [6] or in-series [7]. In the single-column approach, mixed beds of anion- and cation-exchangers [8] or zwitterionic stationary phases were evaluated [9,10]. The use of an anion-exchange stationary phase with a carbonate/EDTA-based mobile phase was also tested [11]. The formation of anionic metal-EDTA complexes allowed simultaneous analysis of metal ions and inorganic anions.

Alternatively, a number of CE methods for simultaneous analysis of anions and cations have been described in the literature. Padarauskas et al. [12,13], Kuban et al. [14,15], Hopper et al. [16], and Nehme et al. [17] reported applying dual-opposite end injections. Cations and anions were detected approximately in the middle of the separation capillary either by indirect UV absorbance using an electrolyte containing both an anionic and a cationic probe or by conductivity [17]. Another approach using a high magnitude EOF involved detection of

anions and cations from the same injection end [18,19]. Finally, anions and cations were also simultaneously analyzed through the use of an anionic complexing agent being also the anionic probe [20-23]. Metal cations were transformed into their chelated forms with EDTA [20] or 2,6-pyridinedicarboxylate (PDC) [21-23] and separated from the other anionic components under anionic separation mode. In this work, a PDC-based BGE was developed for the analysis of a mixture of chloride and nitrate anions, and aluminum(III) from acid-aluminum burst residues, a new application field. The separation conditions were determined from consideration of the aluminum speciation diagram and use for analysis of real matrices.

2. Materials and methods

2.1 Standards and electrolytes

Aluminum chloride and sodium nitrate were purchased from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). PDC used as probe for the anionic indirect UV detection and as complexing agent for cations was from Interchim (Montluçon, France). Hexadimethrine bromide (HDMB) used as EOF reversal agent was purchased from Sigma-Aldrich (L'Isle d'Abeau, France). 1000 mg L^{-1} individual aluminum and nitrate anion solutions were prepared weekly by volumetric dissolution in ultra-pure water delivered by a Direct-Q3 UV system (Millipore, Molsheim, France). A 20 mg L^{-1} standard mixture of both anions and aluminum(III) was prepared daily in ultra pure-water. For validation purposes, a 1000 mg L^{-1} aluminum standard solution in 3% HNO_3 and standard 1000 mg L^{-1} chloride and nitrate aqueous solutions were purchased from VWR. HDMB solution was prepared weekly by dissolving 0.25 g in 100 mL of ultra-pure water. The final composition of the BGE was 20 mM PDC adjusted at pH 4.5 with 1 M NaOH in ultra-pure water and it was mixed daily.

2.2 Apparatus

Development and validation of the CE method were carried out with a Beckman Coulter P/ACE MDQ system (Villepinte, France) equipped with a UV detector set at 214 nm. Instrument control and data acquisition were performed using 32 Karat® software.

2.3 Electrophoretic procedures

Electrophoretic separations were performed using 50 µm id x 60 cm bare fused-silica capillaries purchased from Polymicro (Photonlines, Marly-Le-Roi, France). A detection window was created for the UV detection at 10 cm from the anodic end. Before first use, capillaries were conditioned by successive flushing with 1 M NaOH, 0.1 M NaOH, ultra-pure water, HDMB solution, and finally BGE, each under 2.8 bar for 3 min. Between each run,

capillaries were rinsed with the BGE under 2.8 bar for 3 min. Then, every ten analysis, capillaries were flushed with the HDMB solution to keep EOF constant. The RSD for electroosmotic mobility over ten consecutive injections did not exceed 0.25%. Injections were performed hydrodynamically under 50 mbar for 15 s (approx. 2 % of the capillary volume). Separations were performed at 25 °C under -30 kV.

2.4 Real samples extraction

Post-blast residue samples were generally collected under two forms: acidic yellow liquids and metal foil pellets. The yellow liquids were just diluted with ultra-pure water by a factor leading to an analyte concentration within the experimental linear range. Metal foil pellets were extracted in hot water in an ultrasonic bath for 10 min. The extracts were next filtered through 150-µm cellulose filters (Les Filtres Durieux, Marne la Vallée, France) and 0.45-µm nylon syringe filters (Teknokroma, A.I.T. France, Houilles, France) just before injection.

2.5 Speciation diagram simulation

The aluminum speciation diagrams of aluminum(III) in the presence of PDC were obtained using home-made TOT titration simulation software (ESPCI ParisTech, Paris, France).

2.6 Statistical approach of matrix effects

Statistical study of matrix effects was carried out with five repeated injections for five different anion and cation concentrations. As matrix extracts already contained anions and aluminum(III), standard addition was performed. Statistical parameters of the regression lines were computed with Excel® software (Microsoft).

3. Results and discussion

3.1 Aluminum speciation diagram in 10 mM PDC solution.

In aqueous solution, at 25 °C and in the presence of PDC (pK_1 = 4.4, pK_2 = 2.1, and pK_3 = 0.4) [24], aluminum can give different species, notwithstanding hydroxyl complexes. Four hydroxylated aluminum complexes having $[Al(OH)_n]$ as general formula can be formed and their stability constant values are 8.6, 18.0, 26.3, and 32.4 for n = 1, 2, 3, and 4, respectively [25]. Depending on pH, the $[Al(OH)_3]$ complex can precipitate (pKs = 33) [25]. According to Bombi [24], four Al(III)/PDC complexes can be present in solution: $[Al\text{-}PDC]^+$, $[Al\text{-}PDC_2]^-$,

[Al-PDC-OH], and [Al-PDC_2-OH]$^{2-}$, with stability constants estimated to 4.7, 7.8, 14.4, and 16.6, respectively. Other species resulting from the complexation of aluminum with chloride or nitrate ions could be present but were not retained, as they do not induce modifications of the speciation diagram. For the sake of an example, the diagram obtained with 10 mM PDC and 0.7 mM Al(III) (20 mg L^{-1}) is represented in Figure II-II-1.

In order to obtain efficient separation conditions, it was highly advisable to select electrolyte conditions leading to a very prevalent form in solution. As far as electrophoretic separation in anionic mode was aimed, two negatively charged complexes could be contemplated: [Al-PDC_2]$^-$ and [Al-PDC_2-OH]$^{2-}$. At pH superior to 6.0, the risk of precipitating Al(III) species became more important. Precipitation was experimentally observed by Napoli et al. [26] and Bombi et al. [24] beyond pH 5.0-6.0. Napoli did not characterize this precipitate but Bombi demonstrated that it was a 1:1 Al(III)/PDC complex, probably the neutral [Al-PDC-OH] form. [Al-PDC_2]$^-$ appeared to exist in a highly predominant form at pH around 4. Electrophoretically, at pH between 4.0 and 5.5, a single peak assigned to Al(III) was detected. In order to check Bombi's assertion, the molar fractions of Al(III) under [Al-PDC_2]$^-$ form obtained from the speciation diagram, was plotted against the corrected area of Al(III) peak (Figure II-II-2). The obtained curve was a straight line ($y = 0.0404 + 0.0001\ x$, $R^2 = 0.998$). But with an intercept which was significantly different from 0. This result suggested that other species were present in this pH range.

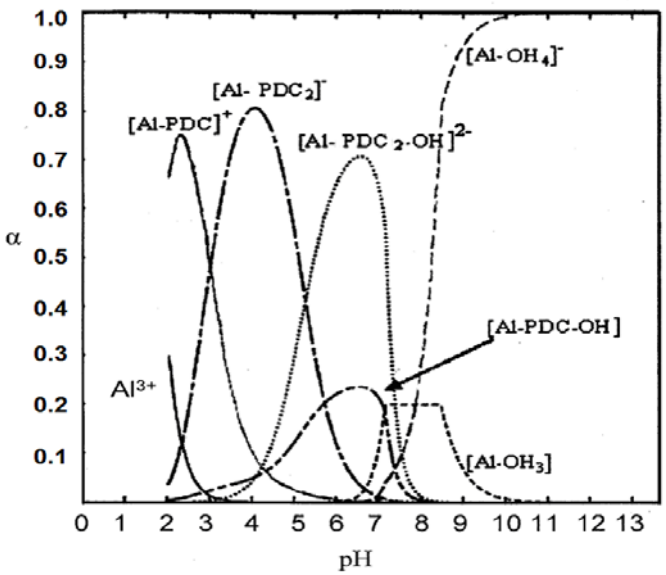


Figure II-II-1. Speciation diagram of Al(III)/PDC and Al(III)/H_2O complexes in aqueous solution; Al(III) concentration, 0.7 mM (20 mg L^{-1}); PDC concentration, 10 mM. The following equilibrium constants were taken into account: pKa (PDC) : 4.4, 2.1, 0.4; log β ([Al-PDC]$^+$) = 4.7; log β([Al-PDC_2]$^-$) = 7.8; log β ([Al-PDC-OH]) = 14.4; log β ([Al-PDC_2-OH]$^{2-}$) = 16.6; log β ([AlOH]$^{2+}$) = 8.6; log β ([$Al(OH)_2$]$^+$) = 18.0; log β ([$Al(OH)_3$]) = 26.3; log β([$Al(OH)_4$]$^-$) = 32.4; pKs ([$Al(OH)_3$]) = 33.0 [18,19]. Temperature: 25°C.

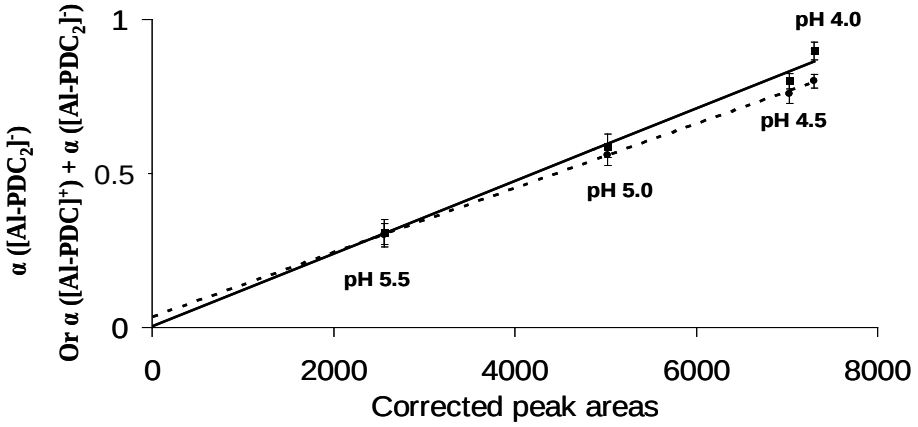


Figure II-II-2. Correlation curves between the molar fractions of $[Al\text{-}PDC_2]^-$ (—) and of ($[Al\text{-}PDC_2]^-$ + 2 x $[Al\text{-}PDC]^+$) (--) obtained from the speciation diagram and the experimental CE Al(III) peak corrected areas obtained at pH 4.0, 4.5, 5.0, and 5.5. Simulation conditions: see Figure II-II-1. CE conditions: bare fused-silica capillary, 50 µm id. × 60 cm (UV detection at 50 cm) modified with HDMB at 0.25 g in 100 mL ultra-pure water. BGE: 10 mM PDC adjusted at pH 4.0, 4.5, 5.0, and 5.5 by 1 M NaOH. Temperature, 25 °C; applied voltage, -30 kV; hydrodynamic injection, 15 s, 50 mbar; direct UV detection at 214 nm. Aluminum concentration: 20 mg L^{-1} in ultra-pure water.

Interestingly, the plot of total molar fraction of ($[Al\text{-}PDC_2]^-$ + 2 x $[Al\text{-}PDC]^+$) (assuming that the UV absorbance signal is directly proportional to the number of PDC belonging to the complex form) as a function of the corrected area of Al(III) peak led to a correlation coefficient of 0.991 and also an intercept significantly different from 0 (y = 0.0175 + 0.0001 x) (see Figure II-II-2). Uncertainties on β values can lead to modifications of the speciation diagram. In effect, a variation of ± 0.2 logarithmic units on $[Al\text{-}PDC]^+$ and $[Al\text{-}PDC_2]^-$ stability constants induced a variation of 0.03 on the molar fraction of anionic and cationic species, which may explain that intercept values are significantly different from 0. The lowest intercept was obtained from the total molar fraction of ($[Al\text{-}PDC_2]^-$ + 2 x $[Al\text{-}PDC]^+$), which could indicate that a fast equilibrium between the cationic and anionic complexes took place. Similar graphs taking into account [Al-PDC-OH] and/or $[Al\text{-}PDC_2\text{-}OH]^{2-}$, in addition to $[Al\text{-}PDC_2]^-$ or ($[Al\text{-}PDC_2]^-$ + 2 x $[Al\text{-}PDC]^+$) molar fractions led to the conclusion that the hydroxylated complexes were not formed in the mixture, probably because of kinetic limitations. These results corroborated those obtained by Napoli et al. [26] who mentioned only two Al(III)/PDC complexes, $[Al\text{-}PDC]^+$ and $[Al\text{-}PDC_2]^-$.

3.2 CE method development

3.2.1 Choice of pH

According to the speciation diagram, a pH value around 4.0 seemed to be well appropriate for obtaining a prevalent anionic Al(III) complex with a view to an electrophoretic separation in

anionic mode. A BGE containing 10 mM PDC adjusted at pH 4.0 with 1 M NaOH was therefore tested for analysis of an $AlCl_3$ solution with Al(III) at 20 mg L^{-1}. The obtained electropherogram is shown in Figure II-II-3A.

The indirect detection of chloride anion led to a negative peak at around 2 min, whereas a positive peak featured the direct detection of chelated aluminum(III). An important baseline instability was observed, encompassing a large baseline dip at around 4 min followed by a steadily signal increase lasting up to 7 min. This instability was independent of aluminum sample concentration and generated by the introduction of the water plug concurrently with the Al(III) sample, as verified by only injecting ultra-pure water. In effect, the lack of PDC in the injected plug created a PDC vacancy peak generating a decrease in absorbance at 4 min followed by a return to the absorbance level dictated by the BGE composition. In order to confirm this assumption, the electrophoretic mobility of PDC was measured in a pH 7.0 phosphate buffer of identical ionic strength, leading to a value of -38.4 x 10^{-5} cm^2 V^{-1} s^{-1} for the effective mobility of PDC^{2-}. As PDC was present under $HPDC^-$ and PDC^{2-} forms at pH 4.0 and with the approximation that the actual mobility of $HPDC^-$ was twice lower than the actual mobility of PDC^{2-}, the effective mobility of PDC at pH 4.0 can be estimated to -27.6 10^{-5} cm^2 V^{-1} s^{-1}. This value matched the one corresponding to the negative dip observed at ca 4 min, namely -28.1 x 10^{-5} cm^2 V^{-1} s^{-1}, as calculated. Subsequently, the aluminum(III) samples were diluted in the BGE. As shown in Figure II-II-3C, the baseline drift was completely removed, but a large shoulder was detected, probably caused by the equilibrium between $[Al\text{-}PDC]^+$ and $[Al\text{-}PDC_2]^-$ forms being not fast enough. Eventually, aluminum dilution in BGE offered better results, but real samples should be preferably extracted in water for simplicity reasons. In order to improve baseline stability, an off-line addition of 5% (v/v) 10 mM PDC (in BGE) or 100 mM PDC (prepared in pure methanol) was carried out in the aqueous sample. After a 2-min equilibration time of the sample, the analysis showed the same baseline instability. Eventually, the equilibrium between PDC and Al(III) should be so fast that it was not necessary to add PDC in sample solution. Also, subsequent experiments were performed with $AlCl_3$ samples dissolved in plain water and the influence of BGE pH was investigated. For pH values inferior to 4.0, the baseline stability was always poor, whereas for pH values ranging from 4.0 to 5.5, the baseline drift disappeared and analytes were well-resolved from system peak.

Figure II-II-3A and 3B shows the electropherograms obtained at pH 4.0 and pH 4.5. Slightly shorter migration times were obtained at pH 4.5 due to the increase in electroosmotic mobility (from 17.0 x 10^{-5} cm^2 V^{-1} s^{-1} at pH 4.0 to 23.0 x 10^{-5} cm^2 V^{-1} s^{-1} at pH 4.5). According to the speciation diagram, precipitation should take place beyond pH 5.5, and pH was not studied further. Figure II-II-2 previously showed that the corrected peak areas (and peak heights) obtained at pH 4.5 were close to those obtained at pH 4.0, keeping sensitivity constant.

Indeed, the S/N for 20 mg L^{-1} Al(III) varied from 52 at pH 4.0 to 48 at pH 4.5 but fell down to 7 at pH 5.5. For subsequent experiments, pH was thus fixed at 4.5.

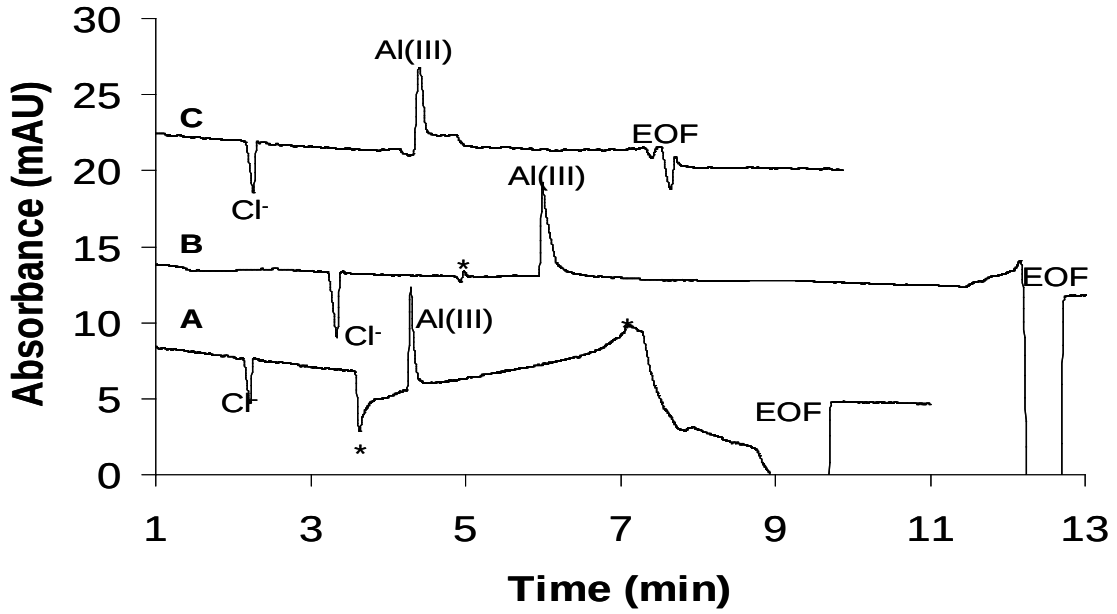


Figure II-II-3. Electropherograms of $AlCl_3$ samples prepared in ultra-pure water and separated in 10 mM PDC adjusted at (A) pH 4.0 or (B) pH 4.5 by 1 M NaOH or (C) prepared and separated in the PDC-based BGE at pH 4.0. Other CE conditions: see Figure II-II-2. Al(III) concentration, 20 mg L^{-1}. (*): system peak.

3.2.2 Choice of PDC concentration: method selectivity

Post-blast residues of acid-aluminum mixtures can contain various potentially interfering cations and anions, that may be present in the matrices of interest. The selectivity of the method was first checked for the experimental conditions previously described by separately injecting the following cations: Zn(II), Cu(II), Fe(II), Co(II), Ni(II), Fe(III), Sr(II), Ca(II), Mg(II), Ba(II) in addition to Al(III). As shown in Table II-II-1, these cations exhibit noticeable stability constants with PDC and could be detected as PDC complexes [27]. Monovalent cations, which do not form complexes with PDC, were not considered as potential interferents. Mg(II), which has a low complexation constant with PDC, was not detected. Figure II-II-4 shows electropherograms of a standard mixture of eleven alkaline-earths and transition metals, including Al(III), in 10 mM PDC adjusted at pH 4.5 by 1 M NaOH. All divalent transition metals (Zn(II), Cu(II), Fe(II), Co(II), Ni(II)) comigrated in a single peak which did not interfere with Al(III) peak. Ca(II) comigrated with Al(III) at 10 mM PDC (Figure II-II-4A), but they were separated from each other at 20 mM PDC (Figure II-II-4B), due to higher complexation rate of Ca(II) in this latter case. Increasing PDC concentration from 10 to 20 mM also modified the separation selectivity (Fe(III)/Ca(II)

inversion), in accordance with the stability constants reported in Table II-II-1 and with the charge differences between the metal complexes. Furthermore, the resolution between Fe(III) and Al(III), which was about 2.5 for a concentration of 20 mg L^{-1} each, was maintained at about 2.3 when Al(III) or Fe(III) was in 10 fold superior concentration, which is worthy of note for real samples. On going from 10 to 20 mM PDC concentration, the BGE absorbance varied from 147 to 272 mAU, still being in the absorbance linearity range of the buffer and the speciation diagram simulation was not markedly modified. Indeed, the maxima of the curves are obtained for the same pH values and the α_{max} $[Al\text{-}PDC_2]^-$ varied from 0.81 to 0.76, α_{max} $[Al\text{-}PDC_2\text{-}OH]^{2-}$ from 0.71 to 0.78 and α_{max} $[Al\text{-}PDC]^+$ from 0.74 to 0.77, and, more especially, the sum of the molar fractions of ($[Al\text{-}PDC_2]^-$ + 2 x $[Al\text{-}PDC]^+$) was not significantly modified (2.29 for 10 mM PDC and 2.30 for 20 mM PDC).

Table II-II-1. Stability constants of complexes formed between PDC and alkaline-earth and transition metal cations (25 °C, taken from reference [27]) and experimental effective mobilities of these cations at 25 °C in the presence of 10 and 20 mM PDC at pH 4.5 adjusted with 1 M NaOH.

		μ_{ep} (10^{-5} cm^2 V^{-1} s^{-1}) (n = 3)	
Complexes	log β	[PDC] = 10 mM	[PDC] = 20 mM
(1)*-PDC	>10	-28.3 ± 0.6	-28.3 ± 0.5
$[Fe(III)\text{-}PDC_2]^-$	16.7	-18.3 ± 1.1	-18.2 ± 0.9
$[Al(III)\text{-}PDC_2]^-$	7.8	-16.2 ± 0.8	-16.9 ± 0.4
$[Ca(II)\text{-}PDC]^-$	2.6	-16.5 ± 0.6	-19.3 ± 0.7
$[Sr(II)\text{-}PDC]^-$	1.7	-7.1 ± 1.0	-10.8 ± 0.8
$[Ba(II)\text{-}PDC]^-$	0.5	-1.4 ± 0.8	-3.3 ± 0.7
$[Mg(II)\text{-}PDC]^-$	0.7	undetected	undetected

* (1) = $[Zn(II)\text{-}PDC]^-$, log β = 13.6; $[Cu(II)\text{-}PDC]^-$, log β = 16.5; $[Fe(II)\text{-}PDC]^-$, log β = 10.3; $[Co(II)\text{-}PDC]^-$, log β = 12.5; $[Ni(II)\text{-}PDC]^-$, log β = 13.5.

For the BGE containing 20 mM PDC, the migration of potentially interfering anions was also examined (Figure II-II-4C). It appeared that thiosulphate and sulphate anions migrated faster than Cl^- and NO_3^- anions whereas thiocyanate, chlorate, perchlorate, phosphate, and carbonate anions migrated with apparent mobilities between those for nitrate and aluminum peaks.

The final composition of the BGE was fixed at 20 mM PDC adjusted at pH 4.5 with 1 M NaOH. The corresponding electropherogram is presented in Figure II-II-5A. Nitrate anion was detected as a positive peak due to its direct detection at 214 nm. In order to increase the sensitivity, an injection plug of 2% of the capillary volume was achieved, which corresponded to the superior limit of the injected volume without detrimental effect on resolution. The obtained LODs (calculated for a S/N of 3) were 1.2 mg L^{-1} for each anion and 0.3 mg L^{-1} for Al(III). For anions, they are 2-fold worse (check) than that obtained in the laboratory with the

validated IC method used for anion analysis (ISO/CEI 17025 certification). As the anions were in large amount in real samples, CE is nevertheless a good alternative to IC.

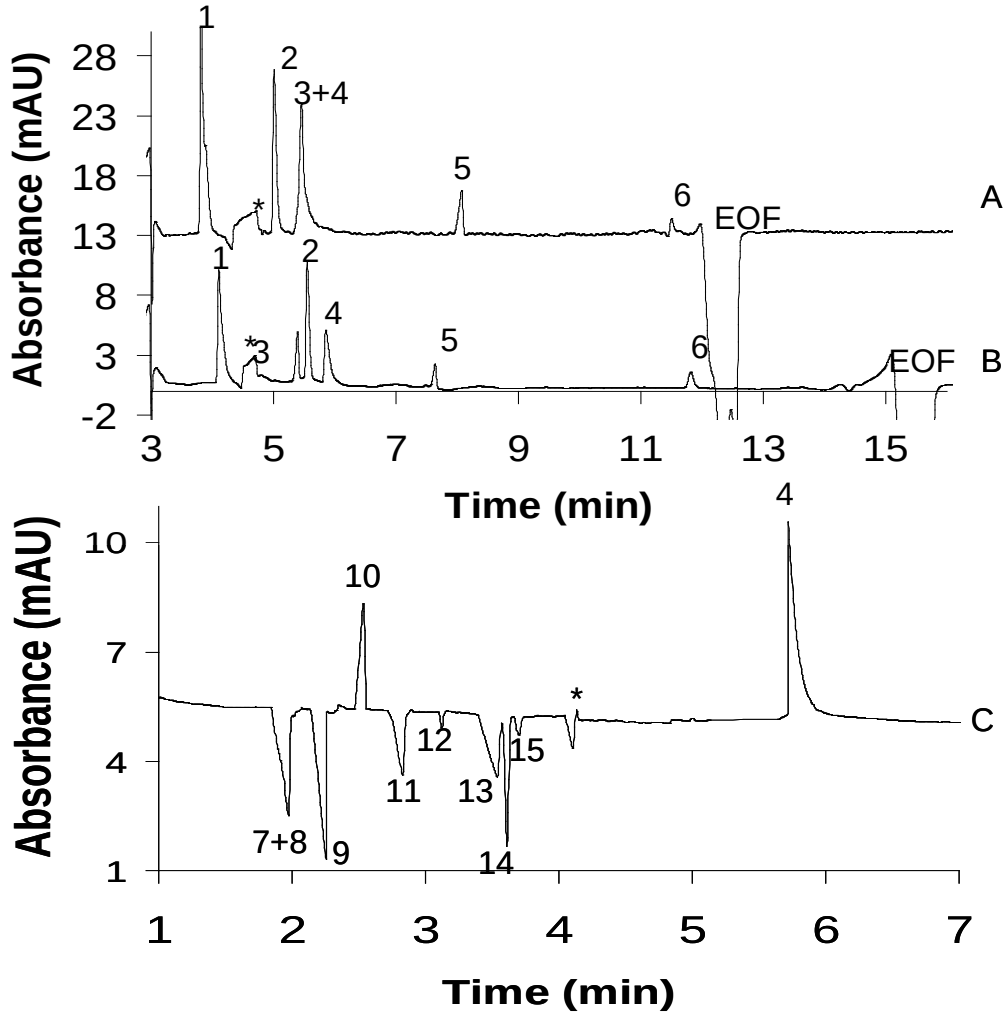


Figure II-II-4. Electropherograms of a standard mixture of chloride and nitrate anions and aluminium(III) plus potential interfering (A and B) alkaline-earth and (C) transition metal cations and inorganic anions. Electrolyte: (A) 10 mM or (B and C) 20 mM PDC adjusted at pH 4.5 by 1 M NaOH. Other CE conditions: see Figure II-II-2. Analyte concentration, 20 mg L^{-1} in ultra-pure water. (*): system peak. Identification: 1, Zn(II) + Cu(II) + Fe(II) + Ni(II) + Co(II); 2, Fe(III); 3, Ca(II); 4, Al(III); 5, Sr(II); 6, Ba(II); Mg(II), undetected; 7, thiosulphate; 8, sulphate; 9, chloride; 10, nitrate; 11, thiocyanate; 12, perchlorate; 13, carbonate; 14, chlorate; 15, phosphate.

3.3 Assessment of method validation

The validation of the developed method was carried out in order to apply it routinely for the qualitative and quantitative analysis of post-blast residues resulting from acid-aluminum mixtures. This study was conducted for each analyte separately. Method selectivity was

previously studied. Precision on identification and quantitation criteria had to be better than 5 %, according to ISO/CEI 17025 certification used by the French police laboratory.

Method repeatability and intermediate precision were characterized by the intra-day RSD and RSD on measurements obtained over three days, respectively [28]. Three consecutive injections of standards mixtures containing chloride and nitrate anions and aluminum(III) cation at 20 mg L^{-1} each, repeated on three different days (n = 9), were performed. Electrolytes and standard analytes were prepared daily. To eliminate influence of EOF variations, and as it was difficult to find a proper internal standard, migration times were normalized with respect to electroosmotic time (measured at the maximum of the peak) (t_{Mi} / t_{EOF}) and corrected areas (A_i / t_{Mi}) were used. Intermediate precisions on migration times were 4.1 % and 3.9 % for chloride and nitrate anions, respectively, and 3.1 % for aluminum(III) (Table II-II-2). After normalization, intermediate precisions were reduced to 2.5 % and 2.1 % for chloride and nitrate anions and 1.9 % for aluminum(III), so that an easy and fast identification was possible. For corrected areas, intermediate precisions were between 3 % and 4 %. Compared with IC, the precision is decreased by a factor 2. Nevertheless, as all these values were always inferior to 5 %, the performances of the method complied with requirements.

The LOQs were experimentally checked with five solutions of each analyte at 1 mg L^{-1} for Al(III) and 4 mg L^{-1} for chloride and nitrate anions, at a level corresponding to about 3 fold LODs (calculated for a S/N of 3). The maximum bias obtained for analytes at these levels did never exceed 20 %, the upper limit fixed by the laboratory. Also these concentration levels were next defined as LOQs.

The linearity of the method was then evaluated by plotting the corrected area for each analyte against the injected concentrations for levels higher than LOQs. Linear regressions and coefficients of determination R^2 were calculated. For all analytes, R^2 values superior to 0.99 were obtained up to 30 mg L^{-1}.

The analysis of five $AlCl_3$ solutions having concentration belonging to the linear ranges (5, 8, 11, 17, and 22 mg L^{-1} for chloride anion corresponding to 1, 2, 3, 5, and 7 mg L^{-1} aluminum(III) were performed using the least-squares regression equations established previously. The calculated chloride concentration was plotted against 3 times the corresponding calculated aluminium concentration and the obtained linear regression led to a slope and an intercept that were not significantly different from 1 and 0 respectively, with risk set at α = 1 %. These results demonstrated that the whole injected aluminum(III) quantity was detected under the assigned Al(III) peak.

Finally, matrix effects were evaluated. After the burst of a vessel containing an acid-aluminum mixture, two kinds of residues can be collected: a yellow acid viscous liquid having a pH value close to 0 and oxidized metallic pellets.

Table II-II-2. Figures of merit for the intermediate precisions (n = 9), LODs, R^2, and linearity ranges of the analyses of chloride and nitrate anions and Al(III).

Analytes	Intermediate precision RSD (%)			LOD	LOQ	R^2	Linear range
	t_{Mi}	t_{Mi}/t_{EOF}	A_i/t_{Mi}	(mg L^{-1})	(mg L^{-1})		(mg L^{-1})
Cl^-	4.1	2.5	3.7	1.2	4.0	0.995	4-30
NO_3^-	3.9	2.1	3.2	1.2	4.0	0.998	4-30
Al(III)	3.1	1.9	3.9	0.3	1.0	0.996	1-30

Before analysis, yellow liquids were just diluted with ultra-pure water, while the metallic pellets were soaked in 50 mL hot water and the recovered solution was next diluted. These dilution steps increased the pH values up to 2.0-3.0. With these two kinds of real samples that initially contained chloride anion and Al(III) at concentrations within the linear range, standard additions of the three targeted ions were performed (5 concentration levels for each ion in the linear range) and the obtained calibration lines were compared with the calibration lines obtained with standards in pure water. The comparison was carried out using a statistical strategy, based on the comparison of the two least-squares linear regression lines obtained [29]. This involves three successive steps: (i) the residual variances of the regression must be homogeneous (bilateral F-test), (ii) if yes, it was then possible to compare the slopes of the regression lines (bilateral t-test using the pooled standard-deviation of the slopes as denominator), and (iii) in case slopes were the same, it was finally possible to compare intercepts (bilateral t-test using the pooled standard-deviation of the intercepts as denominator). Statistically, it could be considered that two calibration lines were not significantly different only if residual variances of the regression lines, slopes, and intercepts could be considered simultaneously not significantly different. All statistical tests were carried out with a first kind risk α set at 1 %. For the three targeted analytes and the two kinds of matrices, all the statistical tests were successfully passed and no matrix effects were thus highlighted. So, calibration lines obtained in pure water can be used for quantitative analyses of real samples by CE.

3.4 Applications to real samples

As already said, after the burst of a vessel containing an acid-aluminum mixture, two kinds of residues can be collected: a yellow acid viscous liquid and metallic pellets. Figure II-II-5B-C shows typical electropherograms for yellow liquids, after dilution with water, and metallic

pellet soaking aqueous extracts from post-burst residues of acid-aluminum mixtures. Both analyses clearly showed the presence of chloride anion and aluminum(III) in a large quantity. Indeed, after correction for the dilution factor, the concentrations of chloride anion were 48 and 45 g L^{-1} in residues B and C, respectively, while the corresponding concentrations of Al(III) were 4 and 87 g L^{-1}, respectively. The use of hydrochloric acid and aluminum foils to carry out this burst was thus confirmed. A peak assigned to Fe(III) after spiking with Fe(III) standard solution, was also detected in residue C. No attempt to quantify this species, which may be an impurity in the aluminum foil or a corrosion product from the vessel, was undertaken.

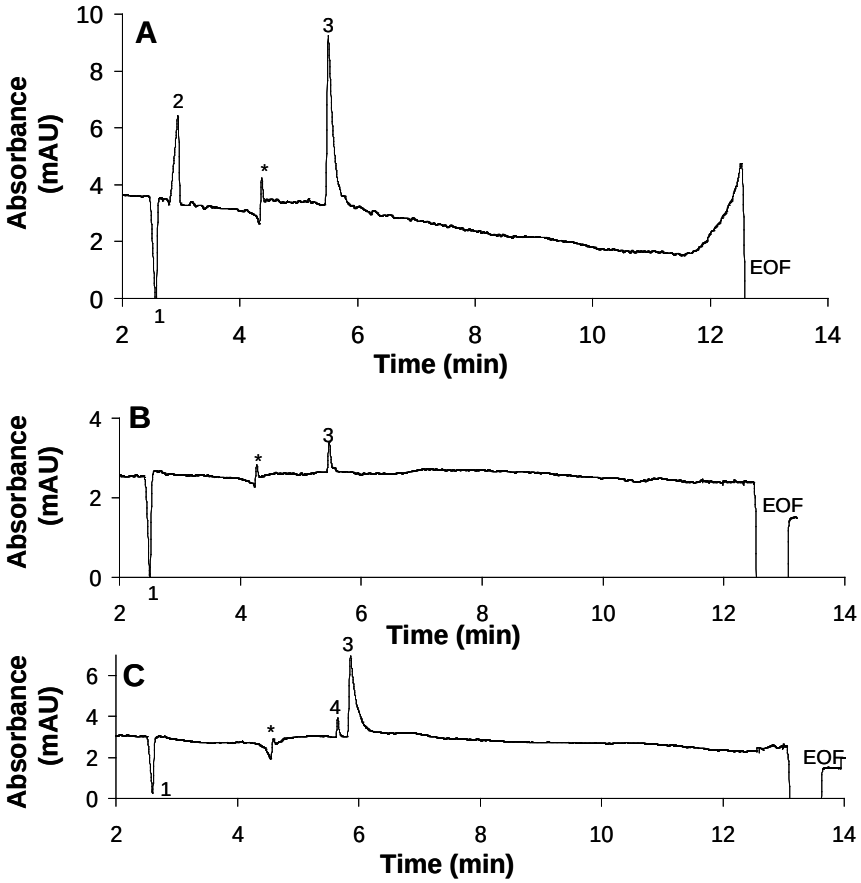


Figure II-II-5. CE analyses of (A) $AlCl_3$ standard solution with Al(III) at 20 mg L^{-1} with NO_3^- at 20 mg L^{-1}, (B) a real yellow liquid diluted 2,000 fold and (C) a real oxidized metallic pellet diluted 3,000 fold. CE conditions: see Figure II-II-2, except for BGE: 20 mM PDC adjusted at pH 4.5 by 1 M NaOH. (*): system peak. Identification: 1, Cl^-; 2, NO_3^-; 3, Al(III); 4, Fe(III).

4. Concluding remarks

This article reports for the first time on the development and partial validation of an electrophoretic method for the analyses of post-burst residues from acid-aluminum mixtures.

This method allowed the simultaneous detection of chloride and nitrate anions and of an anionic Al(III) chelate using a PDC-based BGE in less than 15 min. The pH of the BGE was chosen from considering the speciation diagram of Al(III) in the presence of PDC. The PDC concentration was fixed at a value preventing Al(III) from comigrating with potential cationic interferents. A satisfactory precision was obtained and finally real extracts were successfully analyzed. The developed method favourably compete with IC method for simultaneous detection of target species, as it appeared faster and less sensitive to the high acidity of real extracts which could damaged IC columns.

References

[1] McCord B. R., Hargadon K. A., Hall K. E., Burmeister S. G., *Anal. Chimica Acta,* 288 (**1994**) 43.
[2] Pumera M., *Electrophoresis,* 27 (**2006**) 244.
[3] Pumera M., *Electrophoresis,* 29 (**2008**) 269.
[4] Hutchinson J. P., Evenhuis C. J., Johns C., Kazarian A. A., Breadmore M. C., Macka M., Hilder E. F., Guijt R. M. Dicinoski G. W., Haddad P. R., *Anal. Chem.,* 79 (**2007**) 7005.
[5] Nesterenko P. N., *Trends Anal. Chem.,* 20 (**2001**) 311.
[6] Dabek-Zlotorzynska E., Dlouhy J. F., *J. Chromatogr.,* 640 (**1993**) 217.
[7] Takeuchi T., Isogimi K., Kojima T., Safni T., Miwa T., *Chromatography,* 20 (**1999**) 118.
[8] Ding M. Y., Wang Z. H., Chen P.R., *Fenxi Huaxue,* 25 (**1997**) 1430.
[9] Hu W., Tao H., Tominaga M., Miyazaki A., Haraguchi H., *Anal. Chim. Acta,* 299 (**1994**) 249.
[10] Hu W., Takeuchi T., Haraguchi H., *Anal. Chem.,* 65 (**1993**) 2204.
[11] Garcia-Fernandez R., Garcia-Alonso J. I., Sanz-Medel A., *J. Chromatogr. A,* 1033 (**2004**) 127.
[12] Padarauskas A., Olsauskaite V., Schwedt G., *J. Chromatogr. A,* 800 (**1998**) 136.
[13] Padarauskas A., Olsauskaite V., Paliulionyte V., *J. Chromatogr. A,* 829 (**1998**) 359.
[14] Kuban P., Karlberg B., Kuban P., Kuban V., *J. Chromatogr. A,* 964 (**2002**) 227.
[15] Kuban P., Karlberg B., *Anal. Chem.,* 70 (**1998**) 360.
[16] Hopper K. G., LeClair H., McCord B. R., *Talanta,* 67 (**2005**) 304.
[17] Nehmé R., Lascaux A., Delépée R., Bérangère C., Morin P., *Anal. Chim. Acta,* 663 (**2010**) 190.
[18] Johns C., Yang W., Macka M., Haddad P. R., *J. Chromatogr. A,* 1050 (**2004**) 217.
[19] Haumann I., Boden J., Mainka A., Jegle U., *J. Chromatogr. A,* 895 (**2000**) 269.
[20] Kuban P., Kuban P., Kuban V., *J. Chromatogr. A,* 836 (**1999**) 75.
[21] Soga T., Ross G. A., *J. Chromatogr. A,* 834 (**1999**) 65.
[22] Chen Z., Naidu R., *J. Chromatogr. A,* 966 (**2002**) 245.
[23] Wharton J. A., Stokes K. R., *Electrochem. Comm.,* 9 (**2007**) 1035.
[24] Bombi G. G., Aikebaier R., Dean A., Di Marco V. B., Marton D., Tapparo A., *Polyhedron,* 28 (**2009**) 327.
[25] Sillen L. G., Martell A. E., Stability *constants of metal-ion complexes*, The Chemical Society, Burlington House, London **1964**, p. 545.
[26] Napoli A., *Talanta,* 15 (**1968**) 189.
[27] Sillen L. G., Martell A. E., Part 1 inorganic ligand *in Stability constants of metal-ion complexes-supplement # 1*, The Chemical Society, Burlington House, London **1971**, p. 504.
[28] Massart D. L., Vandeginste B. G. M., Buydens L. M. C., De Jong S., Lewi P. J., Smeyers-Verbeke J., Analysis of variance, in *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*, Part A, Amsterdam, Elsevier, **1997,** pp121-150.
[29] Massart D. L., Vandeginste B. G. M., Buydens L. M. C., De Jong S., Lewi P. J., Smeyers-Verbeke J., Comparison of the slopes of two regression lines, in *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*, Part A, Amsterdam, Elsevier, **1997**, pp208-209.

CONCLUSION

Ces études ont permis le développement de trois méthodes analytiques destinées à l'analyse des anions et des cations inorganiques par électrophorèse capillaire. Ainsi, 19 anions inorganiques ont pu être analysés en moins de 20 min à l'aide d'un électrolyte composé de chromate et de Tris dont la force ionique et la teneur en solvant ont été optimisées. Un facteur d'enrichissement supérieur à 20 a pu être obtenu grâce à l'injection électrocinétique des échantillons, après l'addition de 10 % (v/v) d'électrolyte afin de niveler les variations de conductivité d'un échantillon à un autre. Puis, 17 cations inorganiques ont été séparés en moins de 12 min à l'aide d'un électrolyte composé de guanidine (chromophore non-CMR) et d'un capillaire recouvert d'une double couche ionique composée de polybrène et de polyvinysulfonate permettant de limiter l'adsorption des cations sur les parois du capillaire et d'avoir un EOF indépendant du pH. Des limites de détections autour de la valeur ciblée par le Laboratoire Central ont été obtenues et atteignent 0.5 et 1.0 mg L^{-1} pour les anions et les cations, respectivement. Pour la première fois dans le domaine de l'analyse des explosifs par CE, les effets de matrices potentiels ont été étudiés. Il est apparu qu'une préparation et/ou une injection bien maitrisées des échantillons, en particulier en contrôlant les conductivités, permettaient de quantifier les composés (anions ou cations) par étalonnage externe avec des solutions standard dans l'eau sans générer de biais supérieur à 20 % pour la quantification.

Enfin, une méthode d'analyse de résidus issus d'explosions causées par des mélanges d'acide et d'aluminium a également été développée. L'analyse simultanée des anions chlorure et nitrate et du cation aluminium (III) complexé a été rendue possible grâce à l'utilisation de l'acide 2,6-pyridinedicarboxylique. La simulation du diagramme de spéciation de l'aluminium (III) dans une solution de PDC, réalisée avec le logiciel TOT, a permis de déterminer la gamme de pH autour de laquelle la forme anionique d'intérêt se trouvait majoritaire. La très bonne corrélation observée entre la simulation et l'expérience nous a conforté dans la justesse des résultats simulés. Des limites de détection d'environ 1 ppm pour les anions et 0,3 ppm pour l'aluminium (III) ont été obtenues.

Toutes ces méthodes ont ensuite été validées et comparées avec succès à la chromatographie d'échange d'ions, démontrant tout le potentiel de l'électrophorèse capillaire pour l'analyse d'échantillons réels variés et complexes.

PARTIE III – ANALYSE DE CARBOHYDRATES DANS DES RESIDUS POST-EXPLOSION PAR ELECTROPHORESE CAPILLAIRE

INTRODUCTION

Les sels à base de chlorate, perchlorate ou nitrate sont couramment utilisés dans les compositions d'explosifs artisanaux. L'ajout, à l'une de ces solutions salines, de carbohydrates commerciaux (saccharose, lactose, fructose, glucose…) a pour conséquence de dégager une quantité très importante de CO_2 ou de CO (équations 1 et 2 avec l'exemple du lactose en présence de chlorate), qui, en milieu confiné, provoque l'explosion du contenant pouvant provoquer d'importants dégâts.

$$8\ KClO_3 + C_{12}H_{22}O_{11}.H_2O \rightarrow 8\ KCl + 12\ CO_2 + 12\ H_2O \quad (1)$$
$$4\ KClO_3 + C_{12}H_{22}O_{11}.H_2O \rightarrow 4\ KCl + 12\ CO + 12\ H_2O \quad (2)$$

Il est donc très important de rechercher la présence de carbohydrates lorsque les anions nitrate, chlorate ou perchlorate sont détectés. Classiquement, au laborataoire, ces composés sont identifiés par chromatographie sur couche mince ou par chromatographie en phase liquide avec une détection réfractométrique conduisant à des limites de détection se situant autour de 100 mg L^{-1} et des temps d'analyse pouvant dépasser les 30 minutes.

Dans ce travail, l'électrophorèse capillaire a été testée afin de proposer une technique alternative plus rapide, plus performante et moins coûteuse. L'analyse directe des carbohydrates sous leur forme anionique par CE s'avère toutefois délicate en raison de leurs pKa très élevés (compris entre 11,9 et 12,5) et de leur absence d'absorbance UV. C'est pourquoi, aujourd'hui, les méthodes proposant une complexation in-situ de ces composés par l'anion borate ou une dérivation pré-colonne par un agent fluorophore sont des méthodes de choix [1].

Toutefois, il a été récemment démontré que dans un électrolyte composé de soude et de tampon phosphate de pH très élevé, les carbohydrates pouvaient être séparés et détectés à 270 nm sous forme d'ions énolates [2]. C'est cette approche que nous avons tenté de mieux comprendre et d'améliorer durant cette thèse. Tout d'abord, une étude de la détection des carbohydrates a permis de mettre en évidence la présence d'une réaction photochimique lors du passage des composés dans la fenêtre de détection. L'espèce détectée ne pouvant être un énolate, un travail sur l'identification de l'espèce intermédiaire absorbante a été réalisé. Puis, la séparation a été optimisée à l'aide d'un plan d'expériences. Enfin, la méthode développée a été validée puis appliquée à des échantillons réels récoltés après explosion. Une comparaison des performances avec la CCM a été également menée.

[1] Arentoft A. M., Michaelsen S., Sorensen H., *J. Chromatogr. A*, 652 (**1993)** 517.
[2] Rovio S., Yli-Kauhaluoma J., Siren H., *Electrophoresis*, 28 (**2007**) 3129.

CHAPITRE I – Article : Nouvelle stratégie pour la détection dans le bas UV des carbohydrates et des acides aminés par électrophorèse capillaire

NEW AVENUE FOR MID UV-RANGE DETECTION OF UNDERIVATIZED CARBOHYDRATES AND AMINOACIDS IN CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Cédric Sarazin[1,2,3,4], Nathalie Delaunay[2,3,4,*], Christine Costanza[1], Véronique Eudes[1], Jean-Maurice Mallet[3,5,6], Pierre Gareil[2,3,4]

Analytical Chemistry, 83 (2011), 7381-7387

[1]*Central Laboratory of the Prefecture de Police, 39 bis, rue de Dantzig, 75015 Paris, France.*
[2]*Chimie ParisTech, Laboratory of Physicochemistry of Electrolytes, Colloids and Analytical Sciences (PECSA), 75005 Paris, France*
[3]*UPMC Univ Paris 06, 75005 Paris, France*
[4]*CNRS, UMR 7195, 75005 Paris, France*
[5]*ENS, Laboratory of Biomolecules (LBM), 75005 Paris, France*
[6]*CNRS, UMR 7203, 75005 Paris, France*

ABSTRACT

Capillary electrophoresis (CE) appeared as an interesting alternative to chromatographic methods for carbohydrate analysis but it can be difficult to implement, due to the lack of easily ionizable functions and chromophore groups. Recently, a promising method was proposed by Rovio et al. for the CE separation under extremely high alkaline conditions of neutral carbohydrates under their alcoholate form and their direct UV detection, which is claimed to rely on the absorption of enediolate at 270 nm. Even more questionable, most of the detected compounds in Rovio's paper (for example sucrose) cannot give such enediolate, lacking a carbonyl group. In this work, we thoroughly revisited the experimental conditions proposed by this approach with respect to detection performances. In effect, unusual detection phenomena were observed in comparing reducing and non-reducing carbohydrate behaviors, which pointed to the existence of photochemical reactions in the detection window. A more systematic study of the influence of a number of parameter (lamp intensity, carbohydrate nature, electrolyte pH, residence time in the detection window, and capillary diameter) was undertaken. This study brings a deeper insight into the understanding of the mechanisms involved in this new direct UV detection mode and opens up new avenues for the detection in mid-UV range of non-UV absorbing compounds bearing reducing moieties, such as aminoacids.

1. INTRODUCTION

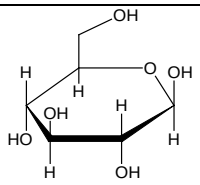
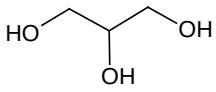
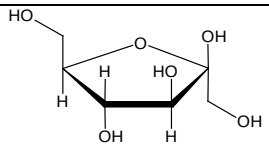
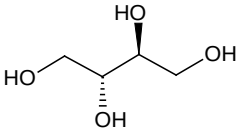
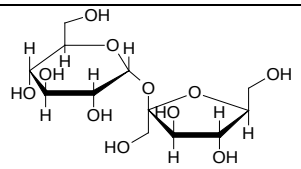
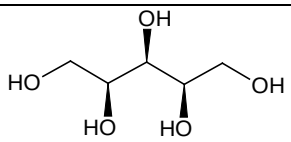
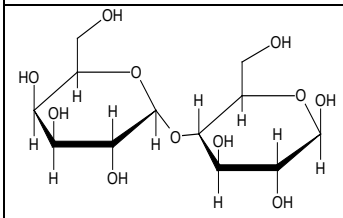
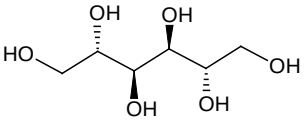
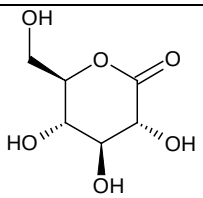
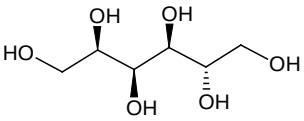
Carbohydrate analysis remains challenging due to the great molecular diversity and the presence of a number of structural isomers, and the lack of easy-to-implement and sensitive detection methods. Currently, methods used for the separation of carbohydrates include thin-layer chromatography [1], gas chromatography [2,3], and liquid chromatography (LC) [4-6]. Most often, LC methods used normal phase (HILIC) [7], reversed-phase [8] or anion-exchange modes [8,9] with direct low-UV-range or refractive index detections [4] and most often mass spectrometry, UV, or fluorescence detection after precolumn derivatization [10-12]. More recently, important developments were carried out with the coupling between high performance anion-exchange chromatography and pulsed-amperometric detection [4,9].

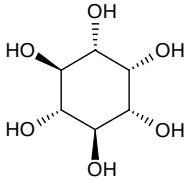
Nowadays, capillary electrophoresis (CE), with its high separation efficiency, low reagent consumption, and speed, appeared as an interesting alternative to chromatographic methods, especially for sulfated and carboxylated carbohydrates [4,12-16], but the analysis of so-called neutral carbohydrates can be more difficult to implement, due to the absence of easily ionizable functions (other than anomeric hydroxyl group) and chromophore groups (see Table III-I-1), and the high hydrophilic character of these compounds, which makes the use of micelles inoperable. Different strategies are available to circumvent these different drawbacks. Complexation with borate anions at pH comprised between 8.0 and 10.0 has long been used in carbohydrate analysis and exploited in CE with direct UV detection at 195 nm [17,18] but this low wavelength does not favor selective detection, generates interferences, and suffer from poor sensitivity. As of today, the most widely used CE methods have involved the labeling of carbohydrates by a chromophore or fluorophore through a pre-column derivatization step [19-25]. Limits of detection in the micromolar range were obtained, but these methods suffer from complex and time-consuming derivatization steps. Alternatively, indirect UV detection of underivatized carbohydrates can be carried out at extremely high pH (12-14) with the use of an anionic chromophore, such as 2,6-pyridine dicarboxylate [26-28], 1-naphtyl acetate [29], riboflavin [30], tryptophan [31], or sorbate [32-34]. Nevertheless, the limits of detections were comprised between 20 and 1000 µM, due to the deleterious presence of hydroxyl anion at high concentration.

More recently, a new method described by Rovio et al. allowed the direct UV detection under extremely high alkaline conditions (130 mM NaOH, 36 mM Na_2HPO_4) [35,36]. According to the authors, carbohydrates were detected under their enediolate forms at 270 nm but interestingly, most of the detected compounds (for example sucrose) cannot give such enediolate, lacking a carbonyl group. In this work, we revisited the experimental conditions of this approach with respect to detection performances. In effect, unusual detection phenomena were observed in comparing reducing and non-reducing carbohydrate behaviors, which pointed to the existence of photochemical reactions in the detection window. A more

systematic study of the influence of a number of parameter, including lamp intensity, carbohydrate nature, background electrolyte (BGE) pH, residence time in the detection window, and capillary diameter was undertaken. This study brings a deeper insight into the understanding of the physico-chemical mechanisms involved in this new direct UV detection mode and opens up new avenues for the detection in mid-UV range of non-UV absorbing compounds bearing reductive moieties, such as aminoacids and peptides.

Table III-I-1 – Names, structures, pKa values and molecular weights of studied carbohydrates and polyols

Carbohydrates and derivative			Polyols		
Name and structure	pKa	Mw (g mol^{-1})	Name and structure	pKa	Mw (g mol^{-1})
 Glucose	12.3[4]	180	 Glycerol	14.2[38]	92
 Fructose	12.0[4]	180	 Erythritol	13.9[38]	122
 Sucrose	12.5[4]	342	 Xylitol	13.7[38]	152
 Lactose	12.0[4]	342	 Mannitol	13.5[38]	182
 δ-Gluconolactone	13.1[37]	178	 **Sorbitol**	13.6[38]	182

	 Myo-inositol	12.9[38]	180

2. EXPERIMENTAL SECTION

2.1. Standards and solutions

Polyols (glycerol, erythritol, xylitol, mannitol, sorbitol, and myo-inositol), cyclodextrins (α-CD, β-CD, γ-CD, HP-α-CD, and heptakis(2,3,6-tri-*O*-methyl)-β-CD), aminoacids (arginine, proline, glycine), naphthalenesulfonic acid (internal reference), and δ-gluconolactone were purchased from Sigma-Aldrich (L'Isle-d'Abeau, France). Glucose, lactose, sucrose, fructose, and N-dimethylformamide (DMF) were obtained from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). Individual solutions of each compounds were prepared weekly at 1000 mg L^{-1} by dissolution in ultra-pure water delivered by a Direct-Q3 UV system (Millipore, Molsheim, France). BGEs for CE were prepared from 1 M NaOH solution (Carlo Erba, Val-de-Reuil, France) and $Na_2HPO_4{\cdot}2H_2O$ (Sigma-Aldrich). The final BGE was composed of 130 mM NaOH (pH 13.1). Hexadimethrine bromide (HDMB) used as coating agent was purchased from Sigma-Aldrich. HDMB at 0.1 g / 100 mL was prepared by dissolving the appropriate amount in ultra-pure water.

2.2. Apparatus

Detection studies and separations were carried out with a Beckman Coulter P/ACE MDQ system (Villepinte, France) equipped with a diode array detector (DAD) set at 270 nm (measurement wavelength) and 350 nm (reference wavelength) and with bandwidths set at ± 10 nm and ± 40 nm, respectively. Instrument control and data acquisition were performed using Beckman 32 Karat® software. Corrected areas were calculated as peak area to migration time ratio (A_i / t_{Mi}). For comparison purposes, Agilent Technologies HP^{3D}CE and HP 7100 capillary electrophoresis systems, equipped with DADs (Massy, France) were also used. A PHM210 Meterlab pH-meter, (Metrohm, Villebon Courtaboeuf, France), equipped with a high-alkalinity electrode was used to measure BGE pH. A Varian Cary 100 UV spectrometer, purchased from Bioserv (Thiais, France), was used to monitor UV spectra.

2.3. Electrophoretic conditions

Electrophoretic separations were performed using 60 cm Polymicro bare fused-silica capillaries with internal diameters of 50, 75 or 100 µm purchased from Photonlines (Marly-Le-Roi, France). A window was created for the UV detection on the capillary at 10 cm from the anodic end, and detection windows of 200 and 800 µm aperture lengths were compared. Before first use, capillaries were conditioned by successive flushing with 1 M NaOH, 0.1 M NaOH, ultra-pure water, HDMB solution, and finally BGE, each under 2.8 bar for 3 min (12 capillary volumes). Between each run, due to the high BGE pH, the HDMB coating was regenerated by percolating the solution under 2.8 bar for 1 min (4 capillary volumes) and afterwards the capillary was reequilibrated with BGE under 2.8 bar for 3 min (12 capillary volumes). Injections were performed hydrodynamically under 50 mbar for 5 s (0.7 % of the capillary volume). Unless specified, separations were run at 20 °C under -16 kV. BGE was renewed between each run.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Improvement in Rovio's method

Rovio et al. demonstrated that neutral carbohydrates can be separated in bare fused-silica capillaries in under 30 min and detected in a new mode by direct UV absorbance at 270 nm, applying extremely high pH conditions with a BGE composed of 130 mM sodium hydroxide and 36 mM $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$ [35,36]. Under these pH conditions, carbohydrates are partially negatively ionized because of the acidity of the anomeric hydroxyl group, having pKa values between 12.0 and 13.5 [4]. According to the authors, the presence of disodium hydrogen phosphate in this electrolyte increased BGE viscosity and resulted in an improvement in resolution. At the beginning of this work, we re-investigated the experimental conditions described by Rovio et al. in order to better understand the physico-chemical mechanism involved in this detection mode, using a standard mixture of five neutral carbohydrates, glucose, fructose, mannitol, sucrose, and lactose (see Table III-I-1). Simultaneously, we attempted to reduce the analysis time for this separation, in using an electrolyte only composed of sodium hydroxyde (130 mM, pH 13.1). The performances produced by these two electrolytes (efficiencies, corrected peak areas, limits of detection (LOD), and analysis time) are compiled in Table III-I-2. Peak efficiencies and corrected areas and their respective RSDs were almost comparable between these two BGE compositions but the LOD for glucose was multiplied by a factor of 2 when the BGE used was just composed of NaOH. The measured baseline noise had values of 0.04 and 0.05 mAU for NaOH + phosphate-based and NaOH-based BGEs, respectively. In conclusion, the BGE composed with only NaOH offered almost the same performances that NaOH + phosphate BGE. This BGE, simpler to prepare and providing slightly faster separations, was therefore selected for this study.

When separation voltage was modified, unexpected phenomena were observed. In effect, as shown in Figure III-I-1A, upon increasing separation voltage, for each carbohydrate, corrected peak areas that were normalized by their value obtained at -8 kV decreased, whereas for naphthalenesulfonate, used as internal standard, the corrected areas remained almost independent of the separation voltage, as expected. This finding suggested that corrected peak areas for carbohydrates might depend on their residence time in the detection window, which pointed to the existence of a photochemical reaction in the detection window. This assumption was corroborated by the fact that the sucrose UV spectrum in 130 mM NaOH, which was acquired with a classical grate spectrophotometer does not exhibit any absorbance band around 270 nm (Figure III-I-1B). No absorbance band and no peak were also observed with Agilent HP^{3D}CE and HP 7100 systems. Moreover, when the Beckman Coulter P/ACE MDQ system was equipped with a fixed-wavelength UV detector (mercury lamp) at 280 nm, no signal was detected either. A particular feature of the Beckman DAD is that the incident UV light (from a deuterium lamp with a continuum 160-400 nm emission) does not go past a filter before reaching the sample, which means that the sample is irradiated by very short wavelength UV light (< 200 nm, called VUV for Vacuum UV), that actually may initiate a photochemical reaction.

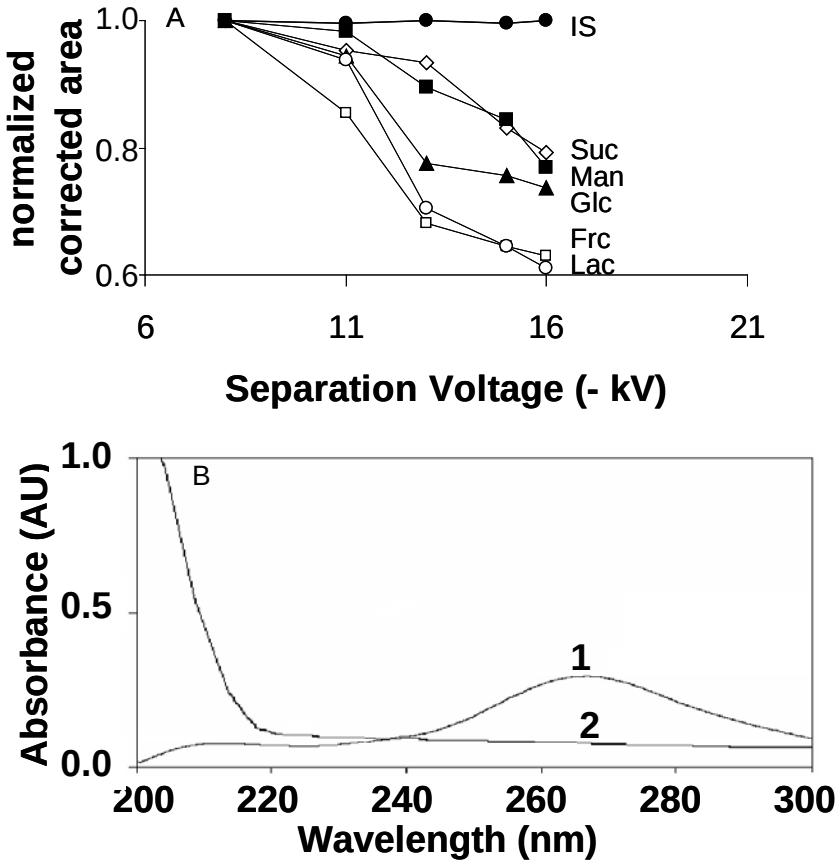


Figure III-I-1. (A) Variation of carbohydrate and naphthalenesulfonate corrected peak areas normalized by their value obtained at -8 kV as a function of separation voltage. Bare fused-silica capillary, 50 µm id × 60 cm (UV

detection at 50 cm). BGE: 130 mM NaOH (pH 13.1). Temperature, 20 °C. Hydrodynamic injection, 5 s, 50 mbar. Direct UV detection at 270 nm. Analyte concentrations, 0.050 mM. Identification, IS = naphthalenesulfonate, Suc = sucrose, Man = mannitol, Glc = glucose, Frc = fructose, Lac = Lactose. (B) UV spectrum of an aqueous solution of 0.05 mM sucrose in 130 mM NaOH registered with (1) Beckman Coulter DAD and (2) Varian Cary 100 UV spectrometer (optical path length: 1.0 cm).

Table III-1-2. Figures of merit (peak efficiencies, LODs, and corrected areas) for the analysis of the 4 carbohydrates and polyol of interest at 0.05 mM: glucose (Glc), fructose (Frc), lactose (Lac), sucrose (Suc), and mannitol (Man). Experimental conditions: bare fused silica capillary, 50 µm x 60 cm (detection, 50 cm). BGE, as specified. Temperature, 20 °C. Direct UV detection at 270 nm. Hydrodynamic injection, 5 s, 50 mbar (0.67 % of the capillary volume).

BGE	Peak efficiencies (RSD (n = 3))					Limits of detection (µM) calculated at a S/N of 3 (RSD (n = 3))					Corrected areas (RSD (n = 3))					Analysis Time (min)
	Glc	Frc	Lac	Suc	Man	Glc	Frc	Lac	Suc	Man	Glc	Frc	Lac	Suc	Man	
130 mM NaOH , 36mM $Na_2HPO_4 \cdot H_2O$, pH 13.05	89700 (4 %)	93200 (4 %)	98700 (5 %)	101200 (5 %)	84200 (7 %)	33 (2 %)	47 (2 %)	32 (1 %)	29 (2 %)	51 (1 %)	1290 (7 %)	940 (8 %)	2750 (7 %)	2850 (5 %)	1960 (6 %)	22
130 mM NaOH, pH 13.1	87600 (5 %)	88700 (5 %)	94200 (4 %)	97500 (5 %)	90100 (5 %)	68 (3 %)	69 (2 %)	31 (4 %)	23 (2 %)	42 (3 %)	1030 (8 %)	790 (7 %)	3090 (7 %)	3290 (4 %)	2140 (5 %)	19

3.2. Highlight of the photochemical reaction

The hypothesis of a photochemical reaction in the separation window was tested by varying carbohydrate residence time in the detection window more systematically. For this purpose, a 50 µm id (365 µm od) x 60 cm total length (detection window, 50 cm) capillary was first filled with the 130 mM NaOH BGE and 0.05 mM sucrose in 130 mM NaOH was next continuously introduced hydrodynamically under various successive applied pressures. The resulting hydrodynamic fronts were recorded at 270 nm. The carbohydrate residence time was thus modulated by the applied pressure value (from 280 to 7 mbar) and the length of the separation window (800 and 200 µm). DMF was added to the sucrose solution, at a concentration of 0.01 % (v/v), as an internal reference and detected at 210 nm. The analyte residence times were then calculated from the lengths of the detection window and the flow velocities obtained by Hagen-Poiseuille law. The plots of the measured plateau absorbance for sucrose and DMF as a function of residence time are represented in Figure III-I-2A. As expected, DMF plateau absorbance was almost constant upon increasing residence time, whereas sucrose absorbance increased almost linearly over the range of residence times experienced (0 – 4 s). Interestingly, identical absorbances were obtained with the two different aperture lengths of 200 and 800 µm for a given residence time. Linear absorbance variations were also obtained for glucose, fructose, lactose, and mannitol. These results clearly identified residence time as the parameter influencing plateau absorbance and demonstrated that a photochemical reaction was taking place as the carbohydrate went past the detection window. Similar experiments were next resumed with capillaries of different inner diameters, 25, 75 and 100 µm, and identical outer diameter (365 µm). Figure III-I-2B shows that for all four capillary id values of 25, 50, 75, and 100 µm, the curves representing the variation of plateau absorbance in terms of residence time could be quite superimposed, provided that absorbances were normalized by capillary id. This additional result shows that for a given residence time, plateau absorbances were mainly dependent on optical path length solely, and that varying capillary id had no peculiar effect on the photochemical reaction taking place. For residence time longer than ca 8 s, a decrease in absorbance was noticed, which suggests the existence of successive reactions, involving the transient formation of an intermediary compound that would be responsible for the absorbance at 270 nm. It is worthy of note that the derivative of the plot of absorbance *vs* residence time is proportional to the speed of the reaction giving the absorbing intermediate.

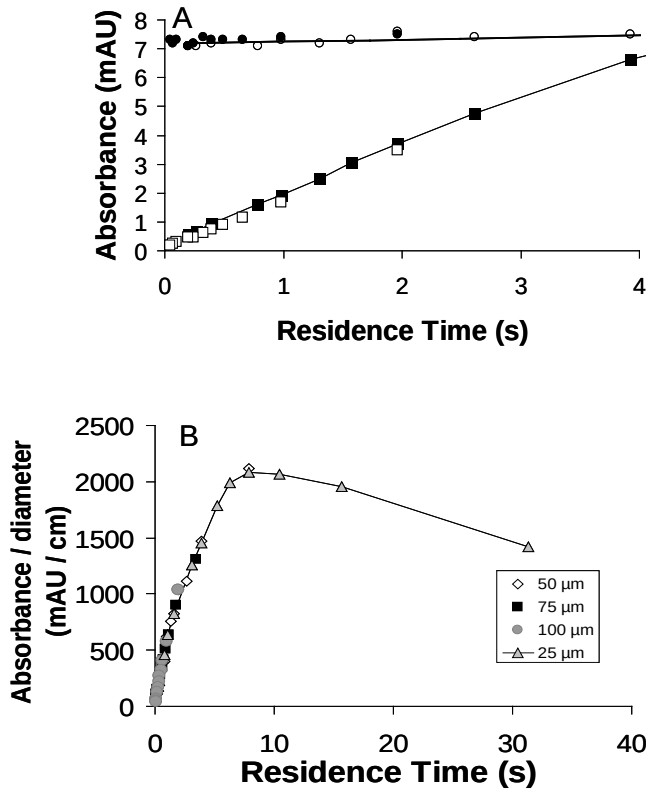


Figure III-I-2. (A) Variation of absorbance front intensities as a function of residence time in the separation window for sucrose (◖ 800 µm aperture and □ 200 µm aperture) and for DMF (● 800 µm aperture and ○ 200 µm aperture). (B) Variation of sucrose absorbance front intensities normalized by capillary inner diameter (25, 50, 75, and 100 µm) as a function of residence time in separation window. Bare fused-silica capillary, 50 µm id (A), 25, 50, 75, and 100 µm (B) × 60 cm (UV detection at 10 cm). Capillary initially filled with 130 mM NaOH, then hydrodynamic short-end introduction of 0.05 mM sucrose + 0.01 % (v/v) DMF in 130 mM NaOH solution. Direct UV detection at 270 nm (sucrose) and 210 nm (DMF).

3.3. Photooxydation of carbohydrates

The photochemical reaction that was previously set forth for sucrose was subsequently exemplified for other carbohydrates. Figure III-I-3A presents the variation of absorbance front intensities in terms of the residence time in the separation window for various reducing and non-reducing carbohydrates at 0.05 mM in 130 mM NaOH solution. It appeared that all the carbohydrates studied displayed the same behavior as sucrose. The reducing or non-reducing character of the carbohydrate solely does not allow to account for the absorbance observed, which seems to be also influenced by the pKa value of the carbohydrate (see Table III-I-1). In effect, as shown for mannitol (pKa: 13.5) in Figure III-I-3B, the higher the pH in the range of from 12.0 to 13.1, the higher the absorbance front intensity, which indicates that the formation of the absorbing intermediate is favored by the presence of mannitol in its deprotonated form and/or OH^- concentration.

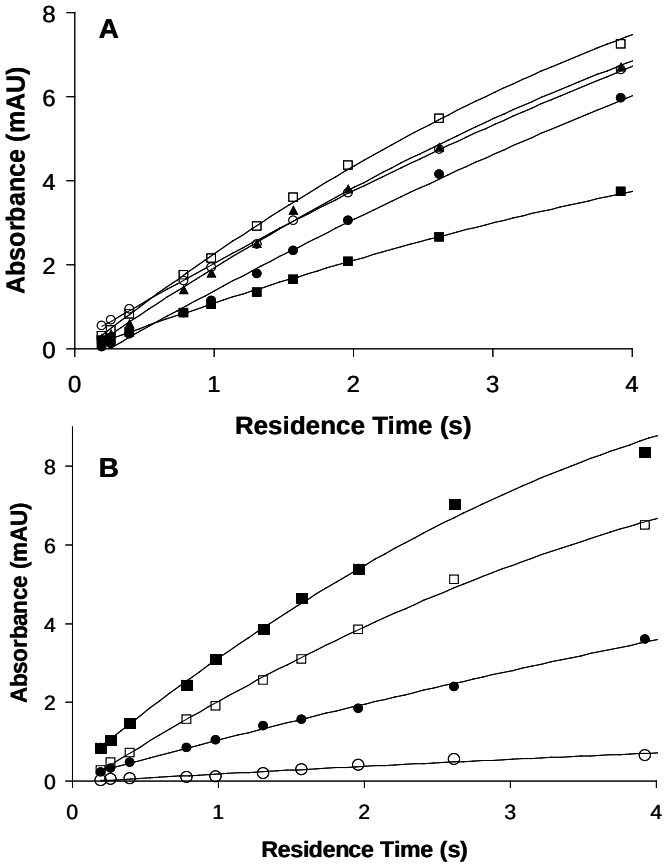


Figure III-I-3. Absorbance front intensities as a function of residence time in the separation windows for (A) various reducing and non-reducing carbohydrates at 0.05 mM in 130 mM NaOH (pH 13.1) solution and (B) for 0.05 mM mannitol in NaOH solutions of various concentrations. Bare fused-silica capillary, 50 µm id × 60 cm (UV detection at 10 cm). Capillary initially filled with (A) 130 mM NaOH, (B) NaOH solutions of various concentrations, then hydrodynamic short-end introduction of (A) 0.050 mM carbohydrate in 130 mM NaOH and (B) 0.050 mM mannitol in NaOH solution of the same concentration as that used for initial filling. Direct UV detection at 270 nm. Identification: (A) fructose (■), glucose (▲), lactose (●), sucrose (○), and mannitol (□); (B) 10 mM NaOH (pH 12.0) (○), 32 mM NaOH (pH 12.5) (●), 63 mM NaOH (pH 12.8) (□), and 130 mM NaOH (pH 13.1) (■).

The influence of the temperature was also checked between 20 °C and 35 °C, but no direct effect was noticed on detection, except for the fact that, at otherwise constant settings, an increase in temperature resulted in a decrease in residence time and hence in absorbance front intensity, due to concomittant viscosity variations. Also, temperature was kept at 20 °C for subsequent experiments.

An important amount of work was then carried out to identify the nature of the detected species. A stop flow method, consisting in stopping solutions of carbohydrates in the detection window and recording their UV traces and their associated UV spectra was implemented. The capillary was first filled with 130 mM NaOH solution, then percolated with 0.05 mM carbohydrate in 130 mM NaOH under 207 mbar. At time of about 2.5 min, the absorbance front was detected and at time 4.0 min the hydrodynamic flow was stopped. The resulting UV traces for sucrose are presented in Figure III-I-4 with UV spectra acquired at

4.2, 4.4, 4.7, and 7.3 min. As soon as the hydrodynamic flow was stopped, a steep increase in absorbance was observed, corresponding to the formation of an intermediate species having a maximum absorbance at 265 nm (UV spectrum at time 2), which is probably the same as that detected in the CE analyses. This intermediate species, that is obviously unstable, was quickly transformed into a more stable species having a maximum absorbance at 210 nm. At the end of the reaction, the absorbance level is lower than that created by the 130 mM NaOH solution before the breakthrough of sucrose. This observation is consistent with the consumption of NaOH during the photochemical reaction. It is worth noting that similar UV traces were obtained for lactose, mannitol, glucose, and fructose, but for the case of monosaccharides, the intermediate species vanished faster. The intermediate cannot be an enediolate originated from sugar deprotonation: an enediolate comes from the deprotonation of an alpha hydroxy ketone or aldehyde. Enediolates are known as reactive intermediate in aldolization reaction, prone to retroaldolization in carbohydrate series, and thus not expected to be present at high concentration. Aldehydes, ketones, or carboxylates show weak absorption in these wavelengths because of their very small epsilons. Dihydroxy acetone in water (pH 7.0) absorbed with an epsilon similar to isolated ketone [39]. Even more critically, most of the detected compounds in Rovio's paper and in this paper (for example sucrose) cannot give such enediolate, lacking a carbonyl group. In basic media, no hydrolysis of the glycosidic bond can occur; so unsaturated group cannot originate for hydrolysis but must come from on oxydative process. Irradiation of carbohydrates in basic water giving 265 nm absorbing compounds is an already known phenomenon and the formation of UV absorbing species (λ_{max} 268 nm) by UV irradiation of alkalinized solution of sugars (Glc, Frc, Suc, Lac) was already used as an analytic tool for carbohydrate in juices and wines [40,41], although the nature of absorbing compounds was not defined at this point: these products have been identified as carbonyl compounds by dinitrophenylhydrazine colorimetry. A plateau was reached after 10 min irradiation (low pressure Hg lamp (184 nm, 253 nm), pH 9.5) then the absorbance decreased. As shown in Figure III-I-4, a faster decrease was obtained with a deuterium lamp. In the absence of any filter before reaching the sample, dioxygen and water absorbed UV light (at 200-250 nm and < 200 nm, respectively) and give rise of a complex system of reactive inter-converting oxygen species (OH^o hydroxyl radical, O^{o-}, ozone, ...) [42]. Such species react with all the present organic compounds, leading to their oxidation (by hydrogen atom abstraction or heteroatom oxidation) to ketones, aldehydes, acids, and after intensive cleavage of H-C / C-C bonds to unsaturated C3 or C2 fragments, and eventually to CO_2 and water. Oxidation reaction thus equally proceeds on reducing and not reducing carbohydrates. Putative intermediates and mechanisms were proposed, but without clear experimental evidence as formed compounds are further transformed.

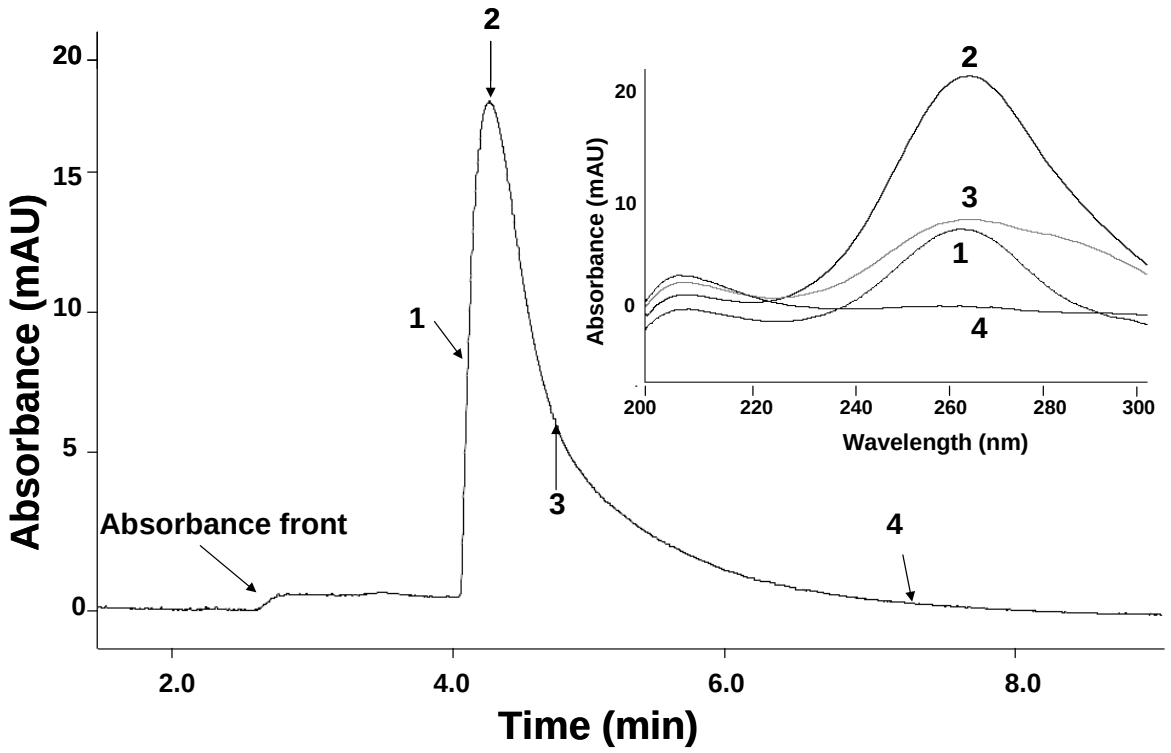


Figure III-I-4. Evolution of the absorbance as a function of time after stopping the hydrodynamic flow 4 min after sucrose introduction. Bare fused-silica capillary, 50 µm id × 60 cm (UV detection at 50 cm). Capillary initially filled with 130 mM NaOH, then hydrodynamic introduction of 0.05 mM sucrose in 130 mM NaOH. Direct UV detection at 270 nm.

These reactions have found uses in environmental remediation and water sterilization. As an example, pinene was completely photo-oxidized into C3, C2 acids, and aldehydes [43]. In addition to this, irradiations with gamma rays of basic solution of carbohydrates were investigated in details the 70-80s [44]. The conditions of irradiation, which were similar to those found in the present study (OH°, pH 13.0), produced UV absorbing species and the major chromophoric compound identified was malondialdehyde. In basic medium, malondialdehyde is deprotonated to give a conjugated enolate (λ_{max} 265 nm, epsilon 30000 L mol^{-1} cm^{-1}). It is important to note that the rate of formation of absorbing compounds increased dramatically above pH 12.0. This value coincides with the pKa of $OH°/O^{-o}$ (11.8) and may suggest a stronger reactivity of O^{-o}. As the reaction proceeds, many compounds (absorbing at 265 nm or not) are formed [45] (polymer, aromatic aldehydes...). Radiolysis or sonochemical experiments were conducted in O_2 and N_2 atmospheres [46] and showed differences in final products [47,48], although in both conditions, UV absorbing species were formed. It is, however, difficult in this respect to compare radiolitic and UV activations. According to these literature data, we propose that similar photooxidation of carbohydrates takes place in the detector cell, leading to the formation of UV absorbing unsaturated

compounds (probably malonaldehyde, or related conjugated carbonylated derivatives). The mechanism of the malonaldehyde formation (Figure III-I-5) was previously proposed by Buknall et al. after carbohydrate irradiation in basic media [44].

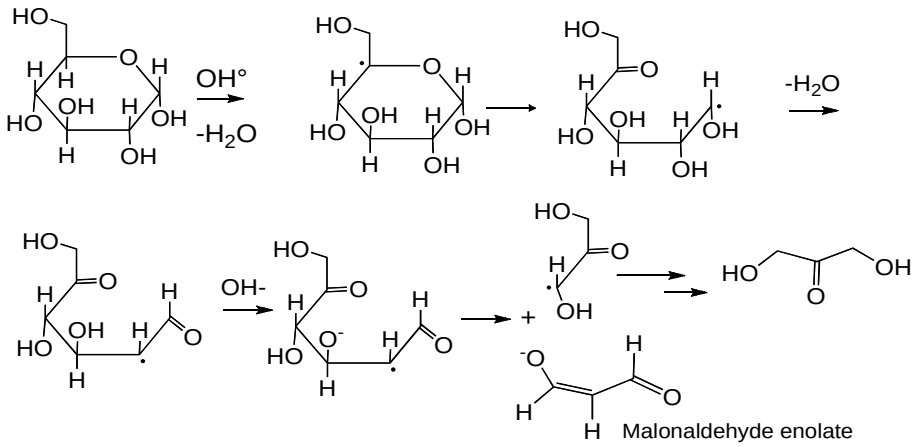


Figure III-I-5. Exemple of glucose fragmentation pathway from Bucknall et al. From [44]

Following experiments were carried out to confirm this hypothesis. In order to determine if there is an influence of the number of hydroxyl functions present in the carbohydrate on the photochemical reaction taking place, a series of polyols containing 3 (glycerol), 4 (erythritol), 5 (xylitol), and 6 (mannitol, sorbitol, myo-inositol) carbon atoms and hence 3-6 hydroxyl functions, was investigated. Figure III-I-6A shows that the absorbance front intensity at 270 nm increased with the number of hydroxyl groups in the carbohydrate. This is consistent with an increase in the number of chromophoric fragments. UV spectra acquired while these compounds were in the detection window showed similar absorbance maximum at 265 nm, except myo-inositol, which has a cyclic conformation, and for which absorbance maximum was shifted to 270 nm. The same experiments were performed with a series of cyclodextrins (α-CD, β-CD, γ-CD, HP-α-CD, and heptakis(2,3,6-tri-*O*-methyl)-β-CD), and the results were compared with those for glucose. Figure III-I-6B shows that, contrary to what was observed for polyols, absorbance did not increase in terms of the number of glucose units. In effect glucose exhibited the maximum absorbance whereas α-CD, β-CD, and γ-CD which are constituted of 6, 7, and 8 glucose units, respectively, almost displayed the same absorbance variations (but slightly increasing in this order, nevertheless). Interestingly, a partially derivatized CD such as HP-α-CD showed less sensitivity, while a CD which is totally devoid of hydroxyl groups such as heptakis(2,3,6-tri-*O*-methyl)-β-CD, presented no signal at all. As a final assessment of the results obtained, δ-gluconolactone, which in basic media is quickly transformed into gluconate, was also tested, and it behaved very similarly to glucose (Figure III-I-6B).

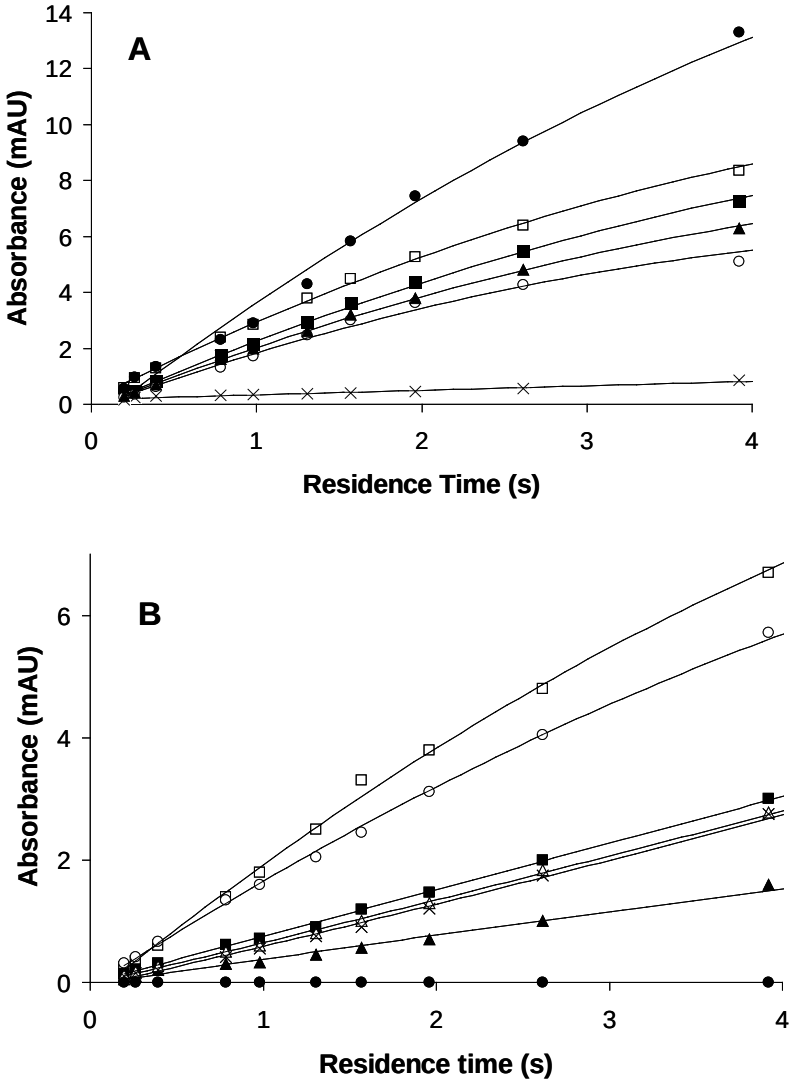


Figure III-I-6. Variation of absorbance front intensities as a function of residence time in the detection window for polyols (A) and glucose-based compounds (B), all at 0.05 mM concentration. Experimental conditions, see Figure III-I-4. Identification: (A) glycerol (×), erythritol (○), xylitol (▲), mannitol (■), sorbitol (□), myo-inositol (●); (B) Heptakis(2,3,6-tri-*O*-methyl)-β-CD (◖), HP -α-CD (◭), α -CD (×)β -CD (Δ), γ-CD (◐), δ -gluconolactone (○), glucose (□).

This point is consistent with a chain oxidation. These results established that hydroxyl groups are involved in a photochemical transformation in the detection window, which is favored by the number of present hydroxyl groups and their ionization degree, but also depends on structural issues. This photochemical reaction should first lead to a carbonylated species, having a maximum absorbance around 265-270 nm. The fact that non-reducing carbohydrates and polyols are detected in the same conditions as reducing carbohydrates lend support to considering a preliminary oxidative step. Afterwards, as UV absorbance at 265-270 nm vanished, oxidation in the detection window should be completed to the carboxylate degree,

giving rise to absorbance at 210 nm. Moreover, although not easy to control in our experimental set, some dependence of signal intensity on the presence of dioxygen was found.

All the described phenomena (signal suppression by a filter intercalated between light source and sample, correlation with UV spectra, effectiveness of the reaction with reducing and non reducing carbohydrates, UV signal increasing with the number of OH groups, and dependence of signal intensity on the presence of dioxygen) were consistent with the malonaldehyde detection or related compounds as intermediate species in the detection window.

3.4. Photooxydation of aminoacids and peptides

The photooxydation detection mode was thoroughly studied for reducing and non-reducing carbohydrates and for polyols was then contemplated for another reducing group-containing family of utmost importance, such as aminoacids. Just for or the sake of a preliminary study, only a few representative UV-transparent aminoacids were tested in this work: glycine, proline, and arginine. In effect, these aminoacids injected at a concentration of 0.05 mM were also detected at 270 nm, under the same electrophoretic conditions as the carbohydrates, but with a lower sensitivity. As for carbohydrates and polyols, the influence of pH on absorbance front intensities was considered for glycine between pH 11.0 and pH 13.0 (Figure III-I-7). Although ionization degree for glycine (pKa: 9.6) was almost not affected in this pH range, a marked increase in absorbance and a higher rate for the formation of the absorbing intermediate was observed. This behavior lend support to considering OH^- concentration as a key parameter in yielding a series of UV absorbing photooxydation products, probably including with imine or aldehyde functions and eventually comprising formol, according to the study of the radiolysis of aminoacids [49,50].

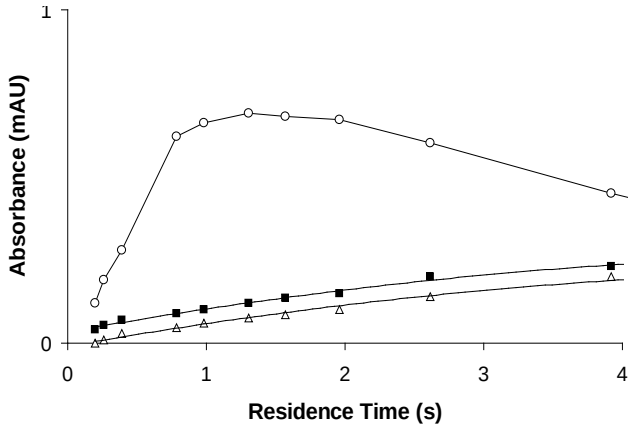


Figure III-I-7. Variation of absorbance front intensities as a function of residence time in the detection window for glycine at 0.05 mM concentration for pH 11.0 (Δ), pH 12.0 (■), and pH 13.1 (○). Exper imental conditions, see Figure III-I-4.

To give an idea of possible application of this method in various areas and especially such as food analysis, the CE separation of a standard mixture containing glucose, sucrose, δ-gluconolactone, mannitol, β-CD, glycine, proline, and arginine all at 0.05 mM, and naphthalenesulfonic acid as internal standard is given in Figure III-I-8. UV spectrum of each compound was also recorded.

Operation under reversed (cathodic) electroosmotic flow conditions speeded up the separation and allowed to detect all the injected compounds in under 12 min. Gluconolactone, which is quickly transformed into gluconate migrated faster than glucose. Aminoacids were better detected at around 250 nm.

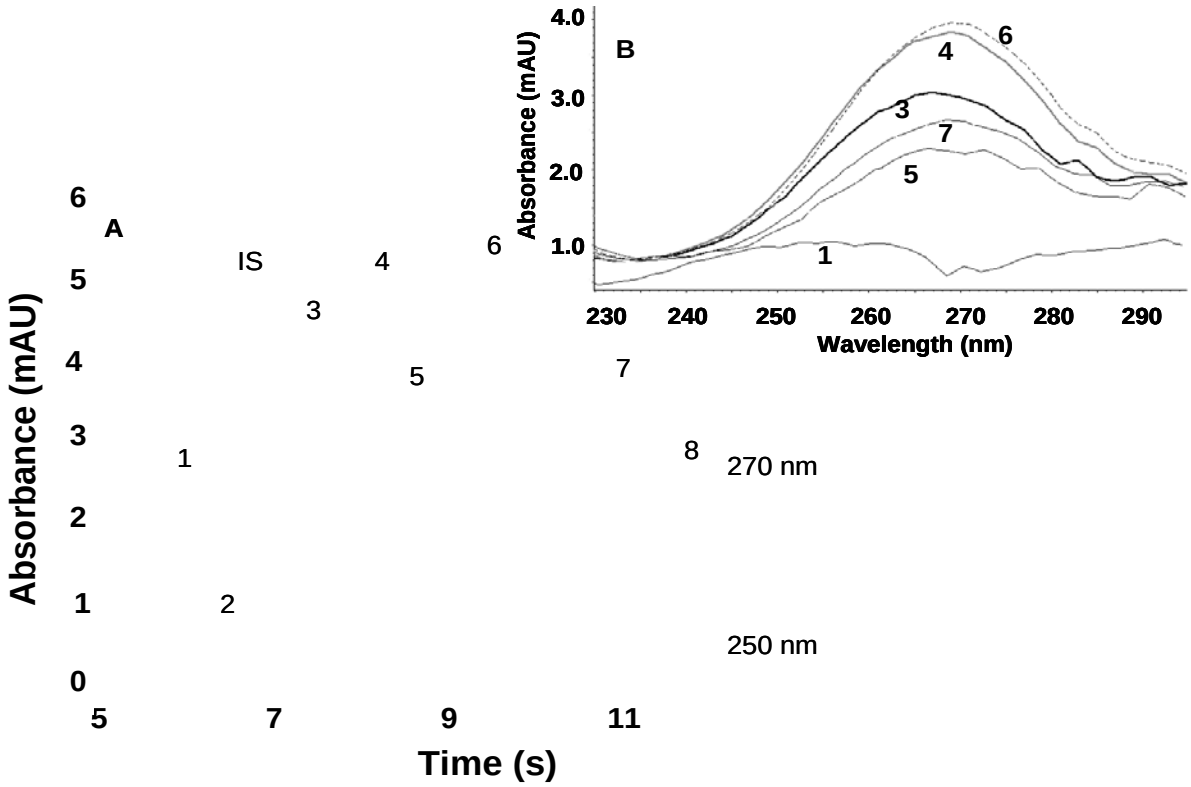


Figure III-I-8. CE separation of a mixture of carbohydrates and aminoacids in water. Bare fused-silica capillary, 50 µm I. D. × 60 cm (UV detection at 50 cm) modified with HDMB (0.10 g in 100 mL ultra-pure water). BGE: 130 mM NaOH (pH 13.1). Temperature, 20 °C; applied voltage, -16 kV; hydrodynamic injection, 5 s, 50 mbar. Direct UV detection at 250 and 270 nm. Analyte concentration, 0.05 mM each in ultra-pure water. Identification, glycine (1), proline (2), gluconolactone (3), glucose (4), β-CD (5), sucrose (6), mannitol (7), arginine (8), naphthalenesulfonic acid (IS). Proline and arginine UV spectra were not overlaid to make it the figure more easily readable and because their absorbance intensities were low.

3.5. Repeatability, linearity, and LODs

The repeatability of the method was evaluated for a test mixture of naphthalenesulfonate (IS), glucose, fructose, lactose, sucrose, and mannitol at about 0.050 mM by making ten repeated

analyses (n = 10). The responses measured on each electropherogram were the normalized corrected area $(A_i / t_{Mi}) / (A_{IS} / t_{IS})$ and the normalized migration time $(t_{Mi} / t_{M\,IS})$ of each peak. RSDs for the normalized corrected areas varied from 2.4 % for glucose to 4.3 % for mannitol, and RSDs for the normalized migration times varied from 0.8 % for glucose to 2.1 % for mannitol. The impact that the time of use of the deuterium lamp may have on detection signal intensity was also considered. To this end, regular measurements (about every 100 hour) were performed. It appeared that between 350 and 1200 hours of usage, an average variation of only 4.4 % was noted on normalized corrected areas. In accordance to this, it can be said that the detection sensitivity was maintained as long as the energy of the lamp remained constant.

The linearity range of the normalized corrected areas at 270 nm for carbohydrates was determined between 0.008 and 0.60 mM with coefficients of determination R^2 superior to 0.992 for each compound. For aminoacids, the linearity range, determined at 250 nm, was narrower, as evaluated from 0.05 to 2.0 mM with R^2 values comprised between 0.990 and 0.995.

Finally, LODs for carbohydrates determined at 270 nm for a S/N of 3, varied from 0.004 mM for glucose to 0.006 mM for fructose and those for aminoacids, determined at 250 nm, varied from 0.02 mM for glycine and arginine to 0.05 mM for proline.

Obtained LODs for carbohydrate were much better than those afforded by indirect UV detection, but remained higher than those reported with fluorescence detection after derivatization. For underivatized aminoacids, obtained values are superior to those afforded by mass spectrometry [51] but required much simpler instrumentation.

4. CONCLUSIONS

This work highlights that a photooxidation reaction of carbohydtrates and polyols can take place under high alkaline conditions in the detection window of some UV detectors, according to their optical design. A substantial insight into the complex molecular mechanisms involved was provided, consistent with literature data, and malonaldehyde or related compounds was proposed as the intermediate chromophoric structure being formed. The residence time in detection window appeared as the key parameter governing signal intensity. Preliminary experiments on the use of this detection mode for other reducing compounds demonstrated direct UV detection capabilities of underivatized aminoacids at 250 nm, but with a lower sensitivity than for carbohydrates and polyols. Optimization of the instrumental and optical design of the detector in order to take the best part from this detection mode was not the purpose of the present work and is still to be done. At least a tenfold improvement in the present limits of detection could reasonably be reached.

5. REFERENCES

[1] Marsit C. J., Fried B., Sherma J., *J. Liq. Chrom. Rel. Tech.* 23 (**2000)** 2413.
[2] Medeiros P. M., Fernandes M. F., Dick R. P., Simoneit B. R. T., *Chemosphere* 65 (**2006)** 832.
[3] Ruiz-Matute A. I., Hernandez-Hernandez O., Rodriguez-Sanchez S., Sanz M. L., Martinez-Castro I., *J. Chromatogr. B* 879 (**2011)** 1226.
[4] El Rassi Z., In *J. Chromatogr. Library, vol. 66.;* Elsevier: Amsterdam, **1995**.
[5] El Rassi Z. *J. Chromatogr. A* 720 (**1996)** 93.
[6] Siemiatkoski J., Lyubarskaya Y., *Developments in Biologicals* 122 (**2005)** 69.
[7] Karlsson G., Winge S., Sandberg H., *J. Chromatogr. A* 1092 **2005** 246.
[8] Meyer A., Fischer H., Kuzyakov Y., Fischer K., *J. Soil Sci. Plant Nutr*. 171 (**2008)** 917.
[9] Cataldi T. R. I., Campa C., De Benedetto G. E., *Fresenius J. Anal. Chem.* 368 (**2008)** 739.
[10] Femia R. A., Winberger J., *J. Chromatogr.* 402 (**1987**) 127.
[11] Gomis D. B., Alvarez M. D. G., Alonso J. J. M., Vallina A. N., *Chromatographia* 25 (**1988)** 701.
[12] Harvey J., *J. Chromatogr. B* 879 (**2011)** 1196.
[13] Paulus A., Klockow A., *J. Chromatogr. A* 720 (**1996)** 353.
[14] Honda S., *J. Chromatogr. A* 720 (**1996**) 337.
[15] El Rassi Z., *Electrophoresis* 20 (**1999)** 3134.
[16] Linhardt R. J., Pervin A., *J. Chromatogr. A* 720 (**1996)** 323.
[17] Hoffstetter-Kuhn S., Paulus A., Gassmann E., Widmer H. M., *Anal. Chem*. 63 (**1991)** 1541.
[18] Arentoft A.M., Michaelsen S., Sorensen H., *J. Chromatogr. A* 652 (**1993**) 517.
[19] Chiesa C., Horvath C., *J. Chromatogr.* 645 (**1999)** 337.
[20] Klochow A., Widmer H. M., Amado R., Paulus A., *Fresenius J. Anal. Chem.* 350 (**1994)** 415.
[21] Huang G. L., Yang H., Mei X. Y., Liu M. X., Ma Y. T., *Appl. Biochem. Biotech*. 136 (**2007)** 17.
[22] Ma S., Lau W., Keck R. G., Briggs J. B., Jones A. J. S., Moorhouse K., Nashabeh W., *Met. Mol. Biol.* 308 (**2005)** 397.
[23] Bui A., Kocsis B., Kilar F., *J. Biochem. Biophys. Met*. 70 (**2008)** 1313.
[24] O'Shea M., Samuel M. S., Konik C. M., Morell M. K., *Carbohydr. Research* 307 (**1998)** 1.
[25] Oefner P. J., Vorndran A. E., Grill E., Huber C., Bonn G. K., *Chromatographia* 34 (**1992)** 308.
[26] Soga T., Heiger D. N., *Anal. Biochem*. 265 (**1998)** 73.
[27] Soga T., Serwe M., *Food Chem.* 69 (**2000)** 339.
[28] Andersen K. E., Bjergegaard C., Moller P., Sorensen J. C., Sorensen H., *J. Agric. Food Chem.* 51 (**2003)** 6391.
[29] Cortacero-Ramirez S., Segura-Carretero A., Cruces-Blanco C., Hernainz-Bermudez de Castro M., Fernandes-Gutierrez A., *J. Sci. Food Agric*. 85 (**2005)** 517.
[30] Xu X., Kok W. T., Poppe H., *J. Chromatogr. A* 716 (**1995**) 231.
[31] Lu B., Westerlund D., *Electrophoresis* 17 (**1996)** 325.
[32] Klockow A., Paulus A., Figueiredo V., Amado R., Widmer H. M., *J. Chromatogr. A* 680 (**1994)** 187.
[33] Zemann A., Nguyen D. T., Bonn G., *Electrophoresis* 18 (**1997)** 1142.
[34] Jager A. V., Tonin F. G., Tavares M. F. M., *J. Sep. Sci*. 30 (**2007**) 586.
[35] Rovio S., Yli-Kauhaluoma J., Siren H., *Electrophoresis* 28 (**2007)** 3129.
[36] Rovio S., Simolin H., Koljonen K., Siren H., *J. Chromatogr. A* 1185 (**2008)** 139.
[37] Mitchell R. E., Duke F. R., In *Annals of the New-York Acad. of science*, vol. 172, **1970**, p 131.
[38] O'Brien R. D., Farr W. E., Wan P. J., In *Introduction to Fats and Oils Technology*, 2nd ed., AOCS Press, Champaign: Ill, **2000**.
[39] Glushonok G. K., Glushonok T. G., Maslovskaya L. A., Shadyro O. I., *Russ. J. Gen. Chem.* 73 (**2003)** 1027.
[40] Roig B, Thomas O., *Anal. Chim. Acta* 477 (**2003**) 325.
[41] Roig B, Thomas O., *Carbohydr. Research* 238 (**2003)** 79.
[42] Gonzalez M. G., Oliveros E, Wörner M, Braun A. M., *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.* 5 (**2004)** 225.
[43] Chen J. M., Cheng Z. W., Jiang Y. F., Zhang L. L., *Chemosphere* 81 (**2010)** 1053.
[44] Bucknall T., Edwards H. E., Kemsley K. G., Moore J. S., Philipps G. O., *Carbohydr. Research* 62 (**1978)** 49.
[45] Ivanova E. V., Suvorov O. A., Yudin I. V., *High Energ. Chem.* 43 (**2009)** 263.
[46] Heusinger H., *Carbohydr. Research* 154 **(1986)** 37.
[47] Kawakishi S., Namiki M., *Carbohydr. Research* 26 (**1973)** 252.
[48] Kawakishi S., Kito Y., Namiki M., *Carbohydr. Research* 39 (**1975)** 263.

[49] Maxwell C. R., *Radiation research* supplement 4 (**1964)** 175.
[50] Kushelevsky A. P., Slifkin M. A., *Radiation research* 50 (**1972)** 56.
[51] Desiderio C., Lavarone F., Rossetti D. V., Messana I., Castagnola M., *J. Sep. Sci.* 33 (**2010)** 2385.

CHAPITRE II – Article : Optimisation d'une séparation par électrophorèse capillaire de neuf carbohydrates à l'aide d'une approche multivariée

ON THE USE OF RESPONSE SURFACE STRATEGY TO ELUCIDATE THE ELECTROPHORETIC BEHAVIORS OF CARBOHYDRATES AND OPTIMIZE THEIR SEPARATION

Cédric Sarazin[1,2,3,4], Nathalie Delaunay[2,3,4], Christine Costanza[1], Véronique Eudes[1], Pierre Gareil[2,3,4], Jérôme Vial[3,4,5]

Journal of Chromatography A, (2011), soumis

[1]*Central Laboratory of the Prefecture de Police, 39 bis, rue de Dantzig, 75015 Paris, France.*
[2]*Chimie ParisTech, Laboratory of Physicochemistry of Electrolytes, Colloids and Analytical Sciences (PECSA), 75005 Paris, France*
[3]*UPMC Univ Paris 06, 75005 Paris, France*
[4]*CNRS, UMR 7195, 75005 Paris, France*
[5]*ESPCI ParisTech, Laboratory of Physicochemistry of Electrolytes, Colloids and Analytical Sciences (PECSA), 75005 Paris, France*

Abstract

Carbohydrates are widely used in homemade explosive mixtures. Fast, selective, and sensitive analysis of carbohydrates is compulsory for their identification in post-blast samples. This article focuses on the optimization with a design of experiments of a CE method for the simultaneous separation of 4 carbohydrates of interest (fructose, glucose, lactose, and sucrose) and 5 potentially interferent carbohydrates (ribose, xylose, maltose, mannose, and galactose) with a highly alkaline BGE. First the factors which potentially affect the carbohydrate electrophoretic behavior were identified: background electrolyte (BGE) pH, separation temperature (T), and BGE conductivity (κ). A central composite design was then carried out to determine and model the effects of factors T, pH, and κ on normalized migration times and efficiency. From the model, an optimization of the separation was carried out using a desirability analysis based on resolutions between adjacent peaks and analysis time. The optimum conditions obtained were a BGE composed of 98 mM NaOH (pH 12.99) and 120 mM NaCl to adjust the conductivity at 4.29 S m^{-1} and a separation temperature fixed at 26.5 °C. Finally, these conditions were experimentally confirmed and the robustness of the obtained separation was checked.

Keywords: carbohydrate separation, central composite design, design of experiments, desirability analysis

1. Introduction

Chlorate, perchlorate or nitrate salts are widely used in improvised explosive compositions. The addition of commercial carbohydrates (fructose, glucose, lactose, and sucrose) in solutions containing oxidant salts creates an important gaseous release (CO or CO_2) and thus in confined place induces an explosion [1]. Also, the investigation of carbohydrate content in post-blast extracts by an effective and fast analytical method is very important whenever chlorate, perchlorate, or nitrate anions are detected by ion chromatography or capillary electrophoresis methods [1]. Currently, methods used for the separation of carbohydrates include thin-layer chromatography [2], gas chromatography [3,4], and liquid chromatography (LC) [5-7]. Most often, LC methods used normal phase [8], reversed-phase [9] or anion-exchange modes [9,10] with direct low-UV-range or refractive index detections [5] and most often mass spectrometry, UV, or fluorescence detection after precolumn derivatization [11-13]. More recently, important developments were carried out with the coupling between high performance anion-exchange chromatography and pulsed-amperometric detection [5,10].

Nowadays, CE, with its high separation efficiency, low reagent consumption, and speed, appeared as an interesting alternative to chromatographic methods, especially for sulfated and carboxylated carbohydrates [5,13-17]. Nevertheless, the analysis of carbohydrates by CE is not straightforward. Difficulties can be attributed to the lack of easily ionizable functions (other than anomeric hydroxyl group) due to their high pKa values comprised between 11.9 and 12.5 (Table III-II-1) and to the lack of chromophoric groups. In order to avoid time-consuming and expensive derivatization steps for carbohydrate labelling or the indirect UV detection mode with high alkaline electrolytes, which is poor in sensitivity, a simple electrophoretic method inspired by the work by Rovio et al. [18,19] was developed [20]. This method involved a percolation of a hexadimethrine bromide (HDMB) solution at 1 mg mL^{-1} in ultra-pure water before each run to reverse EOF, associated with a 130 mM NaOH-based BGE. The detection was based on the formation of an absorbing intermediate undergoing the low-UV radiations of the Beckman Coulter DAD [20]. This method provided a fast separation of the 4 carbohydrates of interest in less than 10 min. This paper brings a deeper insight into the separation conditions, that were optimized through a multivariate approach, and simultaneously the study was enlarged to a carbohydrate mixture containing ribose, xylose, mannose, maltose, and galactose, in addition to fructose, glucose, lactose and sucrose. The separation of this more complex mixture was of interest to assess method selectivity for the carbohydrate analyses in post-blast residue extracts, in which the added carbohydrates might be potential interfering compounds.

Table III-II-1. Names, pKa values and molar weights of studied carbohydrates.

Carbohydrates	pKa [5]	MW ($g\ mol^{-1}$)
Ribose	12.22	150
Xylose	12.15	150
Fructose	12.03	180
Mannose	12.08	180
Glucose	12.35	180
Galactose	12.35	180
Maltose	11.94	342
Lactose	11.98	342
Sucrose	12.51	342

2. Materials and methods

2.1. Standards and electrolytes

All carbohydrates used as standard samples (fructose, glucose, ribose, xylose, mannose, galactose, maltose, lactose, and sucrose) were purchased from VWR (Fontenay-sous-Bois, France). HDMB used as electroosmotic flow (EOF) reversal agent and naphthalenesulfonic acid used as internal standard were purchased from Sigma-Aldrich (L'Isle-d'Abeau, France). 100 mM individual carbohydrate solutions were prepared weekly by volumetric dissolution in ultra-pure water delivered by a Direct-Q3 UV system (Millipore, Molsheim, France). A standard mixture of the carbohydrates of interest was prepared daily (0.05 mM each in ultra-pure water). BGEs were prepared as followed: (i) preparation of 100 mL of a diluted 1 M NaOH solution (Carlo Erba, Val-de-Reuil, France) (dilution factor varying according to the final targeted BGE composition, see below), (ii) preparation of a 1 M NaCl (Sigma-Aldrich) solution, (iii) preparation of 5 mL of the BGE by mixture of the two previous NaOH and NaCl solutions in proportion allowing to reach the targeted conductivity and pH values. It is

worthy of note that the choice of preparing an intermediate 100 mL-diluted NaOH solution from the original 1 M NaOH solution allows to significantly improve the precision of the final BGE composition. HDMB solution at 1 g L^{-1} was prepared by dissolving the appropriate amount in ultra-pure water.

2.2. Apparatus

Development, optimization, and experimental validation of the CE method were carried out with a Beckman Coulter P/ACE MDQ system (Villepinte, France) equipped with a DAD set at 270 nm (analysis wavelength) and 350 nm (reference wavelength) and with bandwidths set at ± 6 nm and ± 40 nm, respectively. Instrument control and data acquisition were performed using Beckman 32 Karat® software.

2.3. Electrophoretic procedures

Electrophoretic separations were performed using 50 µm id x 60 cm bare fused-silica Polymicro capillaries purchased from Photonlines (Marly-Le-Roi, France). A detection window was created for the UV detection at 10 cm from the anodic end. Before first use, capillaries were conditioned by successive flushing with 1 M NaOH, 0.1 M NaOH, ultra-pure water, HDMB solution, and finally BGE, each under 2.8 bar for 3 min (12 capillary volumes), except for HDMB which were under 1.4 bar for 6 min (12 capillary volumes) in order to obtain a better coating and more reproducible separations. Between each run, HDMB layers were refreshed (1.4 bar for 6 min), and this was followed by the percolation of BGE (2.8 bar for 3 min). Injections were performed hydrodynamically under 50 mbar for 5 s (0.75 % of the capillary volume). Separations were run at 26.5 °C under -14 kV. BGE was changed between each run.

2.4. Conductivities

The conductivity values of the BGEs were determined with the CE apparatus, by measuring current intensity as a function of the applied voltage at 25 °C [21]. Conductivity κ was derived from Ohm's law:

$$\kappa = \frac{4LI}{\pi d_c^2 V} \qquad \text{(Eq. 1)}$$

where L is the capillary length, I the measured current intensity, d_c the inner diameter, and V the voltage applied across the capillary. Calibration was performed with solutions of 0.1 and 0.01 M KCl (κ = 1.2073 and 0.1295 S m^{-1} at 25 °C, respectively).

2.5. Statistical analysis softwares

The statistical data analysis were performed using JMP 9.0 (S.A.S. Institute Inc., Cary, NC, USA) and Excel 2007 (Microsoft Corporation, Courtaboeuf, France).

3. Design of experiments

3.1. Choice of the responses and factors

The aims of this study were to identify the factors affecting the carbohydrate electrophoretic behaviors to next optimize the separation of 9 carbohydrates in a minimum analysis time. The responses identified as relevant for the study of the factors influencing electrophoretic behaviors were normalized migration times, peak efficiencies, resolutions between adjacent peaks and analysis time, evaluated by the migration time of the last peak. It was important to note that no peak inversion was observed when the experimental CE conditions were varied. *A priori* potential influent factors on carbohydrate analysis were:

1- The calculated pH value of the BGE controlled by the sodium hydroxide concentration. In fact, as all carbohydrate pKa values range between 12 and 13 (Table 1), a narrow pH range had to be studied.
2- The temperature (T) during the separation, which impacts the compound solubility, the BGE viscosity [22], the pKa values and the equilibria between the carbohydrate structural isomers.
3- The BGE conductivity (κ), which can be related to the BGE ionic strength, but is simpler to control under the present separation conditions, as it can be experimentally measured, whereas it is not straightforward to calculate ionic strength in such highly concentrated electrolytes. Conductivity can be used as a means to tune carbohydrate mobilities.

3.2. Optimization criteria

The optimisation criteria, set according to the requirements of the Central Laboratory of the Prefecture de Police de Paris exclusively, concerned resolution between peaks and analysis time. Effectively, baseline resolution with adjacent peaks was required for the four carbohydrates of interest (fructose, glucose, lactose, and sucrose) and reasonable analysis time was expected. Numerically, target values of respectively 1.2 for resolution and 25 min for

analysis time were set. As several criteria must be simultaneously optimized, Derringer desirability functions were used.

3.3. Desirability analysis

A global evaluation of the separation quality was performed using a multicriteria strategy based on the concept of desirability [23], using Derringer functions [24]. This approach allows values for different criteria or parameters to be converted onto the same scale, based on optimization criteria, and to be combined to provide a single response to optimize. Briefly, the value of each individual parameter is converted into a dimensionless number or "desirability value" between 0 and 1, where 0 corresponds to a completely unacceptable value and 1 corresponds to a value that totally fulfils the requirements. To get a global evaluation of the quality of the separation, taking into account all the criteria simultaneously, a global desirability can be built simply by multiplying all individual desirabilities.

3.4. Selection of the experimental design

Optimization of separation conditions using a statistical approach involved different major steps: selection of the experimental design, implementation of the experiments, estimation of the coefficients of the mathematical model for each response, determination of the predicted optimum via the desirability approach, and finally the experimental confirmation of the predicted optimum.

The chosen experimental design was a central composite design, that belongs to the family of response surface designs. It allowed a second-degree polynomial modelling of the experimental response as a function of factor variations. The calculation of the model coefficients was accomplished by means of multiple linear regression undertaken according to Eq. 2:

$$\eta\,(X_{1\le i\le 3}) = \sum_{i=1}^{3} \beta_i X_i + \sum_{i=1}^{3} \beta_{ii} X_i^{\,2} + \sum_{i=2}^{3} \sum_{j=1}^{i-1} \beta_{ij} X_i X_j \qquad \text{(Eq. 2)}$$

where $\eta(X_{1\le i\le 3})$ was the predicted response, X_i ($1 \le i \le 3$) the three controlled factors, β_i, β_{ii}, β_{ij} stand for the coefficients of the main factors, the coefficients of the quadratic terms and the coefficients of the first order interactions, respectively. The experimental response $y(X_{1\le i\le 3})$ was defined as $y(X_{1\le i\le 3}) = \eta(X_{1\le i\le 3}) + \varepsilon$, where ε was a centered normal variable with constant variance σ^2 representing measurement random error of the method.

Unlike linear models, this approach is compatible with the presence of an optimum inside the experimental domain and not at an edge. The selected central composite design was based on a fractional factorial design $2^{(n-1)}$ (n = number of factors) with points on the extreme vertices representing the low and high levels of the factors (coded ± 1). To perform these points, the three factors were simultaneously modified. Center points (coded 0), representing initial conditions, and 2n axis points (coded ± a), for which factors were individually modified (the others were maintained at the 0 conditions), were added to enable the use of a response surface modelling. The center point number and the distance between the center and the axis points were determinated thanks to the rotatability criterion, so that for three factors the starpoint distance a equals 1.6. Figure III-II-1 illustrates this kind of design with n = 3.

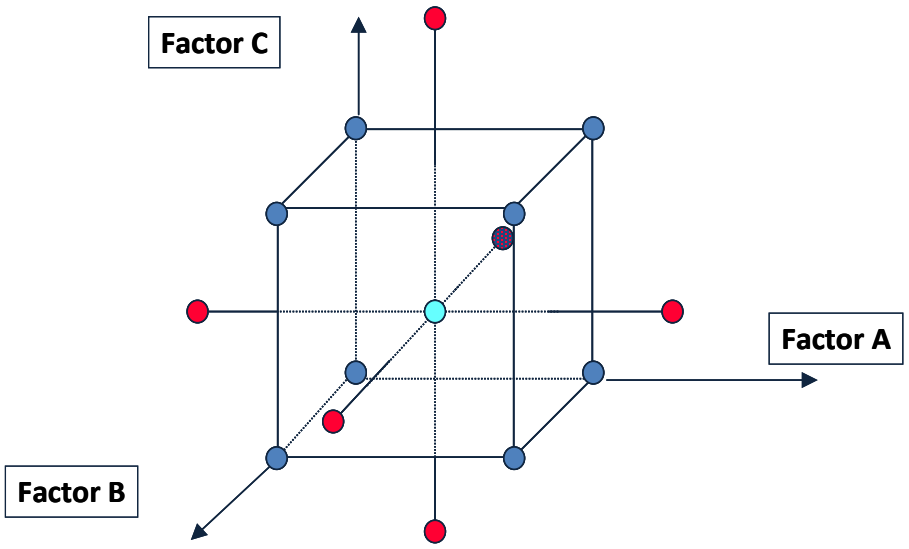


Figure III-II-1. Central composite design with three factors

3.5. Factor levels

The choice of the variations that must be applied to the factors is a difficult task in the case of the separation of carbohydrates with a NaOH-based BGE. In fact, a pH value superior to 12.5 (31 mM NaOH) is recommended to ionize compounds, and maximum pH value was fixed at 13.2 (158 mM NaOH), which corresponded to the best compromise between analysis time and Joule effect. In order to carry out the experiments coded (0, +1.6, 0) and (-1.6, 0, 0), the conductivity value at level 0 was forced by the BGE conductivity at pH 13.2 and the conductivity at -1.6 was forced by the BGE conductivity at pH 12.85 (coded value 0). Finally, temperature was varied in a classical range in CE (20-30 °C) imposed by the apparatus. The levels chosen for the three factors are given in Table III-II-2.

Table III-II-2. Factors and levels for the optimization study, bold values correspond to nominal conditions.

Factors	Coded values at levels				
	-1.6	-1	**0**	+1	+1.6
Temperature T (°C)	20	22	**25**	28	30
Calculated pH value	12.5	12.6	**12.85**	13.1	13.2
(NaOH concentration, mM)	(31.6)	(39.8)	**(70.8)**	(125.9)	(158.5)
Conductivity κ measured at 25 °C (S m^{-1})	3.27	3.53	**3.92**	4.32	4.58
(created current intensity, µA)	(150)	(162)	**(180)**	(198)	(210)

3.6. Experiments table

The matrix of experiments for the three studied factors was composed of 20 experiments: 6 center points, 6 axis points, and 8 vertices points. The experiment order was presented in Table III-II-3. For each run, level factors were presented according to their coded values +1.6, +1, 0, -1, and -1.6. All runs were independent, as for each of them electrolyte and standards were freshly prepared just before use.

Table III-II-3. Experiment table

Experimental order	Factor 1 (T)	Factor 2 (pH)	Factor 3 (κ)
1	0	0	0
2	0	0	0
3	-1	-1	-1
4	-1	-1	1
5	-1	1	-1
6	-1	1	1
7	1	-1	-1
8	1	-1	1
9	1	1	-1
10	1	1	1
11	0	0	0
12	0	0	0
13	-1.6	0	0
14	1.6	0	0
15	0	-1.6	0
16	0	1.6	0
17	0	0	-1.6
18	0	0	1.6
19	0	0	0
20	0	0	0

4. Results and discussions

4.1. Factors influencing the electrophoretic behavior

Before exploiting the responses individually, it was useful to evaluate the correlation between them. No noticable correlation was observed between all the measured responses, so factors influencing the electrophoretic behavior (temperature, pH, and conductivity) had to be evaluated for each response (peak efficiencies and carbohydrate migration times normalized by internal standard (naphthalenesulfonate)) thanks to the model given in Eq.2 to identify influent factors. The model coefficients (linear, quadratic terms and first order interactions) were then estimated and schematically presented for glucose normalized migration time (Fig. III-II-2A) and peak efficiency (Fig. III-II-2B). A factor or an interaction was considered as significantly influent with a first kind risk α = 5 % if the observed value of the t ratio (coefficient normalized by its standard deviation) was outside the ± 2.2 range (bold lines in Figures III-II-2A and B).

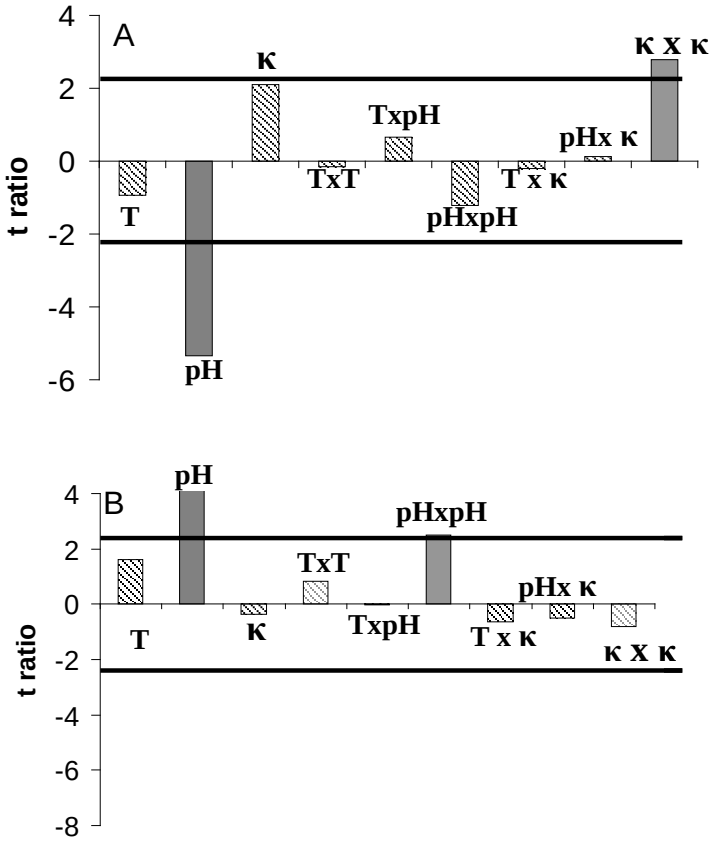


Figure III-II-2. Representation of the effects of factors temperature (T), pH, and conductivity (κ) on glucose normalized migration time (A) and peak efficiency (B) with a first kind risk α = 5 %. Influent factors appeared in grey.

As expected, pH value had an important negative effect on normalized migration time (Fig. III-II-2A). Effectively, experiments were carried out in the carbohydrate pKa range and a small increase in pH induced a marked increase in negative charge, and hence a decrease in migration time. On the other hand, temperature and conductivity had no significant effect. The relevance of the choice of quadratic response modelling was confirmed by the fact that the term $\kappa \times \kappa$ appeared significant. These two significant coefficients were also observed for other carbohydrates, whereas other factors, quadratic terms (except pH × pH for sucrose), and first order interactions were not significant (Table III-II-4). For peak efficiencies, pH was only significant in its linear term and the quadratic terms pH × pH were the most frequently significant quadratic terms (Table III-II-4). First order interactions were never significant.

Table III-II-4. Significant factors and estimated coefficients (for $\alpha = 5\%$) for the normalized migration times (referenced to naphthalenesulfonate peak) and peak efficiencies of the carbohydrates.

Carbohydrates	Normalized migration time		Peak efficiency	
	Significant factors	Coefficient	Significant factors	Coefficient
Ribose	$\kappa \times \kappa$ pH	0.098 -0.173	pH	16631
Xylose	$\kappa \times \kappa$ pH	0.111 -0.184	pH	13967
Fructose	$\kappa \times \kappa$ pH	0.096 -0.177	pH	17469
Mannose	$\kappa \times \kappa$ pH	0.088 -0.177	pH pH × pH	19980 12990
Glucose	$\kappa \times \kappa$ pH	0.115 -0.215	pH pH × pH	24280 12556
Galactose	$\kappa \times \kappa$ pH	0.120 -0.245	pH	20461
Maltose	$\kappa \times \kappa$ pH	0.124 -0.251	pH pH × pH	18332 8788
Lactose	$\kappa \times \kappa$ pH	0.133 -0.229	pH pH × pH	16285 15110
Sucrose	$\kappa \times \kappa$ pH × pH pH	0.131 -0.171 -0.386	pH pH × pH	24226 11346

4.2. Optimization of the separation

As previously described for normalized migration times and peak effiencies, an analysis of variance [10] was performed for the determination of the significance of the effects of the factors, quadratic terms, and interactions on the resolutions between adjacent peaks and analysis time responses. pH value has the prominent effect on all the responses, then come conductivity and temperature, which just affected few resolutions. Quadratic and interaction terms had lower effects on resolutions and analysis time and were often non-significant. As expected, an increase in the conductivity (or ionic strength) led to an increase in the analysis time, and a decrease in pH value created a decrease in the carbohydrate charge and also slowed down the carbohydrate migrations.

The optimization of the separation was then carried out through a desirability analysis. Requirement on resolutions were fixed at 1.2, 1.0, and 0 for desirability values of 1.0, 0.5, and 0, respectively. An analysis time of 50 min received a desirability of 0, whereas 30 min and 20 min received desirabilities of 0.5 and 1.0, respectively (schematic representation of desirability in the last column of Figure III-II-3).

Most of the resolutions exhibited a desirability score of 1, which corresponds to full agreement with the requirements. Only two critical pairs appeared: fructose/mannose and galactose/maltose. As a consequence, the optimization of the separation only needed to take into account maximizing of the global desirability, the desirability of the critical pairs plus that related to the analysis time. It was carried out by using the prediction profiler of JMP 9.0 software which is able to numerically maximize the global desirability, as presented in Figure III-II-3. The maximization of the global desirability led to the following predicted optimized conditions: temperature at +0.49, pH at +0.54, and conductivity at +0.93 in coded values, which corresponded to a temperature of 26.5 °C, a calculated pH of 12.99 and a conductivity of 4.29 S m^{-1}. Accordingly, the optimum BGE was composed of 98 mM NaOH and 120 mM NaCl to adjust the conductivity at the targeted value. The surface response representing the resolution between galactose and maltose as a function of pH and T with conductivity value fixed at the optimum (+0.93) is presented in Figure III-II-4. The domain located above the grid corresponded to the domain where Rs(galactose/maltose) complied with the requirement of $Rs \geq 1.2$. The 2D representation on the basis of the plot was the plot projection in contour diagrams.

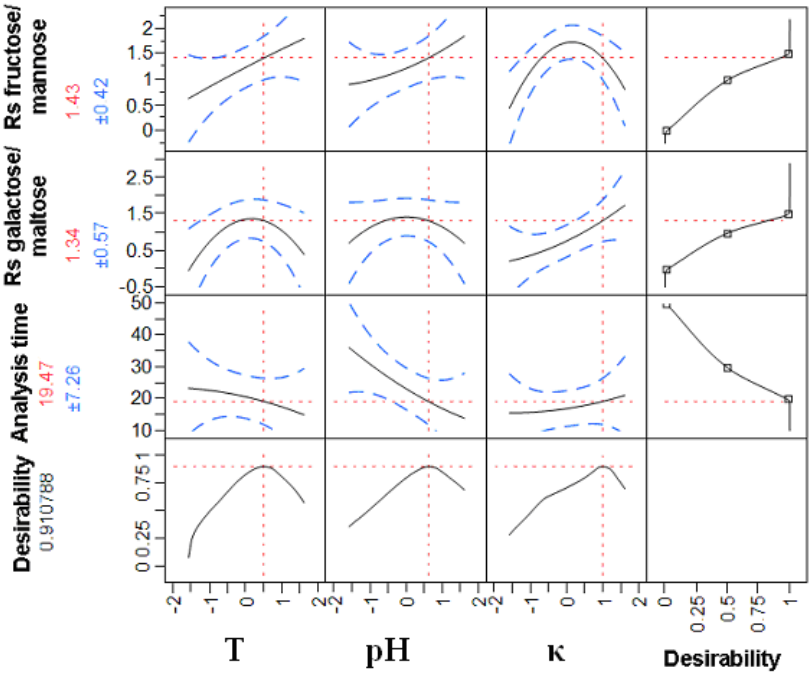


Figure III-II-3. Prediction profiler of JMP software. The first three rows correspond to the responses of interest. The first three columns correspond to the three considered factors (T, pH, and κ) at optimum conditions. The last column indicates the individual desirability values for each response. The last row gives the global desirability as a function of the three factors. Values indicated just under the name of the response and under the desirability are predicted values and values after ± give the corresponding 95% confidence interval.

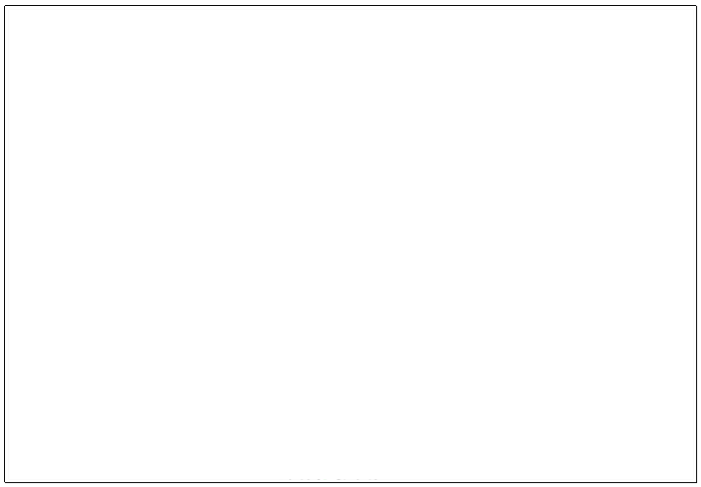


Figure III-II-4. Surface response of the Rs(galactose/maltose) as a function of pH and T with +0.93 affected to conductivity value.

The contour diagrams (Figure III-II-5), obtained from the superimposition of the 3 responses of interest versus the three factors (pH, T, and κ) exhibited the domain (white zone) where the model gave a separation fulfilling the requirements imposed by the laboratory (i.e. minimum resolution of 1.2 and analysis time under 25 min). The optimal design point is depicted by the black square (■).

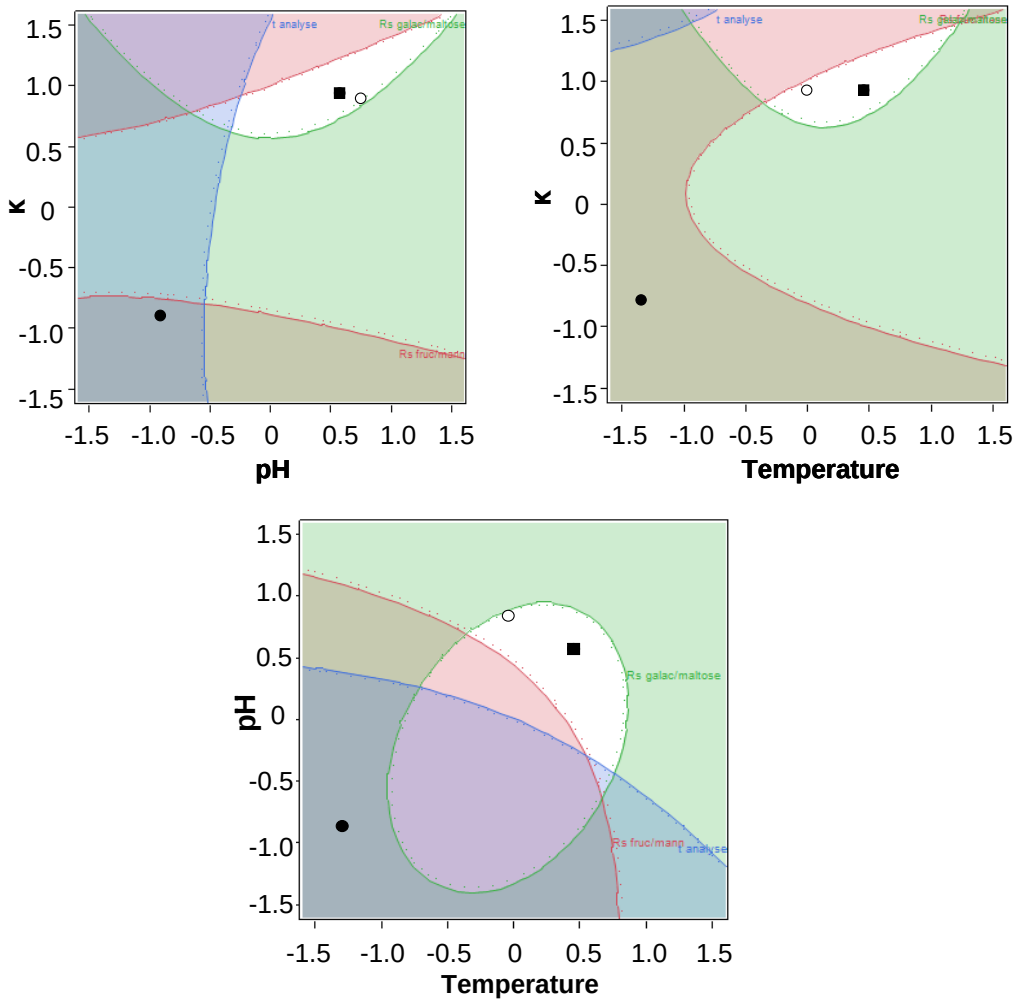


Figure III-II-5. Contour diagrams for Rs(maltose/galactose), Rs(fructose/mannose), and analysis time responses, according to the 3 factors. The white zone represents the optimum domain.(■) optimum conditions, (●) and (o) exemples of non-optimum conditions. The range values for the coded values between -1.6 and +1.6 corresponding to a range of 10 °C for temperature, 127 mM for NaOH concentration, and 1.3 S m^{-1} for conductivity.

4.3. Experimental validation

The optimized conditions (black squares in Figure III-II-5) were then experimentally checked to validate the proposed approach. Thus, an electrophoretic separation of the 9 carbohydrates of interest was carried out with a BGE composed of 98 mM NaOH (calculated pH 12.99) and 120 mM NaCl, and a temperature of 26.5°C. The EOF was reversed by a percolation of a HDMB solution at 1 g L^{-1} in ultra-pure water. The obtained electropherogram is presented in Figure III-II-6.

The obtained separation showed that compounds were detected in the increased pKa and molecular weight orders. Moreover, all peaks were baseline resolved, except for maltose and galactose which were the most difficult carbohydrates to separate.

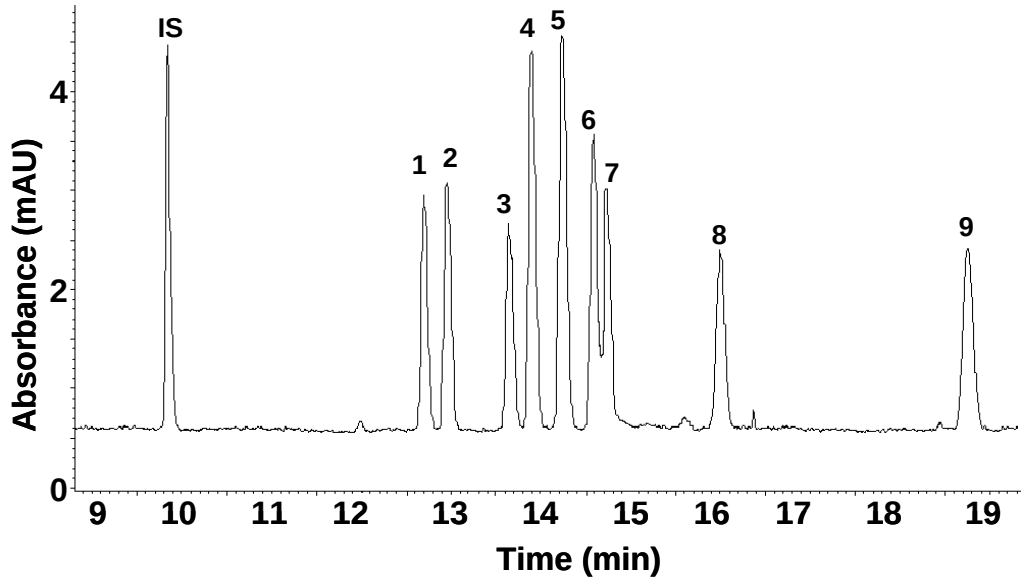


Figure III-II-6. Electropherogram of the 9 carbohydrates of interest obtained under the optimized conditions. Bare fused-silica capillary, 50 µm id × 60 cm (UV detection at 50 cm) modified with HDMB (1 g L^{-1} in ultra-pure water). BGE: 98 mM NaOH (pH 12.99), 120 mM NaCl. Temperature, 26.5 °C. Applied voltage, -14 kV. Hydrodynamic injection, 5 s, 50 mbar. Direct UV detection at 270 nm. Analyte concentration, 0.05 mM each in ultra-pure water. Identification, ribose (1), xylose (2), fructose (3), mannose (4), glucose (5), galactose (6), maltose (7), lactose (8), sucrose (9), naphthalenesulfonate (IS).

The resolution between the first critical pair (3 and 4) was experimentally determined at 1.34, which is close to the predicted value proposed by the model (1.43 with a standard deviation on predicted value of 0.19). The optimization appeared slightly less effective for the second critical pair (6 and 7), for which the predicted Rs value was 1.34 whereas the experimental value was 0.98. However, it is still in agreement with the model because for this response, the standard deviation on predicted value was 0.25. Nevertheless, in the case of post-blast residue analyses, only 4 carbohydrates were really of interest (fructose, glucose, lactose, and sucrose), so the partial resolution between maltose and galactose was not a true limitation. As targeted, analysis time did not exceed 20 min, the electrophoretic separation completed requirements and the used optimization strategy was thus satisfactory and validated.

The robustness of this separation was tested with two separations carried out with electrophoretic conditions taking place (i) inside the white domain presented in Figure III-II-5 but not at the optimum point (o) and (ii) totally outside the white domain (●) (Figure III -II-7). Classically, the experimental error carried out for BGE preparation was evaluted at 5 %. In this case, the domain representing ± 5 % of the optimum conditions was determined in coded values between [+0.48, +0.63] for pH and [+0.90, +0.95] for conductivity which is fully included in the white areas. Experimentally, T is fully controlled by the CE cooling regulation system. The robust domain limits correspond to a T variation of about ± 1.5 °C. Thus we selected a point (o) still belonging to the white robust domain, but with a T analysis far from the optimized T of 26.5 °C. The BGE, in that case, was composed of 105 mM NaOH

(calculated pH 13.02, coded value +0.68) and 95 mM NaCl (κ = 4.30, coded value 0.97), and the temperature was fixed at 25 °C (coded value 0). A point outside the white domain was also tested with a BGE composed of 42 mM NaOH (calculated pH 12.62, coded value -0.92) and 71 mM NaCl (κ = 3.82, coded value -0.75), and a temperature fixed at 21 °C (coded value -1.3).

With the electrophoretic conditions inside the robust domain (o), all compounds were detected baseline resolved, except for the two critical pairs, which were only partially resolved and the analysis time exceeded only slightly 20 min. A much longer separation was obtained when the electrophoretic conditions were outside the white domain (●), (with an analysis time superior to 30 min. Moreover, critical pairs were totally unresolved and peak intensities were lower. Finally, the electrophoretic conditions given by the model seemed to be the best for the separation of the 9 carbohydrates of interest. Moving outside the robust domain had a detrimental effect on peak resolutions.

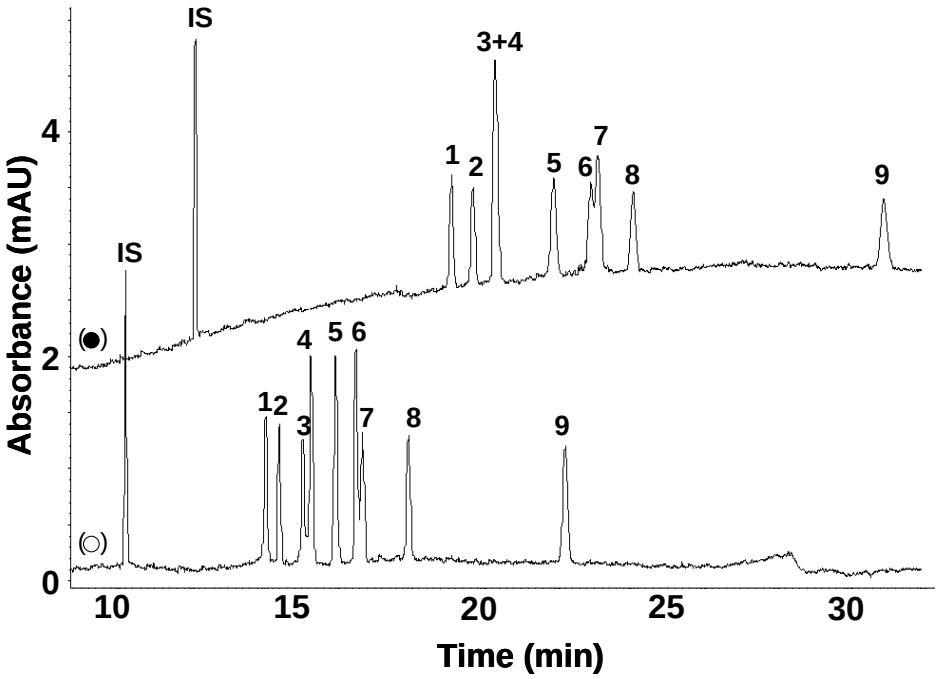


Figure III-II-7. Electropherogram of the 9 carbohydrates of interest obtained under conditions in the white zone but not at the optimum point (o) and outside the white domain (●). BGE: (o) 105 mM NaOH (pH 13.02), 95 mM NaCl; (●) 42 mM NaOH (pH 12.62), 71 mM NaCl. T: (o) 25 °C, (●) 21°C. Other conditions and identification, see Figure III-II-6.

5. Conclusions

The selected experimental design appeared to be properly adapted for the study of the parameters influencing the electrophoretic separation of the carbohydrates of interest and their

optimization. The most critical step was to define the type of experimental design, the relevant responses and influent factors. pH, temperature and BGE conductivity appeared as influent factors playing a role in the electrophoretic separation. A desirability analysis on these three factors led us to obtain a satisfactory separation of the 9 carbohydrates of interest in less than 20 min, which is one of the most fastest separation ever described. The critical pairs fructose/mannose and galactose/maltose were thus separated and the whole method complied with laboratory requirements. The method robustness was finally checked with two separations carried out in non-optimized conditions, and poor resolutions were obtained with critical pairs. Nowadays, quantitative method validation and real sample extracts analyses are being carried out and will be published in a next article.

6. References

[1] Zukas J. A., In *The Chemistry of explosives*; Springer: New York, **1998**, pp 137-172.
[2] Marsit C .J., Fried B., Sherma J., *J. Liq. Chrom. Rel. Tech*. 23 (**2000**) 2413.
[3] Medeiros P. M., Fernandes M. F., Dick R. P., Simoneit B. R. T., *Chemosphere* 65 (**2006**) 832.
[4] Ruiz-Matute A. I., Hernandez-Hernandez O., Rodriguez-Sanchez S., Sanz M. L., Martinez-Castro I., *J. Chromatogr. B*, 879 (**2011**) 1226.
[5] El Rassi Z., In *J. Chromatogr. Library, vol. 66.;* Elsevier: Amsterdam, **1995**.
[6] Z. El Rassi, J. Chromatogr. A 720 (1996) 93.
[7] Siemiatkoski J., Lyubarskaya Y., *Dev. Biologicals* 122 (**2005**) 69.
[8] Karlsson G., Winge S., Sandberg H., *J. Chromatogr. A* 1092 (**2005**) 246.
[9] Meyer A., Fischer H., Kuzyakov Y., Fischer K., *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 171 (**2008**) 917.
[10] Cataldi T. R. I., Campa C., De Benedetto G. E., *Fresenius J. Anal. Chem*. 368 (**2008**) 739.
[11] Femia R. A., Windberg J., *J. Chromatogr.* 402 (**1987**) 127.
[12] Gomis D. B., Alvarez M. D. G., Alonso J. J. M., Vallina A. N., *Chromatographia* 25 (**1988**) 701.
[13] Harvey J., *J. Chromatogr. B* 879 (**2011**) 1196.
[14] Paulus A., Klockow A., *J. Chromatogr. A* 720 (**1996**) 353.
[15] Honda S., *J. Chromatogr. A* 720 (**1996**) 337.
[16] El Rassi Z., *Electrophoresis* 20 (**1999**) 3134.
[17] Linhardt R. J., Pervin A., *J. Chromatogr. A* 720 (**1996**) 323.
[18] Rovio S., Yli-Kauhaluoma J., Siren H., *Electrophoresis* 28 (**2007**) 3129.
[19] Rovio S., Simolin H., Koljonen K., Siren H., *J. Chromatogr. A* 1185 (**2008**) 139.
[20] Sarazin C., Delaunay N., Costanza C., Eudes V., Mallet J. M., Gareil P., *Anal. Chem*., submitted
[21] François Y., Zhang K., Varenne A., Gareil P., *Anal. Chim. Acta* 562 (**2006**) 164.
[22] Heiger D. N., *High Performance Capillary Electrophoresis* – An introduction, Hewlett Packard Company, Waldbronn (Germany), **1992**.
[23] Massart D. L., Vandeginste B. G. M, Buydens L. M. C, De Jong S., Lewi P. J., Smeyers-Verbeke J., in *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*, Part A, Amsterdam, Elsevier, **1997**, pp 788-790.
[24] Derringer G., Suich R., *J. Qual. Technol.* 12 (**1980**) 214.
[25] Massart D. L., Vandeginste B. G. M, Buydens L. M. C, De Jong S., Lewi P. J., Smeyers-Verbeke J., Analysis of Variance, in *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*, Part A, Amsterdam, Elsevier, **1997**, pp121-150.

CHAPITRE III - Analyse quantitative des carbohydrates (fructose, glucose, lactose et saccharose) dans des extraits issus de résidus post-explosions par électrophorèse capillaire

1. Introduction

Au Laboratoire Central de la Préfecture de Police de Paris, seule la Chromatographie sur Couche Mince (CCM) est actuellement utilisée pour la détermination du fructose, du glucose, du lactose et du saccharose, mais la faible résolution obtenue entre les composés et la difficulté à quantifier précisément les espèces rendent cette technique peu précise et peu fiable. C'est pourquoi il y a un grand besoin de mettre en œuvre la méthode électrophorétique précédemment optimisée à l'aide d'un plan d'expériences pour l'analyse qualitative mais surtout quantitative de carbohydrates dans des extraits issus de résidus d'explosions avec une limite de détection, si possible, comprise entre 0,03 et 0,05 mM. Dans ce but, la validation quantitative de la méthode a été réalisée. Cette validation a été menée uniquement sur les quatre carbohydrates d'intérêt. La fidélité et la justesse de la méthode doivent être inférieures à 5 % et 20 %, respectivement, selon les critères usuels utilisés au laboratoire.

2. Éléments de validation de la méthode développée

2.1. Sélectivité

La méthode d'analyse des carbohydrates a été développée à l'aide d'un mélange contenant neuf composés plus un étalon interne (le naphthalène sulfonate, NSA). Les neuf carbohydrates composant ce mélange figurent parmi les plus répandus naturellement dans les matrices susceptibles d'être rencontrées au laboratoire. L'électrophérogramme de référence présenté en Figure III-II-6 de ce manuscrit ne montre aucune co-migration entre les quatre carbohydrates d'intérêts et les cinq carbohydrates potentiellement interférents. Les polyols, autres composés potentiellement interférents, tels que le mannitol ou le sorbitol, de part leurs pKa très élevés (pKa > 13,0) ont une migration encore plus lente et ne perturbent pas la détection des analytes d'intérêt. La sélectivité de la méthode est donc avérée.

2.2. Fidélité

La fidélité de la méthode a été évaluée avec un mélange des quatre composés d'intérêts à une concentration de 0,05 mM chacun et de l'étalon interne à 0,34 mM en réalisant cinq analyses

répétées sur trois jours différents. Les électrolytes et les solutions standard étaient préparées quotidiennement. Les réponses mesurées étaient les temps de migration normalisés (t_{Mi} / t_{NSA}) et les aires corrigées normalisées (A_i / t_{Mi})/(A_{NSA} / t_{NSA}). Comme étudié précédemment dans ce manuscrit dans les Chapitres I, II et III de la partie II, la répétabilité de la méthode a été caractérisée par l'écart-type relatif intra-jour et la fidélité intermédiaire par l'écart-type relatif sur la fidélité intermédiaire. Les résultats obtenus sont regroupés dans le Tableau III-III-I. Les écart-types relatifs sur les fidélités intermédiaires n'excèdent pas 2 % pour les temps de migration normalisés alors qu'ils se situent autour de 4,5 % pour les temps de migration non-normalisés. La normalisation à l'aide de l'étalon interne permet d'être plus précis dans l'identification des composés. La même conclusion peut être faite avec les aires corrigées. En effet, l'écart-type relatif (RSD) sur les aires corrigées se situe en moyenne autour de 6 % pour les 4 composés. Celui-ci est ramené à environ 2,5 % lorsque l'on normalise par l'aire corrigée du naphthalène sulfonate. Les RSD n'excédant pas 5 %, les performances de la méthode développée remplissent le cahier des charges.

2.3. Limites de détection

Les limites de détection de chacun des composés ont ensuite pu être calculées. Pour un rapport signal sur bruit égal à trois, les LOD déterminées varient entre 5 µM pour le lactose et le saccharose, 7 µM pour le glucose et 10 µM pour le fructose. Les LOD sont elles aussi conformes aux attentes du laboratoire.

2.4. Linéarité

La gamme de linéarité de la méthode a pour valeur minimale la limite de quantification qui est elle-même déterminée comme étant égale à trois fois la LOD. La limite haute de la gamme de la linéarité a, quant à elle, été fixée comme étant égale à la concentration pour laquelle les efficacités de pic commençaient à diminuer. Ainsi, pour le glucose et le fructose, la gamme de linéarité variait entre 30 et 850 µM, et pour le saccharose et le lactose entre 15 et 450 µM. La linéarité de la méthode a été évaluée en traçant l'aire corrigée normalisée des pics en fonction de la concentration injectée. Les régressions linéaires ont été réalisées et les coefficients de détermination R^2 ont été calculées et sont regroupés dans le Tableau III-III-I. Des R^2 égaux à 0,998 ont été obtenus pour les quatre carbohydrates, démontrant ainsi la linéarité de la méthode sur la gamme choisie.

Tableau III-III-I: Ecart-types relatifs (RSD) intra-jour (n = 5), inter-jour (n = 3), fidélité intermédiaire (Carbohydrates à 50 µM), LOD et compte-rendu d'étalonnage sur la gamme 30-850 µM pour le fructose et le glucose et sur la gamme 15-450 µM pour le saccharose et le lactose.

Carbohydrates	Aires corrigées normalisées			Temps de migration normalisés			LOD (µM)	Étalonnage	
	intra-jour RSD (%)	Inter-jour RSD (%)	Fidélité intermédiaire RSD (%)	intra-jour RSD (%)	Inter-jour RSD (%)	Fidélité intermédiaire RSD (%)		équation	R^2
Fructose	1,6	1,9	2,1	1,1	1,8	1,7	10	2,863x – 0,058	0,998
Glucose	1,8	2,2	2,3	1,0	1,8	1,8	7	4,786x– 0,178	0,998
Lactose	2,0	2,2	2,3	1,1	1,7	1,8	5	5.581x – 0,054	0,998
Saccharose	2,0	2,3	2,4	1,2	1,9	1,9	5	4,636x– 0,043	0,998

2.5. Limites de quantification

Comme décrit précédemment, les limites de quantification ont été prédéterminées à 30 µM pour le fructose et le glucose et 15 µM pour le lactose et le saccharose en multipliant par trois les valeurs des LOD. Ces LOQ ont été vérifiées à l'aide de cinq solutions contenant les carbohydrates à la concentration de leurs LOQ. Ces cinq solutions ont été injectées deux fois chacune et le biais maximum obtenu n'excèdait pas 10 %, ce qui est en-dessous de la valeur maximale autorisée par le laboratoire. Les LOQ prédéterminées peuvent donc être utilisées comme valeur minimale de la gamme de linéarité.

2.6. Effets de matrices

Les effets de matrice ont été évalués comme décrit dans les chapitres I, II et III de la partie II, en comparant les droites d'étalonnage obtenues dans l'eau et celles obtenues dans un extrait aqueux d'échantillon réel. Au laboratoire, 90 % des échantillons concernant l'analyse des sucres proviennent soit des mélanges purs n'ayant pas encore explosés, soit de frottis réalisés à l'aide de coton. Dans le premier cas, la concentration en sucre est tellement élevée que la dilution nécessaire pour obtenir des concentrations dans la gamme de linéarité permet de rendre négligeable tout effet de matrice. Seul, l'effet de matrice potentiel créé par une matrice coton a été étudié dans ce chapitre. Ainsi un extrait aqueux de coton (pour la teneur en anions et cations inorganiques voir Partie II, Chapitre I et II) a été dopé à l'aide d'une solution des quatre carbohydrates d'intérêts à cinq concentrations différentes. Cette opération a été répétée trois fois de manière indépendante puis les droites d'étalonnage ont été comparées à celles obtenues dans l'eau ultra-pure.
Il s'avère que pour les quatre carbohydrates, aucun effet de matrice n'a été noté, l'homogénéité des variances, l'égalité des pentes et des ordonnées à l'origine étant vérifiées. Ainsi, les droites d'étalonnage obtenues dans l'eau ultra-pure peuvent être utilisées pour quantifier les carbohydrates dans des extraits issus de frottis par coton. De plus, dans nos conditions de détection (détection en UV direct à 270 nm), seuls les acides organiques sont susceptibles de jouer le rôle d'interférents et l'absence d'acides organiques dans le coton a aussi été vérifiée.

La méthode électrophorétique développée pour l'analyse des carbohydrates dans des résidus post-explosions a donc été validée. Ses performances répondent aux prérequis du laboratoire.

3. Analyse quantitative de carbohydrates par EC dans des résidus post-explosion – Comparaison avec la Chromatographie sur Couche Mince

Après l'explosion d'un mélange ayant blessé gravement la personne en train de le fabriquer, le Laboratoire Central de la Préfecture de Police a eu pour mission d'analyser différents prélèvements réalisés sur les vêtements de cette personne ainsi que dans la pièce où l'explosion s'était produite. Après les analyses inorganiques réalisées en chromatographie d'échange d'ions et en électrophorèse capillaire, il est apparu possible, notamment avec la présence de carbonate, nitrate et potassium, que des carbohydrates aient été utilisés dans le mélange. Trois extraits aqueux représentatifs ont donc été analysés en CCM et en CE. Le scellé n°1 correspond à un frottis sur coton de la casserole dans laquelle le mélange était réalisé, le scellé n°3 est un frottis du plan de travail et le scellé n°7 correspond à un frottis sur les vêtements de la victime. La plaque CCM obtenue pour ces extraits non-dilués issus des trois scellés ainsi que pour les solutions étalons de fructose, glucose et saccharose est présentée Figure III-III-1.

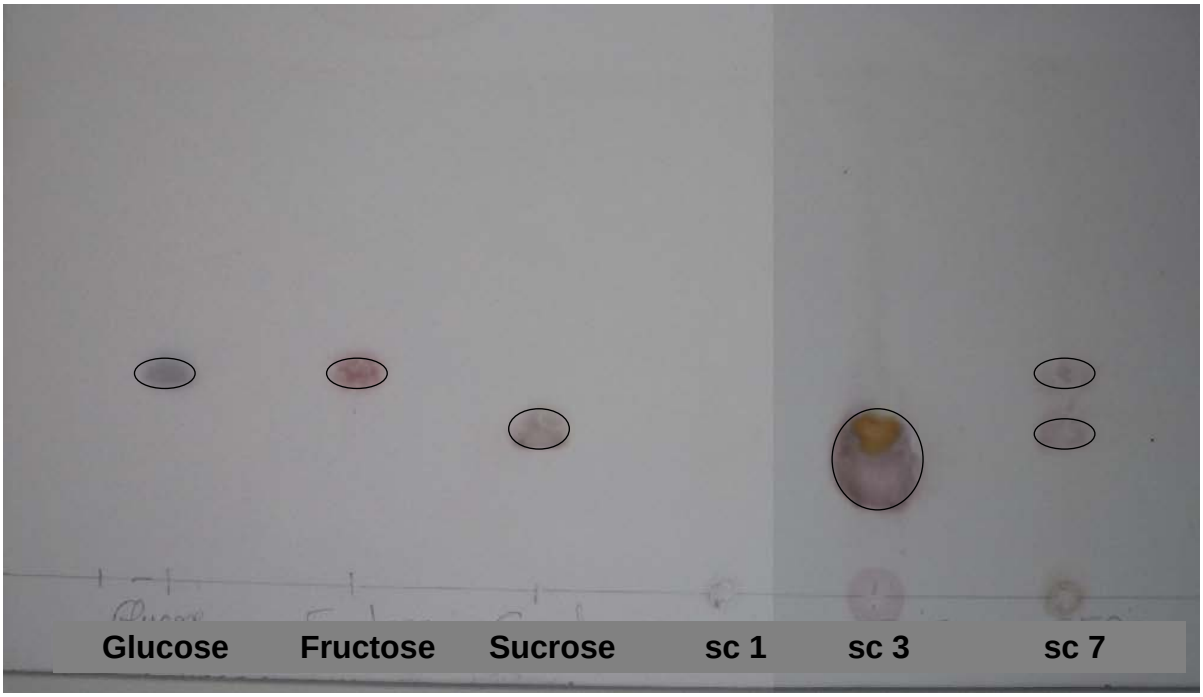


Figure III-III-1. Analyses par CCM des solutions étalons de fructose, glucose et saccharose ainsi que des scellés 1, 3 et 7. Phase stationnaire : silice. Phase mobile : acétate d'éthyle/acide acétique/eau (90/45/30). Révélation à l'aide d'un mélange diphénylamine/aniline. Concentration des solutions standard : 1g L^{-1} chacune. Volume déposé, 4 µL.

D'après la plaque CCM, le scellé n°1 ne paraît pas contenir de carbohydrates alors que le scellé n°3 semble contenir du saccharose en grande quantité et le scellé n°7 du saccharose

mais aussi un second carbohydrate qui peut être du glucose, du fructose ou un mélange des deux.

Ces extraits ont aussi été analysés par CE avec la méthode développée. Les électrophérogrammes obtenus pour les extraits des scellés n°1 (non-dilué), n°3 (dilué 1/100è) et n°7 (dilué 1/10è) sont présentés Figure III-III-2.

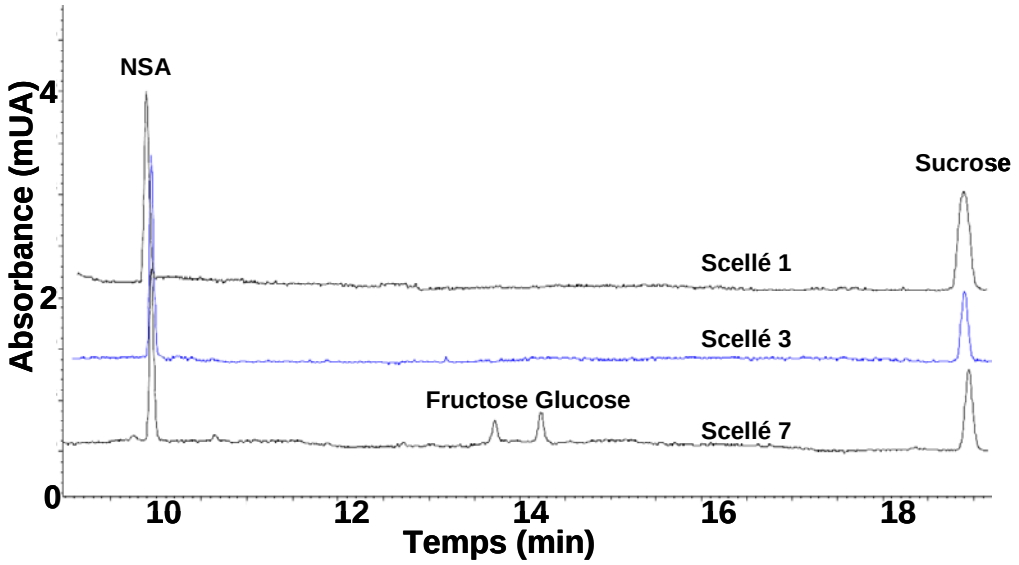


Figure III-III-2. Analyses par électrophorèse capillaire de 3 extraits issus de résidus d'explosion. Capillaire en silice vierge, 50 µm D. I. × 60 cm (détection UV à 50 cm) modifié par du polybrène 1 g / L d'eau. Électrolyte : NaOH 98 mM, NaCl 120 mM (pH calculé, 12,99). Température, 26,5 °C. Tension appliquée, -14 kV. Injection hydrodynamique, 5 s, 50 mbars. Détection UV directe à 270 nm. Quantification de l'échantillon injecté : scellé 1 (non dilué), saccharose 0,22 mM ; scellé 3, (dilution 1/100) saccharose 0,11 mM ; scellé 7 (dilution 1/10), fructose 0,07 mM, glucose 0,09 mM et saccharose 0,12 mM.

Avec l'exploitation des électrophérogrammes, l'apport de l'électrophorèse capillaire vis-à-vis de la CCM paraît indéniable. Le scellé n°1 qui ne comportait aucun carbohydrate en CCM contient en fait 0,22 mM de saccharose. Comme les LOD n'ont jamais été estimées en CCM au laboratoire, il est impossible de dire si le saccharose se trouvait en dessous de la LOD ou bien si le dépôt était imparfait. De même, le scellé n°7, dont la composition exacte était inconnue contient en fait du glucose, du fructose et du saccharose. L'électrophorèse capillaire apporte une précision nettement plus importante sur la nature et la teneur des carbohydrates dans les extraits analysés après explosion.

4. Étude par EC de la composition en carbohydrates d'un fumigène

Le lactose, glucide présent majoritairement dans le lait, entre aussi dans la conception de matériel pyrotechnique comme les fumigènes. Mélangé avec du chlorate de potassium et du chlorure d'ammonium, il permet la création d'une épaisse fumée blanche utilisée notamment pour tester les ventilations. La Figure III-III-3 présente l'analyse d'une poudre de fumigène à

base de lactose, après extraction sous ultrasons dans de l'eau ultra-pure chaude et une dilution au 1/20è. L'analyse de l'extrait confirme bien la présence de lactose à hauteur de 2,34 mM. Son utilisation dans la fabrication du fumigène est bien prouvée

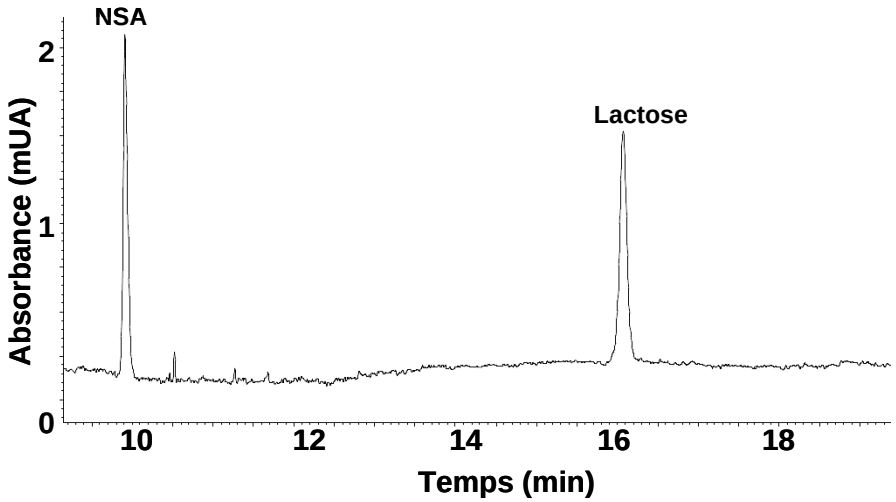


Figure III-III-3. Analyse d'un extrait de fumigène (dilution 1/20e). La quantification du lactose donne une concentration de 117 µM dans l'extrait dilué. Conditions opératoires, voir Fig. III-III-2.

5. Conclusion

La méthode électrophorétique développée pour l'analyse des carbohydrates directement en solution ou dans des extraits issus de frottis réalisés après explosion a été validée avec succès et aucun effet de matrice n'a été mis en évidence. Grâce à l'ajout d'un étalon interne, la répétabilité des temps de migration et des aires a été améliorée. Des limites de détection entre 5 et 10 µM ont été relevées selon les carbohydrates. Cette méthode a été utilisée sur des échantillons réels et a été comparée avec une méthode d'analyse des sucres par CCM. L'électrophorèse capillaire apporte alors une précision indéniable pour l'identification et la quantification des carbohydrates.

CONCLUSION

L'analyse des sucres présentée dans cette partie a tout d'abord permis de mettre en évidence qu'une réaction de photooxydation des carbohydrates et des polyols avait lieu sous des conditions hautement alcalines dans la fenêtre de détection du détecteur à barettes de diodes de l'appareillage Beckman Coulter. Ce phénomène n'a pas été remarqué lorsque l'on réalise la détection avec un filtre UV à longueur d'onde fixe ou avec une plus faible sensibilité sur un appareillage Agilent Technologies. Un important travail pour déterminer la nature de l'espèce intermédiaire absorbante a été mené et, en accord avec la littérature, l'hypothèse de la formation du malonaldéhyde ou d'un composé de la même famille a été retenue. Le temps de séjour et le pH de l'électrolyte apparaissent alors comme des paramètres clés influençant l'intensité du signal. La détection d'acides aminés non-dérivés, sous ces mêmes conditions de séparation, a également été démontrée et ouvre une nouvelle voie pour leur analyse en électrophorèse capillaire.

Puis, afin d'obtenir une séparation de carbohydrates plus rapide, une étape d'inversion d'écoulement électroosmotique a été intégrée au protocole expérimental. Cette étape a nécessité la réoptimisation de la méthode développée par Rovio et al. à l'aide d'un plan d'expériences. Il est apparu que les facteurs les plus influents sur la séparation ont été le pH et la conductivité de l'électrolyte, ainsi que la température de séparation. Une analyse de désirabilité sur ces trois facteurs a permis d'avoir une séparation satisfaisante de neuf carbohydrates d'intérêt en moins de 20 min. La validation quantitative de cette méthode a ensuite été réalisée pour le fructose, le glucose, le lactose et le saccharose et des limites de détection comprises entre 5 et 10 µM ont été obtenues. Cette méthode a été finalement utilisée avec succès pour l'analyse d'échantillons réels et comparée avec une méthode CCM. La CE permet alors de fournir des résultats qualitatifs et quantitatifs plus fiables.

PARTIE IV – UTILISATION DES METHODES ELECTROPHORETIQUES DEVELOPPEES POUR LA DETERMINATION DE LA CHARGE EXPLOSIVE UTILISEE LORS D'UN ATTENTAT SUICIDE SIMULE DANS UN BUS

1. Introduction

Les attentats perpétrés par des kamikazes dans des transports en commun (bus, train…) ou dans des lieux publics font partie des principales menaces terroristes pouvant affecter les pays occidentaux. Afin de se préparer à ce type d'attentat, le Laboratoire Central de la Préfecture de Police a organisé à la fin de l'année 2010, un exercice de simulation d'une attaque suicide dans un bus. Réalisé sur un terrain militaire, cet exercice avait pour objectifs d'aider les &agents de terrain à mieux visualiser une scène d'attentat afin de réaliser le plus efficacement possible les premières constatations et les prélèvements destinés à l'analyse en laboratoire. Ces prélèvements ont ensuite été analysés au LCPP afin de remonter à la composition de la charge explosive utilisée, dans l'idée de pouvoir à terme concourir à retrouver les commanditaires d'un acte réel.
Cette partie propose donc de faire la synthèse des méthodes électrophorétiques présentées précédemment pour leur utilisation pour l'analyse des extraits issus des résidus collectés après cet attentat suicide simulé.

2. L'attentat suicide

Afin de se rapprocher au maximum de la situation rencontrée lors d'une attaque suicide en centre ville d'une grande métropole, une scène de vie a été reconstituée autour du bus cible de l'attaque. Ainsi, comme le montre les photographies sur les Figures IV-1A et IV-1B, des mannequins et des étals de marché ont été installés à proximité du bus.



Figure IV-1. Photographies de la mise en scène autour du bus avant l'explosion de l'attentat suicide simulé.

A l'intérieur du bus, des porcs de boucherie tiennent le rôle des passagers du bus pour deux d'entre eux et du kamikaze pour le troisième (Figure IV-2).



Figure IV-2. Photographie de l'intérieur du bus avant l'explosion de l'attentat suicide simulé

La charge explosive, fabriquée à base de nitrate d'ammonium et de sucre glace, a ensuite été actionnée à distance et l'explosion a eu lieu. La Figure IV-3A est une photographie représentant le bus au moment de l'explosion et les Figures IV-3B et IV-3C représentent les dégâts causés respectivement à l'extérieur et à l'intérieur du bus. Les dégâts importants causés par cette explosion rendent bien compte de la complexité des analyses à réaliser, due principalement au nombre important de matrices différentes que l'on peut collecter.

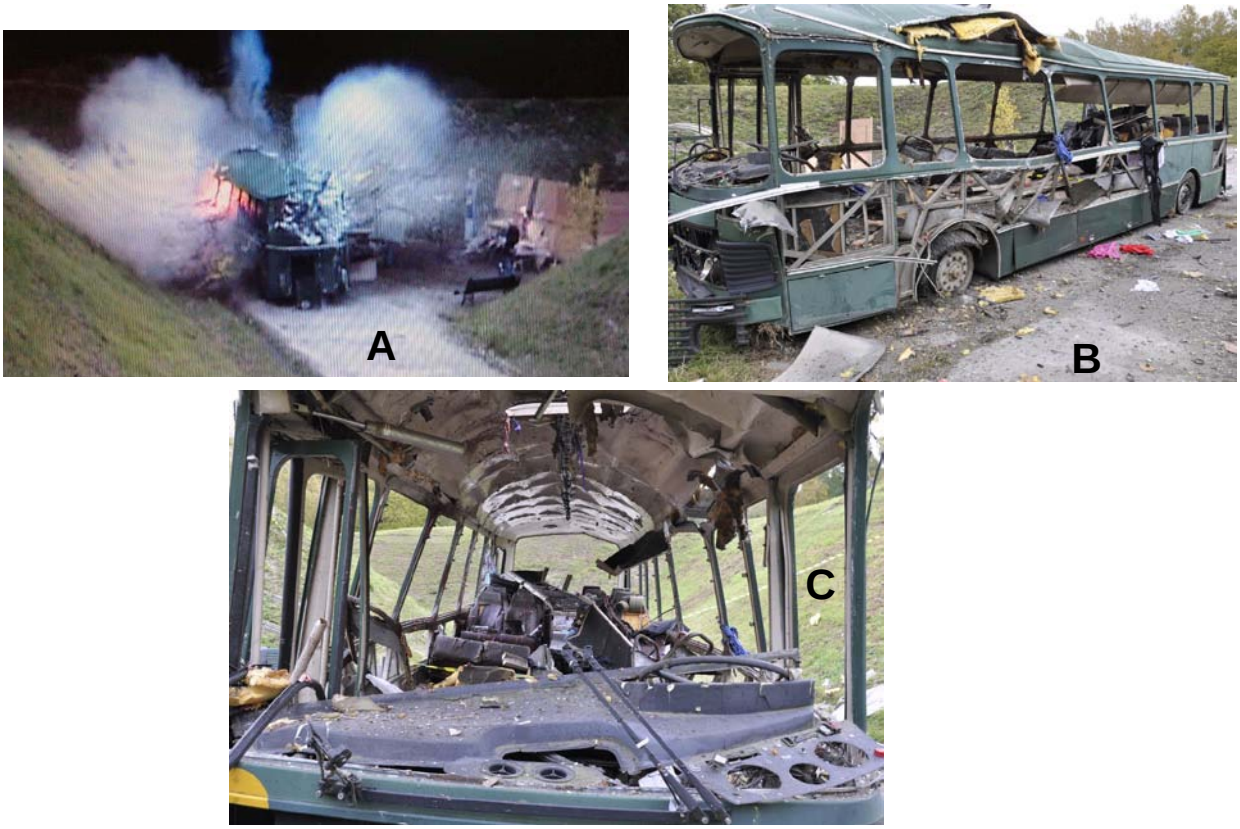


Figure IV-3. Photographies représentant (A) le moment de l'explosion, les dégâts causés (B) à l'extérieur et (C) à l'intérieur du bus.

3. Les prélèvements à analyser

Divers prélèvements ont été effectués par les équipes de terrain, mais au laboratoire, seuls les frottis réalisés à l'intérieur du bus ont été extraits et analysés. Deux extraits aqueux représentatifs, nommés Extrait 1 et Extrait 2, seront ici présentés. Ces deux extraits correspondent à des frottis réalisés respectivement sur la carcasse intérieure droite et gauche du bus. Les analyses de composés inorganiques réalisées en électrophorèse capillaire et en chromatographie d'échange d'ions ont été comparées qualitativement et quantitativement puis l'analyse des carbohydrates en CE a été effectuée.

4. L'analyse des anions inorganiques

A l'aide de la méthode développée pour l'analyse des anions présentée dans le chapitre I de la partie II, les extraits aqueux 1 et 2 ont été analysés. Les Figures IV-4A et 4B représentent la superposition de l'électrophérogramme obtenu pour une solution standard d'anions à 20 mg L^{-1} dans un mélange d'eau ultra-pure/électrolyte (9/1) (en rouge) et les extraits 1 (Figure IV-4A) et 2 (Figure IV-4B) (en noir).
On retrouve majoritairement dans chacun des deux extraits les anions chlorure, nitrate, sulfate et carbonate, alors que l'anion phosphate apparaît uniquement dans l'Extrait 1. Les concentrations obtenues pour chacun des anions ont été comparées à celles déterminées en chromatographie d'échange d'ions et sont compilés dans le Tableau IV-1. Des résultats similaires ont été obtenus pour la CE et la IC, la CE apportant en plus des informations supplémentaires sur la teneur en carbonate des extraits.

5. L'analyse des cations inorganiques

L'analyse des anions inorganiques a ensuite été complétée avec l'analyse des cations inorganiques. La méthode développée dans le chapitre I de la partie II a donc été utilisée pour identifier et quantifier les espèces présentes dans les deux extraits aqueux. La Figure IV-5 présente donc la superposition des électrophérogrammes obtenus pour une solution standard de cations à 20 mg L^{-1} dans l'eau ultra-pure (en bleu) et les extraits 1 (Figure IV-5A) et 2 (Figure IV-5B) (en noir).
L'analyse par CE des cations inorganiques dans les extraits 1 et 2 fournit des résultats qualitatifs très proches (Tableau IV-1). En effet, on retrouve la même composition en cations dans les deux extraits, excepté le cation potassium qui est détecté uniquement dans l'extrait 1.

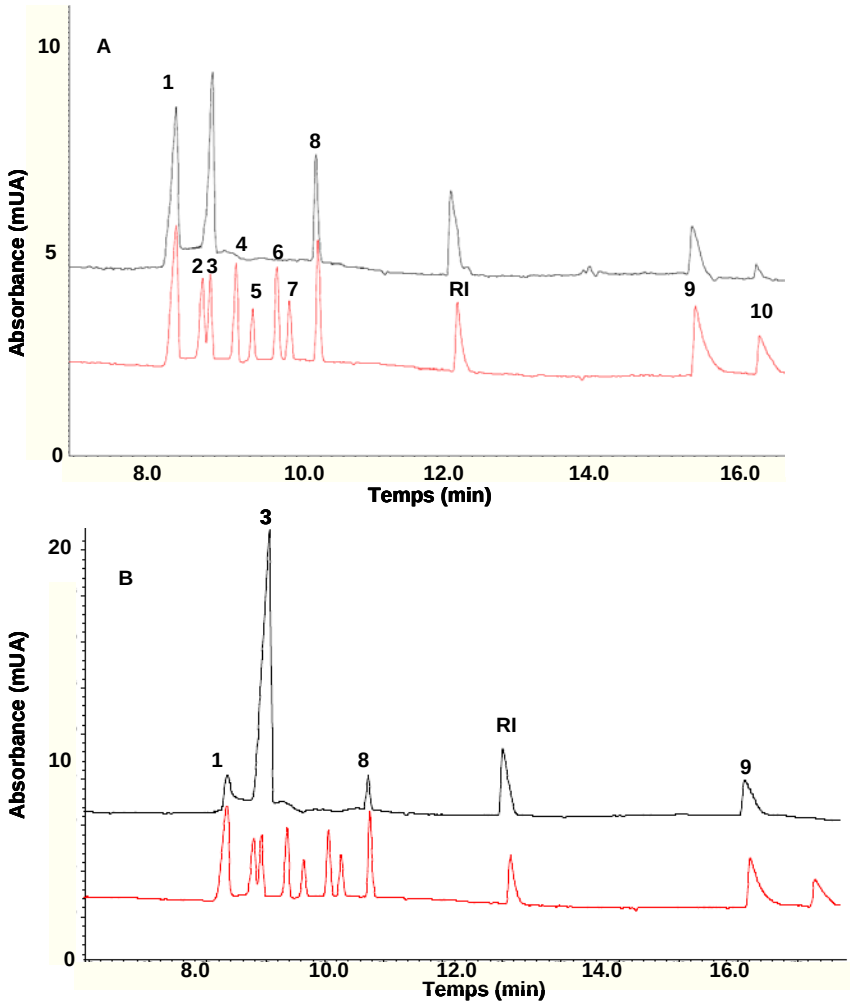


Figure IV-4. Analyse par électrophorèse capillaire d'un mélange standard d'anions inorganiques (en rouge) superposée avec l'analyse d'extraits réels nommés Extrait 1 (4A) et Extrait 2 (4B) collectés après explosion. Capillaire en silice vierge, 50 µm D. I. × 80 cm (détection UV à 70 cm) modifié avec du polybrène à 0,25 g dans 100 mL d'eau ultra-pure. Électrolyte : CrO_3 25 mM, Na_2CrO_4 25 mM et Tris 100 mM (pH 8,2), puis ajout de 6 % EtOH (v/v). Injection éléctrocinétique, 50 s, -2 kV. Température, 15 °C. Tension appliquée, -30 kV. Détection UV indirecte à 254 nm. Concentration des anions dans la solution standard, 20 mg L^{-1} chacun dans un mélange eau ultra-pure/électrolyte (9:1). Identification: chlorure (1), nitrite (2), nitrate (3), thiosulfate (4), perchlorate (5), thiocyanate (6), chlorate (7), sulfate (8), carbonate (9), phosphate (10) et formiate (référence interne, RI).

Quantitativement, d'après le Tableau IV-1, l'électrophorèse capillaire et la chromatographie d'échange d'ions fournissent des résultats équivalents. Le cation ammonium apparaît comme majoritaire dans les extraits, ce cation n'étant pas naturellement présent sur les matrices frottées, la confirmation de son utilisation a bien été prouvée. L'analyse des concentrations molaires déterminées confirme l'utilisation de l'anion nitrate (anion majoritaire) et du cation ammonium (cation majoritaire) dans la charge explosive. L'utilisation du NH_4NO_3 a donc bien été démontrée.

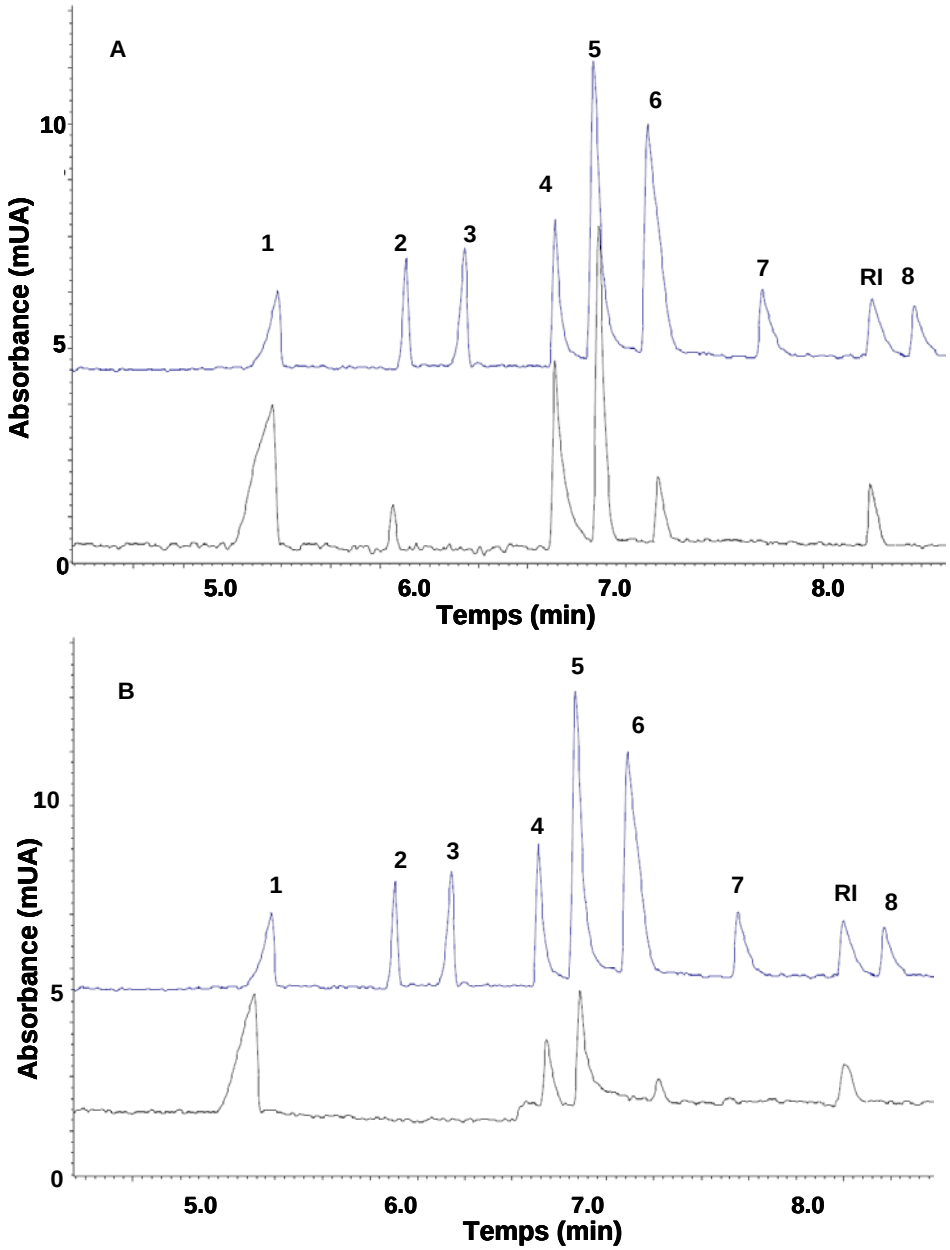


Figure IV-5. Analyse par électrophorèse capillaire d'un mélange standard de cations inorganiques (en bleu) superposée avec l'analyse d'extraits réels nommés Extrait 1 (5A) et Extrait 2 (5B) collectés après explosion. Capillaire en silice vierge, 75 µm D. I. × 80 cm (détection UV à 70 cm) modifié par (i) du polybrène 1 g / L d'eau et (ii) une solution de PVS 0,01 % (m/m). Électrolyte : acétate de guanidine 15 mM ajusté à pH 4,0 avec de l'acide acétique. Température, 20 °C. Tension appliquée, +30 kV. Injection hydrodynamique, 4 s, 50 mbars. Détection UV indirecte à 190 nm. Concentration des cations dans la solution standard, 15 mg L^{-1}, excepté pour Li^+, 2 mg L^{-1}. Identification: NH_4^+ (1), K^+ (2), monométhylammonium (3), Ca^{2+} (4), Na^+ (5), Mg^{2+} (6), Sr^{2+} (7), Ba^{2+} (8), Li^+ (RI).

Tableau 1. Comparaison des résultats quantitatifs obtenus par CE et IC pour les analyses des extraits aqueux 1 et 2 issus d'un frottis sur la carcasse du bus après explosion. NR : non recherché. L'intervalle de confiance a été fixé à 20 % pour les plus faibles concentrations (< 15 mg L^{-1}) et 10 % pour les plus hautes concentrations (>15 mg L^{-1}).

Extraits	Espèce		CE		IC	
			mg L^{-1}	mM	mg L^{-1}	mM
Extrait 1	Anions inorganiques	Cl^-	24 ± 2*	0,70 ± 0,05*	28 ± 3	0,79 ± 0,08
		NO_3^-	63 ± 6*	1,02 ± 0,10*	60 ± 6	0,97 ± 0,10
		SO_4^{2-}	25 ± 2*	0,26 ± 0,02*	21 ± 4	0,22 ± 0,04
		HCO_3^-	33 ± 3*	0,54 ± 0,05*	NR	
		HPO_4^{2-}	13 ± 1	0,14 ± 0,01	11 ± 2	0,11 ± 0,02
	Cations inorganiques	NH_4^+	57 ± 6*	3,17 ± 0,30*	55 ± 5	3,05 ± 0,28
		K^+	12 ± 2*	0,31 ± 0,05*	11 ± 2	0,28 ± 0,05
		Ca^{2+}	39 ± 4*	0,98 ± 0,10*	36 ± 4	0,90 ± 0,10
		Na^+	27 ± 3	1,17 ± 0,13	23 ± 2	1,00 ± 0,09
		Mg^{2+}	3 ± 1	0,13 ± 0,04	3 ± 1	0,12 ± 0,04
Extrait 2	Anions inorganiques	Cl^-	8 ± 2	0,23 ± 0,06	7 ± 1	0,20 ± 0,03
		NO_3^-	183 ± 18*	2,95 ± 0,29*	176 ± 18	2,84 ± 0,29
		SO_4^{2-}	7 ± 1	0,07 ± 0,01	7 ± 1	0,07 ± 0,01
		HCO_3^-	31 ± 3*	0,51 ± 0,05*	NR	
	Cations inorganiques	NH_4^+	44 ± 9*	2,44 ± 0,49*	46 ± 9	2,56 ± 0,50
		K^+	3 ± 1	0,08 ± 0,02	3 ± 1	0,08 ± 0,02
		Ca^{2+}	12 ± 1	0,30 ± 0,02	11 ± 2	0,27 ± 0,05
		Na^+	7 ± 1	0,30 ± 0,04	6 ± 1	0,26 ± 0,04
		Mg^{2+}	< LOQ		< LOQ	

* déterminée après avoir dilué l'extrait au 1/10^e afin de ramener la concentration dans la gamme de linéarité.

6. L'analyse des carbohydrates

La charge explosive utilisée contenant du sucre glace, une analyse par CE des carbohydrates potentiellement présents dans ces extraits a également été réalisée avec la méthode développée dans les chapitres I et II partie III. Il s'avère que l'extrait 1 ne contenait qu'une très faible quantité de glucose et de saccharose (< LOQ), l'électrophérogramme n'est donc

pas présenté ici. En revanche, l'extrait 2 contenait une teneur importante en carbohydrates comme le montre la Figure IV-6, superposition entre un électrophérogramme d'une solution standard (rouge) et celui de l'extrait 2 (noir).

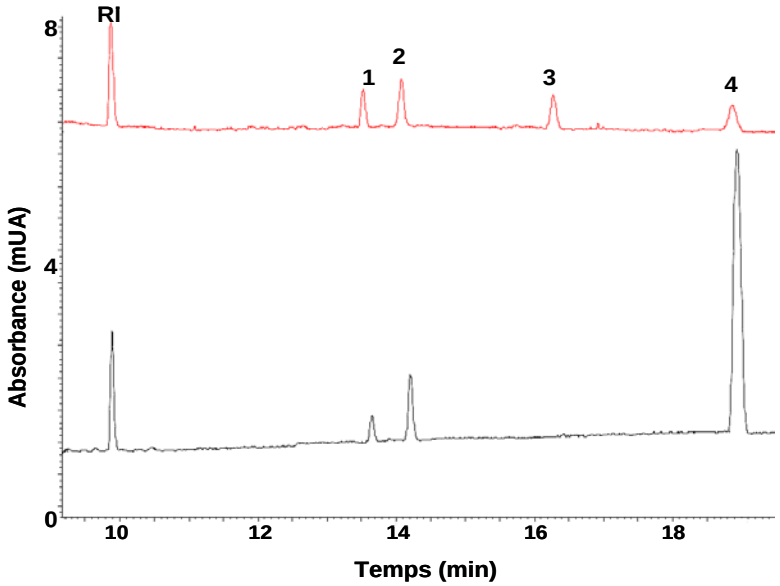


Figure IV-6. Analyse par électrophorèse capillaire d'un mélange standard de carbohydrates à 20 mg L^{-1} dans l'eau ultra-pure (en rouge) superposée avec l'analyse de l'Extrait 2 (en noir) collecté après explosion. Capillaire en silice vierge, 50 µm D. I. × 60 cm (détection UV à 50 cm) modifié par du polybrène 1 g / L d'eau. Électrolyte : NaOH 98 mM, NaCl 120 mM (pH calculé, 12,99). Température, 26,5 °C. Tension appliquée, -14 kV. Injection hydrodynamique, 5 s, 50 mbars. Détection UV directe à 270 nm. Identification: fructose (1), glucose (2), lactose (3), saccharose (4), naphthalènesulfonate à 40 mg L^{-1} (RI).

L'analyse nous confirme donc la présence de carbohydrates en quantité importante dans l'extrait. Le saccharose, composant majoritaire du sucre glace, est présent à 145 mg L^{-1} (0,42 mM), alors que le fructose et le glucose, probable produits de dégradation du saccharose, sont présents à 11 et 25 mg L^{-1} (0,06 et 0,14 mM), respectivement.
L'électrophorèse capillaire permet ici de mettre en évidence la présence de carbohydrates dans les résidus post-explosion et permet donc de confirmer la présence de sucre dans la charge explosive.

7. Conclusion

L'électrophorèse capillaire apparaît comme une technique de choix pour la détection et la quantification d'espèces inorganiques et de carbohydrates dans des résidus post-attentat. Les méthodes développées pour l'analyse de cations et d'anions inorganiques et des carbohydrates durant ce travail de thèse ont permis de confirmer une partie de la composition de la charge explosive utilisée lors de cette simulation d'attentat. La très bonne corrélation entre les résultats de quantification obtenus en CI et CE place l'électrophorèse capillaire comme une méthode complémentaire à la chromatographie d'échange d'ions.

PARTIE V – DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE D'ANALYSE PAR ELECTROPHORESE CAPILLAIRE DE L'EAU OXYGENEE

1. Introduction

Durant ces dernières années, une recrudescence de l'utilisation d'explosifs artisanaux a été observée par les autorités. Le triacétonetriperoxyde (TATP) et l'héxaméthylènetriperoxyde (HMTD) sont deux substances figurant parmi les plus rencontrées car elles sont facilement synthétisables et les molécules de base pour les synthétiser (acétone, eau oxygénée…) sont faciles à se procurer commercialement. Ces explosifs, extrêmement instables, sont actuellement très utilisés par les terroristes kamikazes, comme par exemple lors de l'attentat manqué durant le vol Paris-Miami d'American Airlines en décembre 2001. Ils ont aussi déjà été utilisés en France, par exemple contre la voiture du préfet Aïssa Dermouche en 2004 à Nantes ou impliqués dans des attaques à l'explosif contre des radars ou des expériences de particuliers à leur domicile qui ont mal tourné. C'est donc dans ce contexte sensible que se situe cette étude. Comme le nombre de cas où l'utilisation d'explosifs à base de peroxydes est en permanente augmentation, il est particulièrement important d'avoir à disposition différentes techniques analytiques permettant d'avoir une identification rapide de ces substances.

Malheureusement, ces explosifs possèdent une faible absorption dans le domaine UV ou en fluorescence, mais des méthodes spectroscopiques et analytiques existent pour les identifier. La première méthode analytique pour la détermination du TATP et du HMTD a été publiée en 1980 et le TATP a pu être identifié par spectroscopie IR, RMN et par spectrométrie de masse avec impact électronique et ionisation chimique [1]. Les spectres Raman, IR et RMN du HMTD ont également été enregistrés par Klaeboe et al. [2]. De nos jours ces applications spectroscopiques sont encore largement utilisées [3-8]. Un appareillage portable regroupant une instrumentation permettant d'enregistrer simultanément des spectres IR à transformée de Fourier et Raman a été développé [9]. Une étape de séparation peut aussi être ajoutée avant la détection, permettant l'analyse simultanée du HMTD et du TATP. Cela peut être la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse [10-15] mais le HMTD ne possède pas une limite de détection assez bonne. Ainsi, la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse [11,12,16] ou à la spectrométrie infrarouge [17] apparait alors plus avantageuse.

L'électrophorèse capillaire n'a pas encore été utilisée pour l'analyse d'explosifs à base de peroxydes de par leur manque d'absorbance ou de fluorescence. Néanmoins, une étape de dégradation intra-capillaire de ces peroxydes en H_2O_2 est envisageable. Sous un rayonnement UV fixé à 254 nm, les molécules de HMTD et de TATP sont dégradées en H_2O_2 qui réagit avec un chromophore ou un fluorophore afin d'être détectée [13,14,18,19]. Des dégradations en milieu acide ou enzymatique peuvent être également envisagées [13,18]. Ces différentes approches peuvent être alors tout à fait envisagées en CE.

Or, l'analyse de H_2O_2 par CE a déjà été décrite dans la littérature [20-24]. L'eau oxygénée était séparée sous forme d'un complexe avec les ions borate et détectée en mode électrochimique. Une autre méthode proposée par Shihabi utilise également un tampon borate pour l'analyse en CE de l'eau oxygénée, mais met en œuvre une détection en mode UV directe [25]. C'est sur cette méthode que nous nous sommes basés pour l'optimisation d'une méthode d'analyse de l'eau oxygénée avant de développer une analyse en CE des explosifs à base de peroxydes sous forme H_2O_2 après leur dégradation au sein du capillaire.

2. Procédures électrophorétiques

Le développement de la méthode a été réalisé avec un système d'électrophorèse capillaire Agilent Technologies 7100 et l'étude des effets de matrice a été réalisée sur un appareillage Beckman Coulter après transfert de la méthode. La méthode comprend un capillaire en silice vierge de diamètre interne 50µm et de 36 cm de longueur totale avec la fenêtre de détection située à 8,5 cm de la sortie. Le capillaire a été conditionné avec NaOH 1 M (10 V_{cap}), puis avec NaOH 0,1 M (10 V_{cap}) et enfin avec de l'eau ultra-pure (10 V_{cap}). Entre chaque injection, le capillaire a été rincé pendant 3 min sous 1 bar (3 V_{cap}) avec l'électrolyte de séparation choisi pour l'analyse. Les échantillons ont été injectés en mode hydrodynamique pendant 3 s sous 30 mbars (0,7 % V_{cap}). Les électrolytes ont été préparés à partir d'acide borique, de soude 1 M, d'eau ultra-pure et d'acide acétique. Le peroxyde d'hydrogène utilisé pour la préparation des échantillons était une solution commerciale à 30 % en masse correspondant à une concentration de 9,82 M. Le marqueur neutre utilisé pour le calcul des mobilités électroosmotique (μ_{eo}) et électrophorétique (μ_{ep}) était le diméthylformamide (DMF). Les tampons borates réalisés pour la complexation de l'eau oxygénée sont à base d'acide borique, de soude (pour moduler la force ionique du BGE) et d'acide acétique (pour moduler le pH du BGE).

3. Résultats et discussions

3.1. Mise en évidence de la complexation de H_2O_2 avec les ions borate

Les conditions expérimentales de départ pour cette étude ont été choisies pour être très proches de celles de Shihabi [25] afin d'analyser le peroxyde d'hydrogène par électrophorèse capillaire avec une détection UV en mode direct (Voir Tableau V-1). L'électrophérogramme obtenu avec les conditions opératoires proches de celles développées par Shihabi est présenté Figure V-1.

Tableau V-1. Conditions opératoires développées par Shihabi [25] et initiales de notre étude

Conditions expérimentales utilisées par Shihabi [25]	**Conditions initiales utilisées dans cette étude**
Tampon borate 170 mmol/L ajusté à pH 8,6 avec NaOH 2 M	Tampon borate 170 mmol/L ajusté à pH 8,6 avec NaOH 1 M
Absorption UV 220 nm	Absorption UV 220 nm
Tension : 10,5 kV	Tension : 10 kV
T : 25 °C	T : 25 °C
Capillaire : 32 cm x 50 µm d.i.	Capillaire : 36 cm x 50 µm d.i.

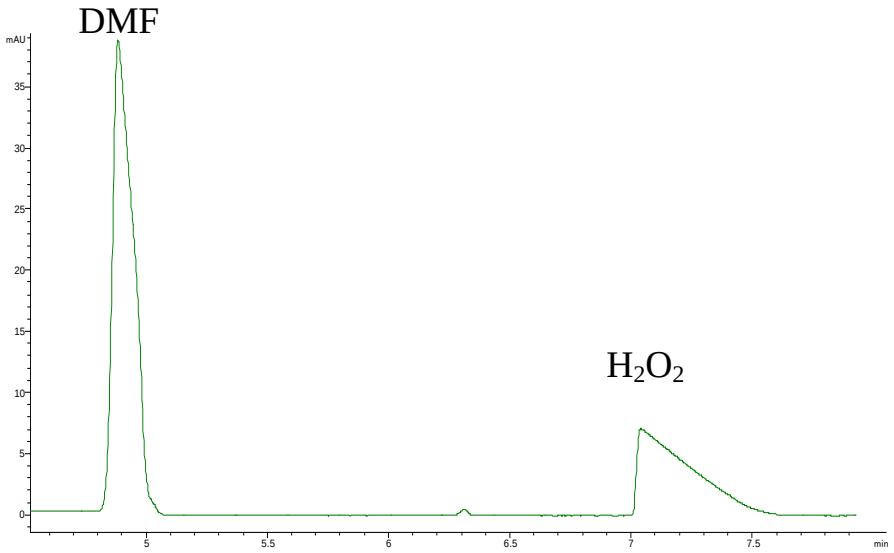


Figure V-1. Analyse d'un échantillon standard d'eau oxygénée dans les conditions opératoires proches de celles de Shihabi. Capillaire en silice vierge, 36 cm x 50 µm d.i. Electrolyte : tampon borate 170 mmol/L ajusté à pH 8,6 avec NaOH 1 M, force ionique : 34 mM ; Température : 25 °C. Tension : 10 kV. Echantillon : DMF dilué dans l'électrolyte (0,1 % (v/v)) et H_2O_2 dilué dans de l'eau ultra-pure (C = 0,163 M). Injection hydrodynamique (3 s, 30 mbars).

La séparation obtenue est rapide, le marqueur neutre migre en moins de 5 min et H_2O_2 est détectée vers 7 min sous la forme d'un pic fortement dissymétrique. L'eau oxygénée a un pKa de 11,6 [26], donc au pH d'étude (pH 8,6), H_2O_2 sous sa forme libre n'est pas ionisée. Or, sa migration retardée par rapport à l'EOF démontre qu'elle se trouve sous forme anionique, en accord avec l'existence de complexe(s) borate déjà mentionnés [27-31] et exploités [20-24] dans la littérature. Les équilibres de formation des complexes H_2O_2 avec les ions borate sont donnés par les équations 1 et 2 [30].

$$B(OH)_4^- + H_2O_2 \Longleftrightarrow (HO)_3BOOH^- + H_2O \quad (1)$$

$$(HO)_3BOOH^- + H_2O_2 \Longleftrightarrow (HO)_2B(OOH)_2^- + H_2O \quad (2)$$

Ces phénomènes de complexation pourraient être à l'origine de la forme dissymétrique du pic de H_2O_2. La traînée arrière alors observée est sans doute synonyme d'un équilibre assez lent

entre les différentes formes possibles de complexes. Cette complexation n'a pas été évoquée par Shihabi [25] et n'a donc pas fait l'objet d'une étude lors du développement de sa méthode. L'influence du pH, de la concentration en borate, de la force ionique et de la température sur la migration et l'asymétrie du pic de H_2O_2 a donc été étudiée.

3.2. Influence du pH de l'électrolyte à concentration en borate et force ionique constantes

Afin d'étudier l'influence du pH de l'électrolyte sur la complexation entre l'eau oxygénée et les ions borate, et tenant compte de la valeur du pKa de l'acide borique (9,2), des séparations avec des électrolytes de pH compris entre 8,3 et 10,4 à force ionique (34 mM) et donc concentration en $B(OH)_4^-$ (34 mM) constantes ont été réalisées. La concentration en acide borique $B(OH)_3$ diminuait quant à elle lorsque le pH augmentait. Les pics pour H_2O_2 obtenus pour les électrolytes ayant des pH variant de 9,9 à 10,3 sont présentés sur la Figure V-2.

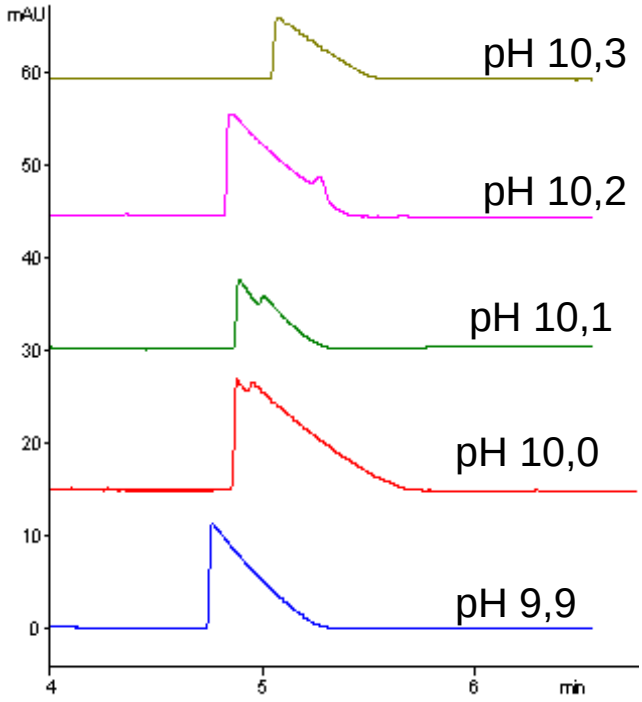


Figure V-2. Electrophérogrammes de l'eau oxygénée : influence du pH du BGE à force ionique et $[B(OH)_4^-]$ constantes.Electrolyte : tampon borate de sodium, ajusté au pH indiqué avec NaOH 1 M, force ionique constante, 34 mM ; Autres conditions : voir Figure V-1.

Autour de pH 10,0, un dédoublement du pic de l'eau oxygénée a été observé. Ce type de phénomène a déjà été remarqué par Pizer et al. en 1987 par RMN ^{11}B. En présence d'ions borate vers pH ~ 10, deux formes majeures de type peroxoborate (définies par les équations 1 et 2) sont présentes en solution. Ces formes pourraient être celles détectées par le pic asymétrique representé Fig. V-1, mais d'autres complexes, correspondant à des formes

condensées et polymérisées des ions borate (dimère ou trimère), pourraient aussi être présents autour de pH 10 et à forte concentration en ions borate. Ces diverses formes pourraient donc expliquer l'apparition de l'épaulement sur les électrophérogrammes de la Fig. V-2. Pour autant, les structures exactes n'ont pas été identifiées, rendant difficile toute interprétation plus poussée. La complexité du système étudiée est représentée sur la Figure V-3 avec le tracé de la variation de la mobilité électrophorétique de l'eau oxygénée (calculée d'après les résultats présentés Figure V-2) en fonction du pH de l'électrolyte.

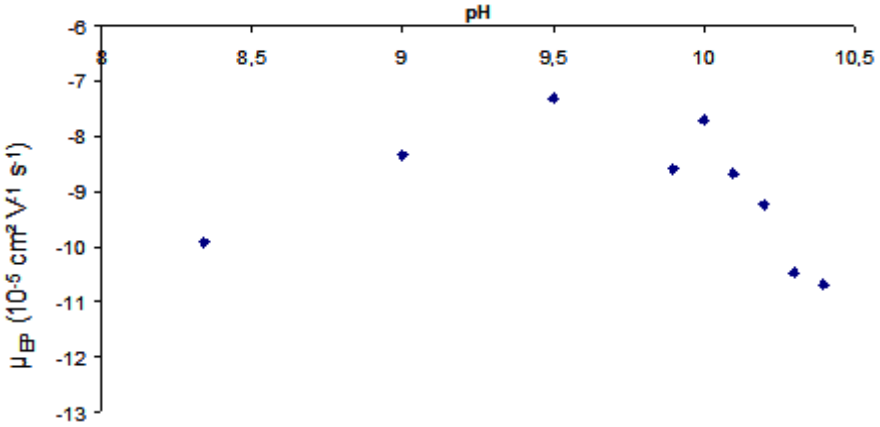


Figure V-3. Variation de la mobilité électrophorétique de l'eau oxygénée en fonction du pH de l'électrolyte. Conditions opératoires : voir figure V-2. Mobilités calculées à partir du temps de migration de l'eau oxygénée au maximum du pic.

On observe que la mobilité électrophorétique de l'eau oxygénée varie de façon non monotone avec le pH, ce qui traduit la complexité des phénomènes dans ce milieu. Pour les pH les plus élevés l'augmentation, en valeur absolue, de la mobilité électrophorétique avec le pH serait cohérente avec une augmentation du taux de complexation, entraînant une augmentation de la charge. Pour les pH plus faibles, la diminution, en valeur absolue, de la mobilité avec le pH pourrait indiquer une augmentation plus rapide de la taille du complexe, en raison de la formation de formes polyborate. D'un point de vue analytique, pour éviter la présence de pics présentant un épaulement, il semble préférable d'utiliser la complexation de l'eau oxygénée avec les ions borate à des pH inférieurs à 9,5, c'est pour cette raison que le pH sera pour la suite des analyses fixé à 9,0.

3.3. Influence de la concentration en borate à pH et force ioniques constants

Afin d'étudier l'influence de la concentration en borate dans l'électrolyte sur la séparation de l'eau oxygénée, les électrolytes ont été préparés avec une force ionique constante constante (I = 97 mM) en ajoutant une quantité constante de soude 1 M et le pH a été ajusté à 9,0 par de l'acide acétique. Pour chaque électrolyte, le tracé des courbes I = f(V) a permis de déterminer une tension de séparation commune fixée à 10 kV permettantd'éviter tout effet Joule.

Comme le montre la Figure V-4, l'augmentation de la concentration totale en borate entraîne une augmentation (en valeur absolue) de la mobilité électrophorétique apparente, ce qui est cohérent avec une augmentation du taux de complexation.

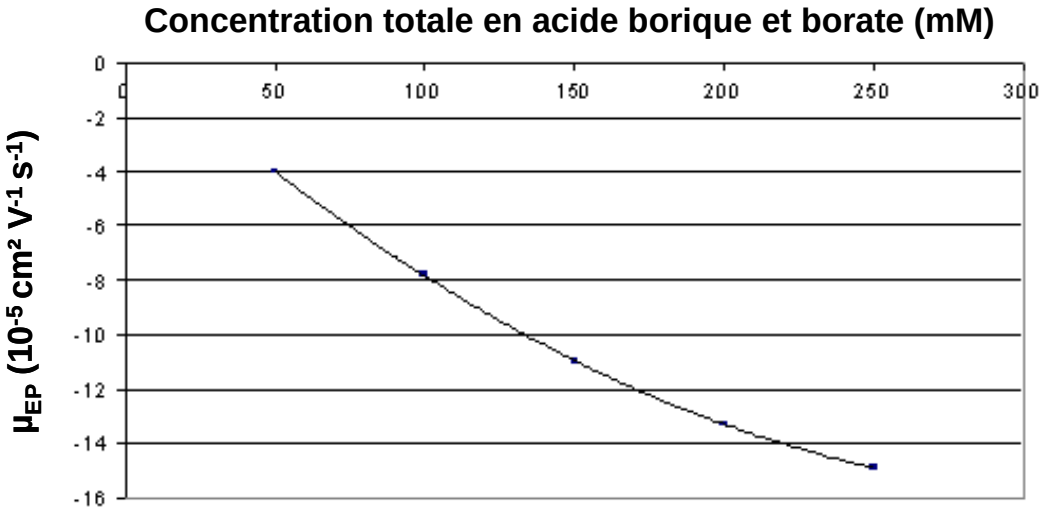


Figure V-4. Variation de la mobilité électrophorétique de H_2O_2 complexée en fonction de la concentration totale en borate. Electrolyte : tampon borate de sodium aux concentrations indiquées, force ionique maintenue constante à 97 mM par NaOH et pH ajusté à 9,0 par l'acide acétique. Autres conditions : voir Figure V-2.

Il apparaît qu'une concentration totale en borate de l'ordre de 100 mM permet d'obtenir un pic bien défini pour l'eau oxygénée, bien distinct du signal d'électroosmose (mobilité électrophorétique d'environ -8 x 10^{-5} cm^2 V^{-1} s^{-1}), en moins de 8 min. L'électrolyte de concentration totale en borate égale à 100 mM parait donc être un bon choix.

3.4. Influence de la force ionique à pH et concentration en borate constants

Dans le but de réduire l'asymétrie des pics et obtenir un gain sur le temps d'analyse, la force ionique a ensuite été étudiée. Quatre valeurs de force ionique (38, 60, 80 et 100 mM) ont ainsi été testées à concentration totale en borate constante (100 mM) et à pH ajusté avec de l'acide acétique à pH = 9,0.

La variation du logarithme népérien de la valeur absolue de μ_{EP} de H_2O_2 complexée en fonction de la racine carrée de la force ionique des électolytes précédemment décrits est représentée Figure V-5.

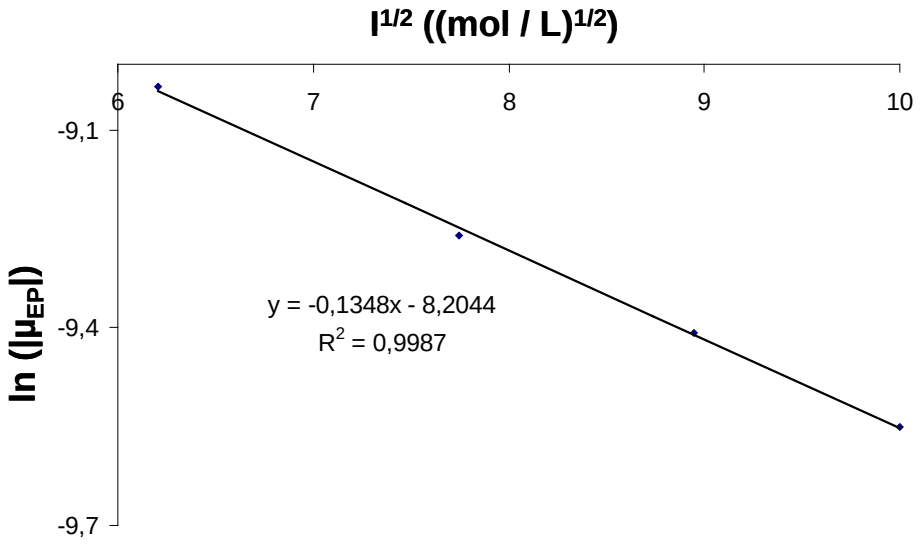


Figure V-5. Variation du logarithme népérien de la la valeur absolue de la mobilité électrophorétique de H_2O_2 complexée (exprimée en 10^{-5} cm² V^{-1} s^{-1}) en fonction de la racine carrée de la force ionique de l'électrolyte. Electrolyte : tampon borate de sodium 100 mM, force ionique fixée aux valeurs indiquées dans le Tableau V-3 par NaOH et pH ajusté à 9,0 par l'acide acétique. Autres conditions : voir Figure V-4.

Le fait que le logarithme népérien de la mobilité électrophorétique varie linéairement avec la racine carrée de la force ionique, conformément au modèle de Friedel (voir paragraphe A.2.2.1, de l'Annexe A), laisse penser que cette variation de la mobilité électrophorétique n'est due qu'à un effet de force ionique, et que cette dernière ne modifie pas la distribution de l'eau oxygénée sous les différentes formes complexes. La force ionique apparaît alors comme un paramètre important capable de moduler la migration d'H_2O_2 complexée sans modifier sa complexation avec les ions borate. Cette modulation pourra permettre d'ajuster la sélectivité en cas de comigration avec de potentiels interférents. Les asymétries de pics varient de manière croissante avec la force ionique. Elles passent de 10 pour une force ionique de 38 mM à près de 30 pour une force ionique de 100 mM. C'est donc une force ionique de 38 mM qui a été choisie pour la suite de l'étude.

3.5. Influence de la température

Afin de tenter d'améliorer l'asymétrie du pic d'eau oxygénée, l'influence de la température de la séparation a été étudiée. Après avoir vérifié l'absence d'effet Joule pour chacune des températures testées, les séparations ont été effectuées à 20, 25, 30 et 35 °C avec des électrolytes composés de 100 mM de borate, une force ionique de 38 mM et un pH fixé à 9,0. Le temps d'analyse diminue de 5 min à moins de 3 min lorsque T passe de 20 à 35 °C. Le Tableau V-2 regroupe les tensions appliquées pour réaliser la séparation, les asymétries de pics et les mobilités électrophorétiques de H_2O_2 à chaque température. Le pic de l'eau oxygénée devient plus symétrique avec des asymétries variant de 13 à 20 °C jusqu'à 8 à 35 °C

(n = 3). Dans ce cas, en effet, la dispersion par électromigration devrait conduire à une traînée arrière, la mobilité électrophorétique de l'analyte étant inférieure en valeur absolue à celle du co-ion borate. Ceci laisse penser que la traînée arrière des pics serait plutôt d'origine cinétique. Finalement, une température de 30 °C, conduisant à une analyse plus rapide, un pic plus symétrique mais restant bien séparé de l'EOF, a donc été choisie pour la séparation.

Tableau V-2. Influence de la température de séparation sur l'asymétrie du pic d'eau oxygénée. L'asymétrie a été calculée comme le rapport des demi-largeurs du pic à 10 % de sa hauteur. RSD calculé avec n = 3.

Température	Tension	Asymétrie (% RSD)	μ_{ep} (10^{-5} cm² V^{-1} s^{-1}) (% RSD)
20 °C	12 kV	13,0 (1,1)	-7,8 (0,8)
25 °C	12 kV	10,2 (1,5)	-8,8 (0,7)
30 °C	12 kV	8,8 (0,9)	-10,6 (0,9)
35 °C	14 kV	8,1 (1,1)	-12,0 (0,5)

Les conditions opératoires finalement retenues sont donc :

- ✓ Capillaire en silice vierge, 36 cm x 50 µm d.i.
- ✓ Electrolyte : tampon borate 100 mM, force ionique ajusté à 38 mM par la soude, et pH ajusté à 9,0 par l'acide acétique
- ✓ Tension appliquée : 12 kV
- ✓ Température : 30 °C

4. Transfert d'appareillage

Au Laboratoire Central de la Préfecture de Police, l'analyse de l'eau oxygénée et des peroxydes en règle générale s'effectuera sur un appareillage P/ACE MDQ de chez Beckman Coulter. Un transfert d'appareillage de l'appareil Agilent Technologies HP 7100 vers l'appareil Beckman Coulter P/ACE MDQ a donc été réalisé. Les conditions opératoires finales présentées précédemment ont pu être conservées à l'identique, excepté la tension de séparation qui a pu être augmentée grâce à la meilleure thermorégulation du système Beckman, l'échauffement lié à l'effet Joule devenant moins important. Les courbes I = f(U) comparatives des deux appareillages réalisés avec l'électrolyte final sont présentées Figure V-6.

La courbe obtenue avec l'appareillage Beckman Coulter P/ACE MDQ reste linéaire à des tensions supérieures à celles que peut atteindre l'appareillage Agilent HP 7100. La tension de séparation a ainsi pu être augmentée à 15 kV au lieu de 12 kV, ce qui correspond a un gain de 35 s sur la séparation. Les limites de détection ont également été mesurées pour un rapport signal sur bruit égal à trois et comparées d'un appareillage à un autre. Une limite de détection

de 0,93 mM a été obtenue avec l'appareillage Agilent Technologies HP 7100 et une limite de détection de 0,95 mM pour l'appareillage P/ACE MDQ de chez Beckman Coulter.

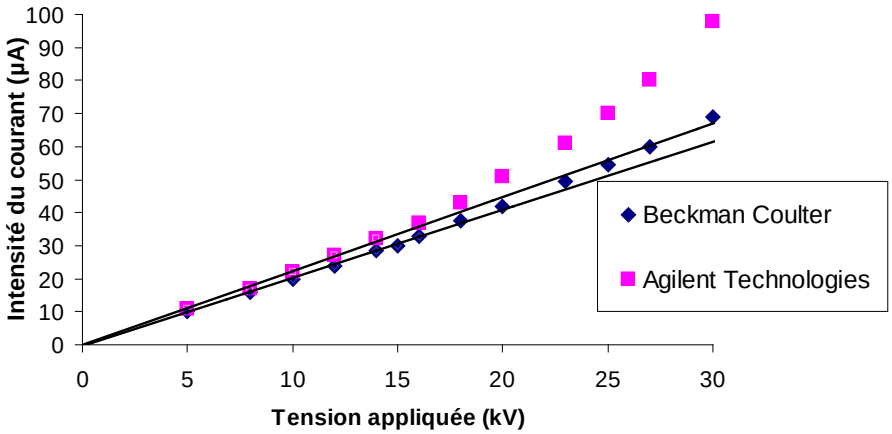


Figure V-6. Courbes d'effet Joule pour l'électrolyte développé à 30 °C obtenues avec les appareillages Beckman Coulter P/ACE MDQ et Agilent Technologies HP7100

Des limites de détection similaires ont été obtenues pour les deux appareillages, ce qui met bien en évidence les progrès obtenus par Agilent Technologies sur le système de détection du modèle HP 7100 par rapport au modèle HP^{3D}CE.

5. Reproductibilité et linéarité

Des tests de reproductibilité ont ensuite été menés avec cinq injections réalisées sur trois jours d'une solution contenant 150 mM de H_2O_2. Les électrolytes et les solutions standard étaient préparées quotidiennement. Les réponses mesurées étaient les temps de migration, les aires corrigées et les temps de migration et les aires corrigées normalisées $(A_i / t_{Mi})/(A_{NSA} / t_{NSA})$ par le pic de l'ion naphthalènesulfonate utilisé comme étalon interne. Comme étudié précédemment dans ce manuscrit dans les Chapitres I, II et III de la partie II, la répétabilité de la méthode a été caractérisée par l'écart-type relatif intra-jour et la fidélité intermédiaire par l'écart-type relatif sur la fidélité intermédiaire. Les écarts-types relatifs sur les fidélités intermédiaires sont de 2,2 % pour les temps de migration normalisés alors qu'ils se situent autour de 5,5 % pour les temps de migration non-normalisés. Comme c'est couramment le cas en électrophorèse capillaire, la normalisation à l'aide de l'étalon interne permet d'être plus précis dans l'identification des composés. L'écart-type relatif (RSD) sur les aires corrigées se situe en moyenne autour de 8 % et est ramené à environ 5,5 % lorsque l'on normalise par l'aire corrigée de l'ion naphthalènesulfonate.

La gamme de linéarité a également été déterminée et il apparaît que la réponse est linéaire entre 3 et 200 mM. Une validation plus précise de cette gamme de linéarité et une analyse des

effets de matrice lorsque l'eau oxygénée est recherchée dans des extraits complexes devront être réalisées.

6. Conclusion

Une méthode pour l'analyse rapide de H_2O_2 en électrophorèse capillaire a été développée. L'eau oxygénée, composé non-absorbant en UV et non ionisé au pH de l'étude, est analysé en UV direct sous forme anionique grâce à sa complexation avec les ions borate présents dans l'électrolyte de séparation. Les paramètres influençant cette complexation et l'asymétrie du pic (pH, force ionique, concentration totale en borate et température) ont alors été optimisés. Le dédoublement du pic d'eau oxygénée dans certaines conditions de pH laisse penser que l'espèce détectée n'est pas unique mais qu'il existe différentes formes complexes tels que des polyborates. La fidélité intermédiaire de la méthode a été calculée à 5,5 % sur les aires corrigées normalisées et 2,2 % sur les temps de migration normalisés. Une étude des effets de matrice lorsque l'eau oxygénée est recherchée sur du tissu, dans le sol ou sur un coton sera effectuée ainsi qu'une étude de dégradation intra-capillaire des explosifs à base de peroxydes en H_2O_2 sera également menée.

7. Références

[1] Zitrin S., Kraus S., Glattstein B., Proc 1st Int. Symp. On the Analysis and Detection of Explosives, 29-31 March **1983,** FBI Quantico, VA, USA, pp 137-141.
[2] Sulzle D., Klaeboe P., *Acta Chem. Scand. A*, 42 (**1988**) 165.
[3] Oxley J., Zhang J., Smith J., Cioffi E., *Propell. Explos. Pyrot*., 25 **(2000**) 284.
[4] Wierzbicki A., Salter E. A., Cioffi E. A., *J. Phys. Chem. A*, 105 **(2001**) 8763.
[5] Wierzbicki A., Cioffi E., *J. Phys. Chem. A*, 103 (**1999**) 8890.
[6] Todd M. W., Provencal R. A., Owano T. G., Paldus B. A., Kachanov A., Vodopyanov K. L., Hunter M., Coy S. L., Steinfeld J. I., Arnold J. T., *Appl. Phys. B*, 75 (**2002**) 367.
[7] Buttigieg G. A., Knight A. K., Denson S., Pommier C., Bonner Denton M., Forensic Sci. Int., 135 (2003) 53.
[8] Wilson P. F., Prince B. J., McEwan M. J., *Anal. Chem*., 78 (**2006**) 575.
[9] Primera O. M., Pacheco L., De la Torre L. F., Hernandez S. P., Chamberlain R. T., Lareau R. T., *Abstr. Paper Am. Chem. Soc.*, 227 (**2004**) U320-PHYS.
[10] Muller D., Levy A., Shelef R., Abramovich-Bar S., Sonenfeld D., Tamiri J., Forensic Sci., 49 (2004) 935.
[11] Crowson A., Beardah M. S., *Analyst*, 126 (**2001**) 1689.
[12] Widmer L., Watson S., Schlatter K., Crowson A., *Analyst*, 127 (**2002**) 1627.
[13] Schulte-Ladbeck R., Kolla P., Karst U., *Anal. Chem*., 75 (**2003**) 731.
[14] Schulte-Ladbeck R., Karst U., *Anal. Chim. Acta*, 482 (**2003**) 183.
[15] Oxley J. C., Smith J. L., Shinde K., Moran J., *Propell. Explos. Pyrot*., 30 (**2005**) 127.
[16] Xu X., van de Craats A. M., Kok E. M., de Bruyn P. C. A. M., *J. Forensic Sci*., 49 **(2004**) 1230.
[17] Schulte-Ladbeck R., Edelmann A., Quintas G., Lendl B., Karst U., *Anal. Chem*., 78 (**2006**) 8150.
[18] Schulte-Ladbeck R., Kolla P., Karst U., *Analyst*, 127 (**2002**) 1152.
[19] Schulte-Ladbeck R., Karst U., *Chromatographia*, 57 (**2003**) S61.
[20] Ruttinger H. H., Radschuweit A., *J. Chromatogr. A*, 868 (**2000**) 127.
[21] Radschuweit A., Ruttinger H. H., Nuhn P., *J. Chromatogr. A*, 937 (**2001**) 127.
[22] Wang J., Escarpa A., Pumera M., Feldman J., *J. Chromatogr. A* 952 (**2002**) 249.
[23] Minjie X., Wei W., Zhou Z., Yongei Y., *J. Pharm and Biomed. Anal*., 39 (**2005**) 853.
[24] Tsukagoshi K., Saito T. Nakajima R., *Talanta*, 77 (**2008**) 514.
[25] Shihabi Z. K., *Electrophoresis*, 27 (**2006**) 4215.
[26] *Les réactions chimiques en solution,* G. Charlot, Masson, Paris, **1969**.
[27] Edwards J. O., *Inorg. Chem*. 75 (**1953**) 6154.
[28] Antikainen P. J., *Acta Chem. Scandinavica*, 10 (**1958**) 756.
[29] Adams C. J., Clark I. .E, *Polyhedron*, 2 (**1983**) 673.
[30] Pizer R., Tihal C., *Inorg. Chem*., 26 (**1987**) 3639.
[31] Rey S., Davies M., *Chem. Eur. J.*, 12 (**2006**) 9284.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés à l'utilisation de l'électrophorèse capillaire pour la recherche et l'identification d'explosifs inorganiques et organiques dans des résidus post-explosion.

Dans une première partie, des méthodes pour la séparation de mélanges d'anions et de cations inorganiques inédits ont été développées. Ainsi, 19 anions inorganiques ont pu être analysés en moins de 20 min et 17 cations en moins de 12 min avec des limites de détection autour de 0,5 mg L^{-1} et 1,0 mg L^{-1}, respectivement. La variété et la complexité des matrices à analyser après attentat et/ou explosion ont nécessité une étude détaillée des effets de matrices potentiels. Il a ainsi été démontré qu'il était possible d'utiliser un étalonnage externe avec des standards préparés dans l'eau pour quantifier ces espèces. Les deux méthodes développées ont trouvé toute leur place au Laboratoire Central de la Préfecture de Police où elles sont désormais fréquemment utilisées en complément de la chromatographie ionique. La méthode d'analyse simultanée des anions chlorure et nitrate et du cation aluminium à l'aide d'un électrolyte à base d'acide 2,6-pyridinedicarboxylique, qui a été également développée au cours de cette thèse, est quant à elle utilisée de manière systématique puisqu'elle est devenue la méthode de référence pour l'analyse des résidus d'explosion liés à un mélange acide/aluminium.

Les composés organiques étudiés dans la seconde partie de ce travail (carbohydrates et eau oxygénée), n'ont jamais fait l'objet de publications en ce qui concerne leur analyse par CE dans des résidus post-explosion. L'analyse des carbohydrates à l'aide d'un électrolyte très alcalin a permis de mettre en évidence une réaction photochimique transformant les carbohydrates en une espèce intermédiaire absorbante, probablement de la forme malonaldéhyde, lorsque ceux-ci passent devant le détecteur. Le temps de séjour dans la fenêtre de détection et le pH de l'électrolyte sont apparus comme des éléments essentiels pour avoir une forte intensité du signal. La détection des carbohydrates ainsi mieux comprise, une méthode de séparation en CE de 9 carbohydrates d'intérêt en moins de 20 min a été développée à l'aide d'une analyse multivariée et d'une analyse en désirabilité. La méthode optimisée a été validée et remplace petit à petit au laboratoire les séparations de chromatographie sur couche mince, peu résolutives et peu sensibles.

Enfin, l'analyse de l'eau oxygénée, composé entrant dans la composition des explosifs à base de peroxydes, via sa complexation avec les ions borate qui lui confèrent une charge négative et des propriétés d'absorption en UV, a été réalisée en moins de cinq minutes. Cette séparation ouvre des perspectives intéressantes quant à la détection des explosifs à base de peroxydes. Il est en effet bien connu que ce type de molécule se dégrade sous forme de H_2O_2 assez facilement sous l'influence d'un rayonnement UV, par hydrolyse acide ou par réaction enzymatique. Une dégradation intra-capillaire peut alors être envisagée pour détecter de

manière rapide et fiable la présence de ce type de molécule avant explosion. Pour des résidus post-explosion, ces molécules étant très volatiles, des étapes d'extraction et de préconcentration devront probablement être mises en place.

D'autres besoins existent encore au laboratoire, comme la caractérisation rapide des nitrocelluloses, qui selon son degré de nitration peut se révéler explosive. Une approche impliquant la CE pourra donc être examinée, et tout particulièrement la possibilité de réaliser directement dans le capillaire une hydrolyse acide, basique ou enzymatique permettant de libérer les ions nitrite et nitrate, qui seraient finalement quantifiés par CE. Son analyse sera au programme d'une prochaine thèse.

ANNEXES

Annexe A – L'électrophorèse capillaire de zone

A.1. Principes et définitions

L'électrophorèse capillaire est une technique analytique qui permet la séparation des composés ioniques ou ionisables par différence de vitesses de migration sous l'influence d'un champ électrique à l'intérieur d'un capillaire.

A.2. Phénomènes de transport

Le transport des analytes à l'intérieur du capillaire est régi par deux phénomènes : l'écoulement électroosmotique (électroosmose) et la migration électrophorétique.

A.2.1. L'électroosmose

La paroi du capillaire est recouverte de groupements silanol qui se déprotonnent si le pH est supérieur à 2,5. Les groupements silanol déprotonés forment une couche de charges négatives à la surface du capillaire. Les cations solvatés présents dans l'électrolyte (BGE) viennent alors se positionner en regard pour former une double couche électrique, constituée d'une couche dite compacte et d'une couche dite diffuse. Au-delà d'une distance correspondant approximativement à l'épaisseur de cette couche compacte, ces cations se mettent en mouvement dès qu'un champ électrique est créé dans le capillaire, entraînant les molécules de solvant (Figure A-1). L'écoulement qui en résulte possède un profil de vitesse plat et est dirigé de l'anode vers la cathode (écoulement cathodique). La mobilité électroosmotique définie comme le rapport de la vitesse d'écoulement électroosmotique v_{eo} au champ électrique E ($v_{eo} = \mu_{eo}E$) dépend du pH, de la viscosité, donc de la température et de la force ionique et de la nature de l'électrolyte (équation 1).

$$\mu_{eo} = -\frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r \zeta}{\eta} E = \frac{\delta\sigma}{\eta} E \qquad \text{(éq 1)}$$

où ε_0 est la permittivité du vide, ε_r la constante diélectrique du milieu, ζ le potentiel-zéta de la paroi du capillaire, η la viscosité de l'électrolyte, δ l'épaisseur de la double couche et σ la densité de charge surfacique.

Cet écoulement électroosmotique peut être modifié, inversé ou annulé en greffant ou en adsorbant sur la paroi du capillaire des tensioactifs ou des polymères neutres ou chargés.

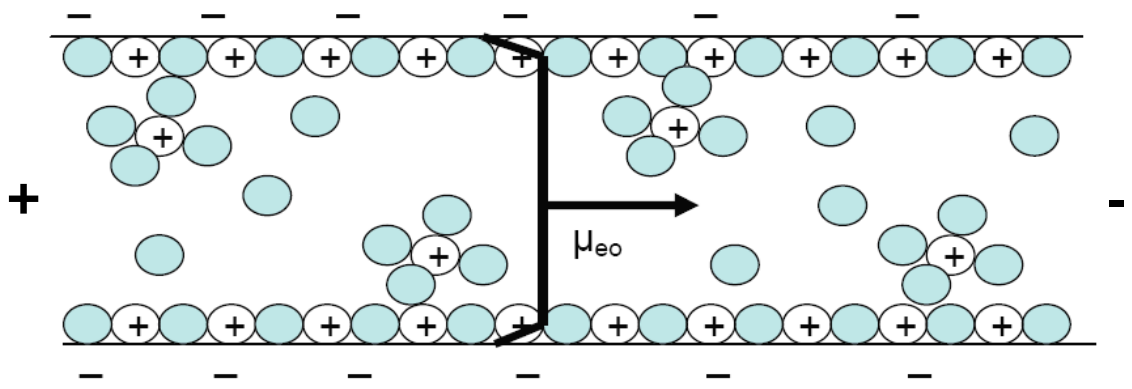


Figure A-1. Représentation schématique de la double couche électrique à la paroi d'un capillaire en silice vierge à l'origine d'un écoulement électroosmotique cathodique.

A.2.2. Mobilité électrophorétique

La mobilité électrophorétique d'un ion tient compte des conditions opératoires telles que le pH, la force ionique, la composition et la viscosité de l'électrolyte. Selon le modèle de Stokes (équation 2), la mobilité absolue à dilution infinie d'un ion donné est directement proportionnelle au rapport charge/taille de l'ion

$$\mu_j^{\infty} = \frac{z_j e}{6\pi\eta R_j} \qquad \text{(éq 2)}$$

où e est la charge de l'électron (1,6 x 10^{-19} C), z_i la charge de l'ion, η la viscosité du solvant et R_j le rayon hydrodynamique de l'ion j solvaté, supposé sphérique et imperméable au solvant.

A.2.2.1. Influence de la force ionique

Une augmentation ou une diminution de la force ionique de l'électrolyte peut causer des variations importantes des mobilités absolues des analytes. Pour une force ionique inférieure à 0,1 mol L^{-1}, la valeur de la mobilité à dilution infinie d'une espèce peut être corrigée à l'aide de l'équation empirique 3.

$$\mu_j^0 = \mu_j^{\infty} \exp[-\omega\sqrt{z_j I}] \qquad \text{(éq 3)}$$

où μ^{∞}_j est la mobilité absolue de j à dilution infinie, I la force ionique de l'électrolyte (en mol.L^{-1}), z_j la charge de l'ion j et ω = 0,5 si z_j = 1 et ω = 0,77 si $z_j \geq 2$.

A.2.2.2. Influence du pH et de la formation de complexe

Une espèce peut être présente sous plusieurs formes lors d'une séparation électrophorétique selon le pH et la présence de ligands. Sa mobilité effective μ_{epi} dépend alors des mobilités absolues des différentes formes qui la composent et peut se calculer à l'aide de l'équation 4.

$$\mu_{epi} = \sum_j \alpha_i^j \mu_j^0 \qquad \text{(éq 4)}$$

où α^j_i est la fraction molaire de la forme j de i et μ_j^0 la mobilité absolue de la forme j.

A.2.2.3. Influence du solvant

Le solvant du BGE a plusieurs effets [1]. Tout d'abord, il permet de modifier l'écoulement électroosmotique grâce à la variation de la viscosité et et ε_r de l'électrolyte, et l'augmentation des pKa des groupements silanol. Il modifie également la migration des ions en changeant la viscosité de l'électrolyte, leur solvatation (donc leur rayon hydrodynamique), leur pKa et les phénomènes d'appariements d'ions. Ainsi, le rapport charge sur taille des ions est modifié et donc aussi leur mobilité électrophorétique.
La valeur v_i de la vitesse d'un analyte dans le capillaire s'exprime grâce à l'équation 5.

$$v_i = \mu_i E \qquad \text{(éq 5)}$$

A.3. L'électrophorèse capillaire de zone

A.3.1. Description

L'électrophorèse de zone est le mode de mise en œuvre le plus simple de l'électrophorèse capillaire dans la mesure où le même électrolyte est utilisé dans les réservoirs anodique et cathodique et dans le capillaire. Lors d'une analyse par électrophorèse capillaire en mode zone, la mobilité apparente de l'analyte régit sa migration dans le capillaire. La mobilité apparente d'un ion correspond à la somme algébrique de sa mobilité électrophorétique et de la mobilité électroosmotique. La Figure A-2 représente une séparation en mode zone réalisée avec l'anode à l'entrée d'un capillaire en silice vierge. Dans ce cas les cations ont une mobilité apparente plus importante que les anions car leur mobilité électrophorétique est de même signe que la mobilité électroosmotique. L'ordre de migration est donc tout d'abord les

cations avec les plus mobiles migrant en premier, puis les espèces neutres qui migrent à la vitesse de l'écoulement électroosmotique et sont détectées en un pic unique et enfin les anions qui migrent dans l'ordre inverse des mobilités électrophorétiques.

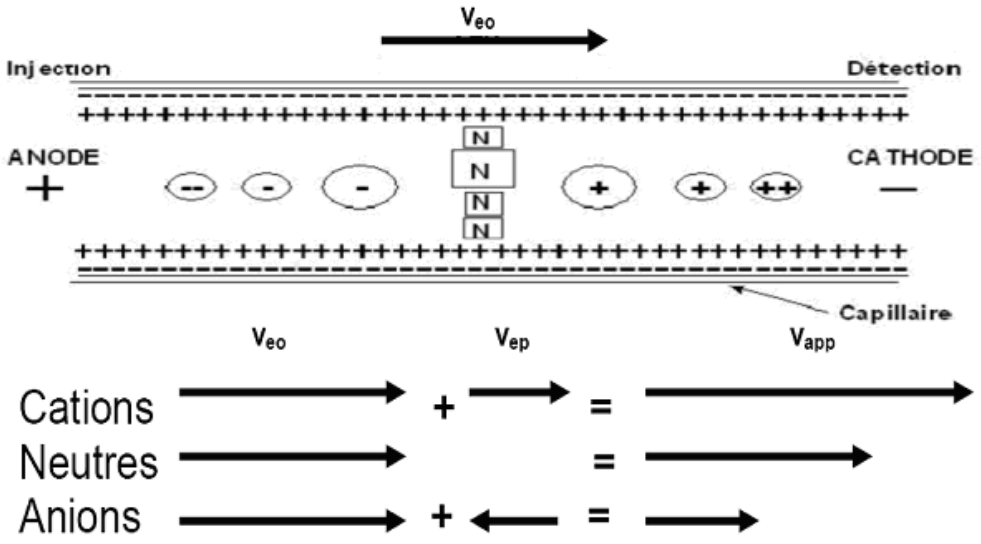


Figure A-2. Ordre de migration d'espèces cationiques, anioniques et neutres lors d'une séparation électrophorétique en mode zone.

A.3.2. Grandeurs fondamentales et effets dispersifs

La qualité d'une séparation est caractérisée par trois grandeurs qui sont la sélectivité α, l'efficacité N et la résolution Rs.
La sélectivité électrophorétique effective α_{eff} entre deux ions est une grandeur indépendante de l'électroosmose. Elle est décrite grâce à l'équation 6 :

$$\alpha_{eff} = \frac{t_{m2} - t_{eo}}{t_{m1} - t_{eo}} \qquad \text{(éq 6)}$$

où t_{m1} et t_{m2} sont respectivement les temps de migration des ions 1 et 2 et $t_{eo,}$ le temps correspondant à l'électroosmose.

L'efficacité d'un pic d'analyte est évaluée par le nombre de plateaux théoriques N qui est le rapport entre la longueur de séparation et la hauteur équivalente à un plateau théorique notée

H représentant l'accroissement de la dispersion spatiale d'une bande ou d'une zone d'analyte par unité de longueur (équations 7 et 8) :

$$H = \frac{\sigma_l^2}{l} \qquad \text{(éq 7)}$$

$$N = \frac{l}{H} = \frac{l^2}{\sigma_l^2} \qquad \text{(éq 8)}$$

où l est la longueur de séparation et σ^2_l la variance spatiale de la bande de soluté considérée.

La variance totale d'un pic électrophorétique peut être exprimée comme la somme de plusieurs contributions :

$$\sigma_l^2 = \sigma_{diffusion}^2 + \sigma_{injection}^2 + \sigma_{détection}^2 + \sigma_{électromigration}^2 \qquad \text{(éq 9)}$$

où $\sigma^2_{diffusion}$, $\sigma^2_{injection}$, $\sigma^2_{détection}$ et $\sigma^2_{électromigration}$ représentent respectivement les contributions à la dispersion totale de la diffusion moléculaire, de l'injection, de la détection et de la dispersion due à l'électromigration.

La résolution Rs entre deux pics dont les temps de migration sont t_1 et t_2 est définie de la façon suivante :

$$Rs = \frac{t_1 - t_2}{2(\sigma_2 + \sigma_1)} \qquad \text{(éq. 10)}$$

où σ représente l'écart-type exprimé en unité de temps de la bande de soluté considérée.

A.4. Mise en œuvre expérimentale

La Figure A-3 présente le schéma de principe de l'électrophorèse capillaire. Les capillaires en silice vierge recouverts extérieurement d'une couche de polyimide sont de longueurs variables comprises entre 30 et 100 cm et de diamètre interne compris entre 10 et 100 µm. L'appareillage se compose d'une alimentation électrique reliée à deux électrodes : l'une reliée au pôle + (l'anode) et l'autre reliée au pôle - (la cathode). Ces deux électrodes et les

extrémités du capillaire plongent dans deux flacons contenant soit l'échantillon à analyser, soit l'électrolyte de séparation.

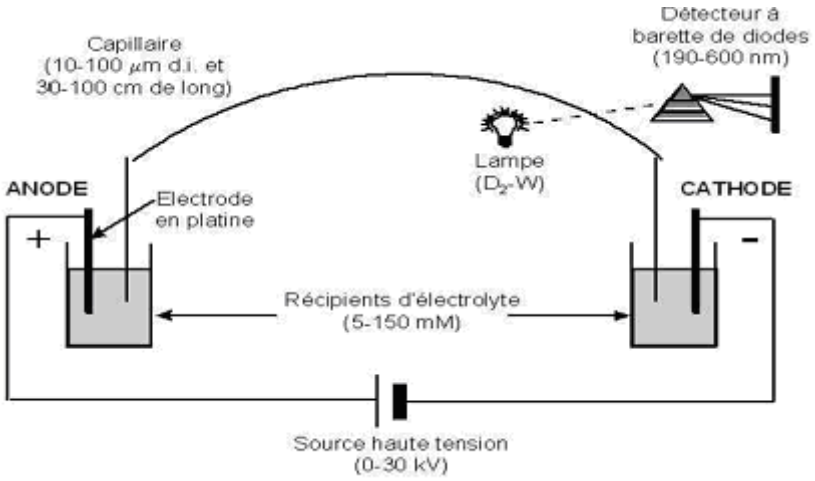


Figure A-3. Schéma de principe de l'électrophorèse capillaire

Deux modes d'injection sont possibles pour les analytes :

- l'injection hydrodynamique : une surpression à l'entrée du capillaire est appliquée pour introduire l'échantillon à l'intérieur de celui-ci. Dans ce cas, la quantité injectée est directement proportionnelle à la valeur de la surpression et du temps durant lequel elle est appliquée.
- l'injection électrocinétique : on applique à l'entrée du capillaire une tension V_0 de l'ordre de quelques kilovolts (kV). Cette tension permet aux composés ionisés ou entraînées par électroosmose de pénétrer à l'intérieur du capillaire. Les analytes ayant une plus grande mobilité apparente sont injectés en plus grande proportion. La quantité injectée dépend alors de V_0 et de la durée d'application de cette tension, de la mobilité électrophorétique des composés et de la mobilité électroosmotique.

A.5. La détection en électrophorèse capillaire

La détection UV est fournie commercialement sur tous les appareillages d'électrophorèse capillaire. Elle est réalisée directement à travers le capillaire au niveau d'une fenêtre réalisée en éliminant la couche de polyimide externe. D'après la loi de Beer-Lambert, l'absorbance UV dépend de la longueur du chemin optique, qui correspond approximativement ici au diamètre du capillaire. Pour pallier le manque de sensibilité lié à ce faible chemin optique, des cellules en Z ou bien des capillaires à bulle peuvent être utilisés [2,3].

La plupart des anions et cations inorganiques n'absorbent pas ou peu dans la zone UV-Visible. Ils ne peuvent donc pas être directement détectés. Pour pallier cette absence d'absorbance, de nombreuses méthodes impliquant une détection en UV indirecte ont été mises en oeuvre avec l'utilisation d'agents visualisants ou chromophores [4,5]. Le chromophore doit être anionique pour l'analyse des anions, et cationique pour celle des cations. Lorsque les analytes passent devant le détecteur, une chute d'absorbance est détectée qui se traduit par un pic négatif. La valeur de la mobilité électrophorétique du chromophore est un paramètre très important : elle doit se situer dans la même gamme que celles des anions d'intérêt sous peine d'obtenir des pics fortement dissymétriques. C'est pour cette raison que l'anion chromate est utilisé très souvent pour l'analyse des anions inorganiques [6-8].

D'autres types de détection sont possibles pour les espèces inorganiques, telles que la conductimétrie qui est une alternative intéressante. Cette technique de détection a pour avantage d'être universelle pour l'analyse d'espèces ioniques. Elle implique une mesure de conductance entre deux électrodes, qui peut être réalisée soit par contact entre l'électrolyte de séparation et les électrodes de mesure ou bien en mode sans contact dans lequel les électrodes se situent de part et d'autre du capillaire [9]. Enfin, pour les molécules organiques, des modes de détection tels que l'ampérométrie [10], la fluorimétrie [11] ou bien la spectrométrie de masse [12] ont été rapportés.

Les couplages CE/MS se sont énormément développés depuis la fin des années 80. Ce couplage présente cependant quelques difficultés de mise en œuvre, dont le maintien du contact électrique aux bornes du capillaire et l'obtention d'une bonne efficacité d'ionisation/désorption des analytes dans la source d'ionisation. Deux interfaces sont aujourd'hui fréquentes : les interfaces avec ou sans liquide additionnel (Figure A-4). Les processus d'ionisation par électronébulisation [13], ionisation chimique à pression atmosphérique [14,15], ionisation photochimique à pression atmosphérique [16], ionisation par plasma à couplage inductif ICP/MS [17], ou par laser assistée par matrice (MALDI) [18,19] sont aujourd'hui les modes d'ionisation les plus courants en CE.

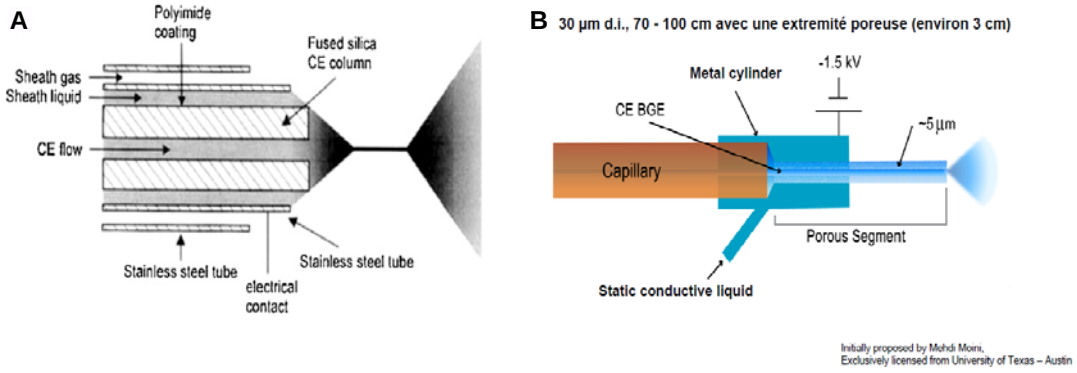


Figure A-4. Schéma de principe des interfaces CE-ESI avec liquide additionnel (A) et sans liquide additionnel (B). Adaptés de documents Agilent Technologies et Beckman Coulter.

A.6. Préconcentration par amplification de champ électrique

La faible sensibilité des méthodes CE, due principalement au faible chemin optique dans les modes de détection spectrophotométiques, peut être améliorée à l'aide de techniques très performantes, rapides et simples telle la préconcentration par amplification de champ électrique. Cette technique consiste en l'injection d'un échantillon dans un capillaire rempli d'un BGE de conductivité supérieure à celle de l'échantillon [20]. Lorsque la tension est appliquée, comme le champ électrique E_i régnant dans une zone i est inversement proportionnel à la conductivité K ($E = J / K$) car la densité de courant J est constante dans le capillaire, les analytes migrent plus vite dans la zone échantillon où règne un champ électrique plus grand que dans la zone BGE. Les analytes ralentissent donc fortement quand ils pénètrent dans le BGE et se concentrent à la frontière entre la zone échantillon et l'électrolyte ce qui permet d'introduire des volumes d'échantillon plus importants (voir Figure A-5).

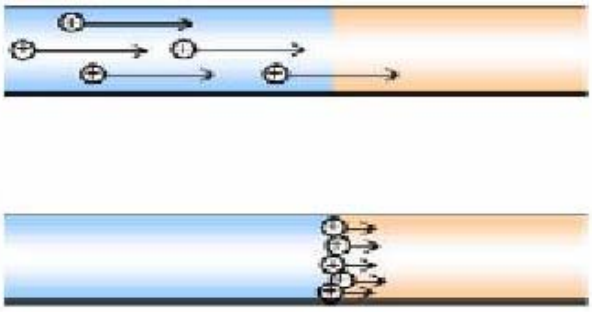


Figure A-5. Représentation schématique de la préconcentration par amplification de champ.

A.6.1. Injection hydrodynamique des analytes

Lors d'une injection hydrodynamique, le rapport entre la conductivité de la zone échantillon et celle du BGE doit être d'environ 1/10 [21]. En effet, si la conductivité de l'échantillon est trop faible, le champ sera très intense dans la zone échantillon, ce qui entraîne un effet Joule important. Ce phénomène se traduit par l'apparition de bulles qui peuvent couper le circuit électrique mais peut aussi se traduire par la dégradation des analytes. De plus, si la zone échantillon est peu conductrice, l'écoulement électroosmotique de cette zone sera nettement supérieur à celui localement généré au sein de l'électrolyte. On a alors l'apparition d'une composante hydrodynamique d'écoulement qui se traduit par la perte du profil plat de vitesse donc par une perte d'efficacité. Dans le cas où le rapport des conductivités est d'environ 10, soit l'optimum, cette technique permet un gain de sensibilité entre 5 et 10 [21].

A.6.2. Injection électrocinétique des analytes

Lors d'une injection électrocinétique, les analytes sont introduits selon leur mobilité apparente. Avec ce mode d'injection, la composition de l'échantillon injecté est différente de celle de l'échantillon dans le flacon. Les espèces possédant grande une mobilité électrophorétique entrent majoritairement dans le capillaire. Avec cette approche, la quantité d'analyte injectée est donc beaucoup moins limitée par le volume d'échantillon qui peut être injecté car on ne souffre pas aussi rapidement des problèmes sus-cités dans le cas de l'injection hydrodynamique [22]. C'est pour cela que l'on obtient des gains plus importants avec cette technique [23]. Mais cette injection discrimine les analytes à l'injection selon leur mobilité. Cette discrimination peut néanmoins être un avantage dans le cas d'analyses de matrices réelles, afin de limiter l'introduction d'interférents cationiques, neutres ou anioniques qui sont peu mobiles.

Références bibliographiques

[1] Sarmini K., Kenndler E., *J. Chromatogr. A*, 792 (**1997**) 3.
[2] Note Technique, *High Sensitivity detection cell for Agilent capillary electrophoresis system*, Agilent Technologies, (**1997**).
[3] Moring S.E., Reel R.T., Van Soest R.E.J., *Anal. Chem*., 65 (**1993**) 3454.
[4] Johns C., Macka M., Haddad P.R., *Electrophoresis*, 65 (**2003**) 2150.
[5] Timerbaev A.R., Buchberger W., *J. Chromatogr. A*, 834 (**1999**) 117.
[6] Hargadon K.A., McCord B.R., *J. Chromatogr*., 602 (**1992**) 241.
[7] Hutchinson J.P., Evenhuis C.J., Johns C., Kazarian A.A., Breadmore M.C., Macka M., Hilder E.F., Guijt R.M., Dicinoski G., Haddad P.R., *Anal. Chem.*, 79 (**2007**) 7005.
[8] Kishi T., Nakamura J., Arai H., *Electrophoresis*, 19 (**1998**) 3.
[9] Hutchinson J.P., Johns C., Breadmore M.C., Hilder E.F., Guijt R.M., Lennard C., Dicinoski G., Haddad P.R., *Electrophoresis*, 29 (**2008**) 4593.
[10] Baldwin R.P., *Electrophoresis*, 21 (**2000**) 4017.
[11] MacTaylor C.E., Ewing A.G., *Electrophoresis*, 18 (**1997**) 2279.
[12] Schmitt-Kopplin P., Frommberger M., *Electrophoresis*, 24 (**2003**) 3837.
[13] Olivares J.A., N'Guyen N.T., Yonker C.R., Smith R.D., Anal. Chem., 59 (1987) 1230.
[14] Isoo K., Otsuka K., Terabe S., Electrophoresis, 22 (2001) 3426.
[15] Tanaka Y., Otsuka K., Terabe S., J. Pharm. Biomed. Anal., 30 (2003) 1889.
[16] Nilsson S.L., Andersson C., Sjoberg P.J.R., Bylund D., Petersson P., Jornten-Karlsson M., Markides K.E., Rapid Comm. Mass Spectrom., 17 (2003) 2267.
[17] Alvarez-Llamas G., Fernandez de la Campa M.R., Sanz-Medel A., Trends Anal. Chem., 24 (2005) 28.
[18] Huck C.W., Bakry R., Huber L.A., Bonn G.K., Electrophoresis, 27 (2006) 2063.
[19] Chang S.Y., Yeung E.S., Anal. Chem. 69 (1997) 22.
[20] Mikkers F.E.P., Everaerts F.M., Verheggen T.P.E.M., *J. Chromatogr*., 169 (**1979**) 11.
[21] Burgi D.S., Chien R.L., *Anal. Chem*., 63 (**1991**) 2042.
[22] Chien R.L., Burgi D.S., *J. Chromatogr. A*, 559 (**1991**) 141.
[23] Zhang C.X., Thormann W., *Anal. Chem*., 68 (**1996**) 2523.

Annexe B – Tableau de comparaison entre les appareillages Agilent Technologies HP^{3D}CE et Beckman Coulter P/ACE MDQ

Paramètres comparés	**Agilent Technologies HP^{3D}CE**	**Beckman Coulter P/ACE MDQ**
Gamme de tension de séparation	0-30 kV	0-30 kV
Gamme de pression disponible pour le rinçage du capillaire	0-1 bars (conventionnel) 0-9 bars (ajout de bouteille d'azote)	0-7 bars
Mode d'injection	Hydrodynamique (0-50 mbars) Electrocinétique (1-30 kV)	Hydrodynamique (0-1,8 bars) Electrocinétique (1-10 kV)
Thermostatation du capillaire	Air	Liquide réfrigérant
Détection avec filtre UV	Non	Oui
Détection DAD	Oui avec filtre placé entre la source et le capillaire	Oui sans filtre placé entre la source et le capillaire
Détection LIF	Oui	Oui
Couplage MS	Oui	Oui