

Utilisation de l'ampérométrie 3D pour la détermination du potentiel d'oxydation d'une molécule en vue d'une détection ampérométrique pulsée.

Sylvain Morel^{1,2}, Gérard Alcaraz¹

Résumé : Nous présentons ici l'ampérométrie. Nous décrivons la démarche de fonctionnement de l'ampérométrie 3D et l'optimisation d'une vague de potentiels appliquée à des molécules biologiques.

Mots clés : chromatographie, ampérométrie pulsée, voltamétrie, sucres

Introduction

Les techniques électrochimiques comme la voltamétrie, la coulométrie et l'ampérométrie peuvent être utilisées pour la détection et la quantification de nombreuses molécules d'intérêt biologique : les thiols (Cao X.N. *al.* 2004), les composés phénoliques (Ferrerres F. *et al.* 2005), les sucres (Marin F. *et al.* 2005), les acides aminés (Cataldi T.R. *et al.* 2003) etc. Depuis une dizaine d'années, la détection ampérométrique a pris une place importante dans le domaine de la chromatographie ionique notamment grâce à des seuils de détection extrêmement bas au regard des techniques conventionnelles comme l'absorbance et la conductimétrie. Cette technique a rapidement été adoptée par les chromatographistes car elle présente de plus une grande spécificité. Cependant le développement de techniques ampérométriques n'est pas aisé et reste bien trop souvent l'apanage des électrochimistes qui réalisent ces mises au point en statique. Les récentes avancées matérielles dans le domaine des fréquences d'acquisition et de capacité de retraitement des données informatiques, ont rendu possible le développement de nouvelles techniques ampérométriques et particulièrement en flux. L'objectif de cette note est de présenter l'ampérométrie, de décrire la démarche de fonctionnement de l'ampérométrie 3D et de la mettre en œuvre pour l'optimisation d'une vague de potentiels appliquée à des molécules biologiques.

1. L'ampérométrie

Définition : méthode électrochimique d'analyse utilisant la détermination du courant d'électrolyse qui, fonction de la concentration des corps électroactifs et du potentiel, permet dans des conditions déterminées et après étalonnage, de déduire la concentration des corps électrolysés (<http://fr.answers.com/topic/ampérométrie>).

L'ampérométrie consiste donc à mesurer le courant généré (libération d'électrons) lors de l'oxydation d'un composé C (passage de C_{red} à C_{ox}) après lui avoir appliqué un potentiel :



¹ ENESAD Département Agronomie et Environnement - Laboratoire Qualité des Produits Végétaux - 26, boulevard du docteur Petitjean - BP 87999 - 21079 DIJON Cedex, France

² adresse actuelle : INRA-UMR LEG 17 rue Sully BP 86510, 21065 Dijon Cedex, France

☎ 03-80-69-33-26 ✉ s.morel@enesad.fr

Ce courant se mesure dans une cellule de détection électrochimique (**figure 1**) placée après la colonne et qui comprend 3 électrodes : une électrode de référence Ag/AgCl, une électrode de travail (en or, platine, argent ou carbone vitreux) et une contre électrode en titane.

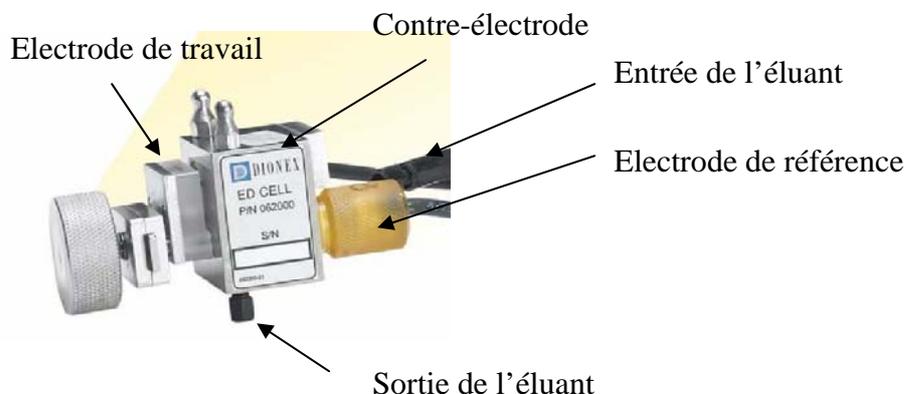


Figure 1 : cellule de détection électrochimique (source Dionex, Voisins-le-Bretonneux, France).

La valeur du courant généré est donnée par l'équation de Nernst qui donne la tension d'équilibre (E) de l'électrode par rapport au potentiel standard (E_0) du couple redox mis en jeu.

$$E = E_0 + 2,3 \left(\frac{RT}{nF} \right) \log \left(\frac{[Ox]}{[Red]} \right)$$

E_0 potentiel standard du système oxydoréducteur en volts

R constante des gaz parfaits, égale à $8,314570 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$

T température en degrés Kelvin

F constante de Faraday, égale à $96\,485 \text{ C.mol}^{-1} = 1 \text{ F}$

n nombre d'électrons transférés dans la demi-réaction

$[Red]$ concentration de l'oxydant

$[Ox]$ concentration du réducteur

E_0 représente le potentiel d'oxydoréduction pour des conditions standard ($p=1 \text{ atm}$, $T= 298^\circ\text{K}$, $\text{pH} = 0$, $[Ox] = [Red] = \text{concentration de référence}$). Il peut être calculé à partir de l'énergie libre standard des composés mis en jeu selon l'équation :

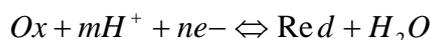
$$\Delta G^0 = G_{Red}^f - G_{Ox}^f = -n.F.E_0$$

ΔG^0 : variation d'énergie libre standard

G_{Red}^f : énergie libre standard de formation des composés réduits

G_{Ox}^f : énergie libre standard de formation des composés oxydés

En milieu aqueux beaucoup de réactions électrochimiques mettent en jeu des protons



avec à 25°C l'équation suivante :

$$E = E_0 - 0,059 \left(\frac{m}{n} \right) \text{pH} + \left(\frac{0,059}{n} \right) \log \frac{[Ox]}{[Red]}$$

La réaction d'oxydation engendre un courant anodique proportionnel à la concentration du composé dissous. Le composé à quantifier doit s'oxyder à un potentiel relativement faible pour ne pas provoquer l'électrolyse de la phase mobile.

En pratique, la détermination du potentiel d'oxydation d'un composé est effectuée par voltamétrie cyclique (VC). C'est-à-dire à partir de la courbe $i = f(E_{app})$, i étant l'intensité du courant anodique et E_{app} le potentiel appliqué. Le composé est soumis à un potentiel croissant d'oxydation jusqu'à un maximum (dépendant de la nature des électrodes et de la phase mobile) puis on fait décroître ce potentiel (réduction) jusqu'à la valeur initiale. Cette opération est répétée un certain nombre de fois d'où le terme de cyclique (**figure 2**). A l'aide de l'ensemble des courbes obtenues, une courbe moyenne est tracée $i = f(E_{app})$. Elle permet de définir avec précision le niveau de potentiel appliqué pour lequel le courant d'oxydation mesuré sera maximal (**figure 3**).

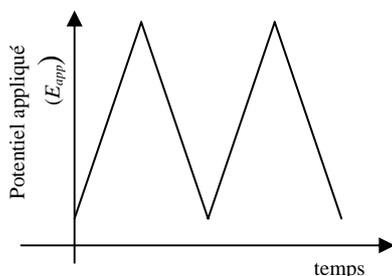


Figure 2 : Courbe typique de potentiels appliqués en voltamétrie cyclique.

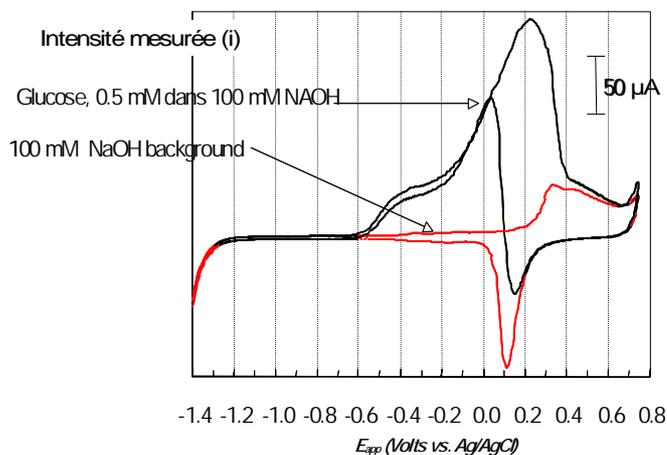


Figure 3 : Courbe $i = f(E_{app})$ du glucose obtenue avec une électrode d'or en milieu alcalin.

La **figure 2** schématise l'allure d'une courbe de potentiels appliqués en VC et la **figure 3** un exemple de courbe obtenue par VC dans le cas de l'oxydation du glucose en milieu basique avec une électrode d'or. Le glucose est une molécule électroactive et l'application de potentiels croissants engendre son oxydation avec génération d'un courant anodique. Cette oxydation a lieu à 350 mV vs RHE (Reference Hydrogen Electrode) dans un tampon phosphate à pH=7,5 (Ernst S. et al. 1979). Le courant mesuré est maximal en milieu alcalin au potentiel de +200 mV. Ernst et al, en 1979 montraient que c'était la fonction hémiacétal en C1 du glucose qui était la première fonction oxydée entraînant ainsi la formation d'une gluconolactone. Plus récemment, il a été montré que l'oxydation du glucose en milieu alcalin générant un courant anodique entre -100 mV et +300 mV avec formation de produits d'électrolyse comme la gluconolactone, le glyconate, l'oxalate et enfin le formate (Tominaga M. et al 2005). Ces mesures de courants anodiques sont acquises le plus souvent de façon statique avec des électrodes rotatives reliées à un potentiostat (Surareunchai W. et al 2001). Ce matériel est peu utilisé dans les laboratoires de chromatographie limitant ainsi les développements en matière de détection ampérométrique couplée aux techniques séparatives.

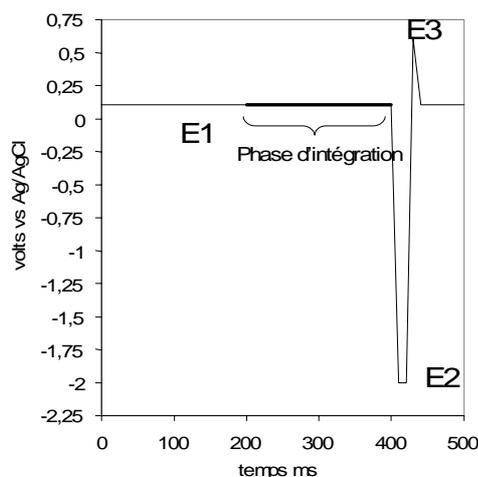


Figure 4 : Vague de potentiels appliqués en ampérométrie pulsée.

Il existe deux types de détection ampérométrique :

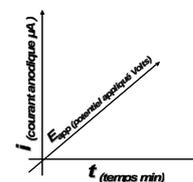
(i) L'ampérométrie à potentiel constant : après avoir déterminé le potentiel générant le courant maximal pour un composé donné, le même potentiel est appliqué entre l'électrode de référence et la contre-électrode. Cette technique est adaptée au traitement d'un faible nombre d'échantillons. En effet, après l'oxydation du composé d'intérêt, il se forme en surface de l'électrode de travail un dépôt qui nuit fortement à la détection lors de l'injection suivante (le signal ne cesse de décroître pour une même concentration jusqu'à extinction). L'électrode de travail nécessite un « resurfaçage » par polissage pour éliminer les dépôts d'oxydation afin de retrouver un signal.

(ii) L'ampérométrie pulsée qui contrairement à l'ampérométrie à potentiel constant permet une régénération en ligne de l'électrode par une vague de plusieurs potentiels (pulse). Ces potentiels sont appliqués pendant des durées variables de une à quelques centaines de millisecondes (**figure 4**). Un potentiel de mesure E1 (correspondant à un potentiel suffisant pour oxyder le composé), un potentiel E3 plus élevé atteignant la limite d'endurance de l'électrode et un potentiel très bas E2 pour réduire les espèces oxydées en surface de l'électrode. Cette dernière pourra de nouveau fournir un signal identique à celui mesuré lors de l'analyse précédente. Ces vagues de potentiels sont appliquées en continu pendant toute la durée de l'analyse. La présence de plusieurs potentiels dans la vague permet de différencier deux types de détection ampérométrique pulsée : PAD (Pulsed Amperometric Detection) pour lequel l'intégration se fait toujours au même potentiel donnant ainsi un courant très stable et l'IPAD (Integrated Pulsed Amperometric Detection) pour lequel le potentiel appliqué peut varier pendant la période d'intégration du signal pour permettre la détection simultanée de plusieurs espèces chimiques.

L'ampérométrie, en mode pulsé ou à potentiel constant requiert de réaliser un entretien périodique de l'électrode de travail. Le pulse appliqué en fin de vague n'est généralement pas suffisant pour éliminer les espèces oxydées provenant de la matrice de l'échantillon. De plus ce pulse n'est appliqué que pour une seule famille de composés. Pour obtenir des résultats reproductibles, un « resurfaçage » mécanique de l'électrode de travail avant chaque expérimentation est indispensable afin de prévenir tout phénomène d'encrassement. Le polissage de l'électrode s'effectue avec une poudre d'alumine ou de diamant de granulométrie faible (environ $0,05\mu\text{m}$). Cette opération n'est cependant pas sans influence sur la détection et

il faut attendre parfois un délai de quelques heures avant d'avoir une réponse stable pour une quantification de qualité (Inoue A et *al.* 1998). Afin de conserver une bonne reproductibilité entre les séries d'analyses, l'utilisation d'électrodes à durée de vie limitée dites jetables et non reconditionnables par polissage peut être envisagée. Ces électrodes sont alors changées après chaque série d'injections. Mais ceci augmente notablement les coûts de fonctionnement.

2. L'ampérométrie 3D avec le logiciel ChromeleonTM



Cette fonctionnalité présente dans les dernières versions du logiciel Chroméléon (Dionex, Voisins-le-Bretonneux, France) équipant le système de chromatographie ionique ICS 3000 permet la mesure du courant généré (i) par l'oxydation d'un composé en fonction du potentiel appliqué (E_{app}) et également en fonction du temps de rétention (t). Afin d'illustrer la partie programmation, retraitement et utilisation des données acquises en ampérométrie 3D, notre exemple porte sur les oses simples dont la détection s'effectue couramment en ampérométrie pulsée. Ces sucres sont séparés en milieu basique (NaOH 75 mM) en mode isocratique (1 ml/min) sur une colonne polymérique échangeuse d'anions thermostatée à 30°C (Dionex CarboPac PA100, 250 x 4mm).

2.1. Acquisitions des données

L'ampérométrie 3D doit débiter par une phase de programmation d'une rampe croissante de potentiels. Cette programmation se fait dans la fenêtre relative au détecteur électrochimique. Il faut cocher le canal « 3D amp » et double-cliquer sur la case « waveform » pour afficher le « waveform editor » (**figure 5**). En milieu basique, la gamme des valeurs de potentiels de travail est comprise entre -1,25 et +0,75 V sur une électrode d'or avec une électrode de référence Ag/AgCl. Après cette rampe, comme pour l'ampérométrie pulsée, on applique des potentiels de nettoyage. La durée totale de la vague doit être comprise entre 0,5 et 2 secondes. Pour chaque potentiel programmé (ici de -1 à 0,5 V), on obtient un chromatogramme ($i = f(E_{app})$). C'est l'ensemble de ces chromatogrammes qui permet d'obtenir l'image en trois dimensions.

2.2. Retraitement des données

L'acquisition des données nécessaires à l'ampérométrie 3D se fait automatiquement durant le « run » en fonction des critères renseignés dans le programme. Une fois le « run » terminé, le chromatogramme est affiché et l'icône « 3D amperometry » sélectionnée (**figure 6**) ; dans l'exemple proposé, l'échantillon analysé est une solution de glucose à 10 mg.l⁻¹ et le volume injecté est de 10 µl.

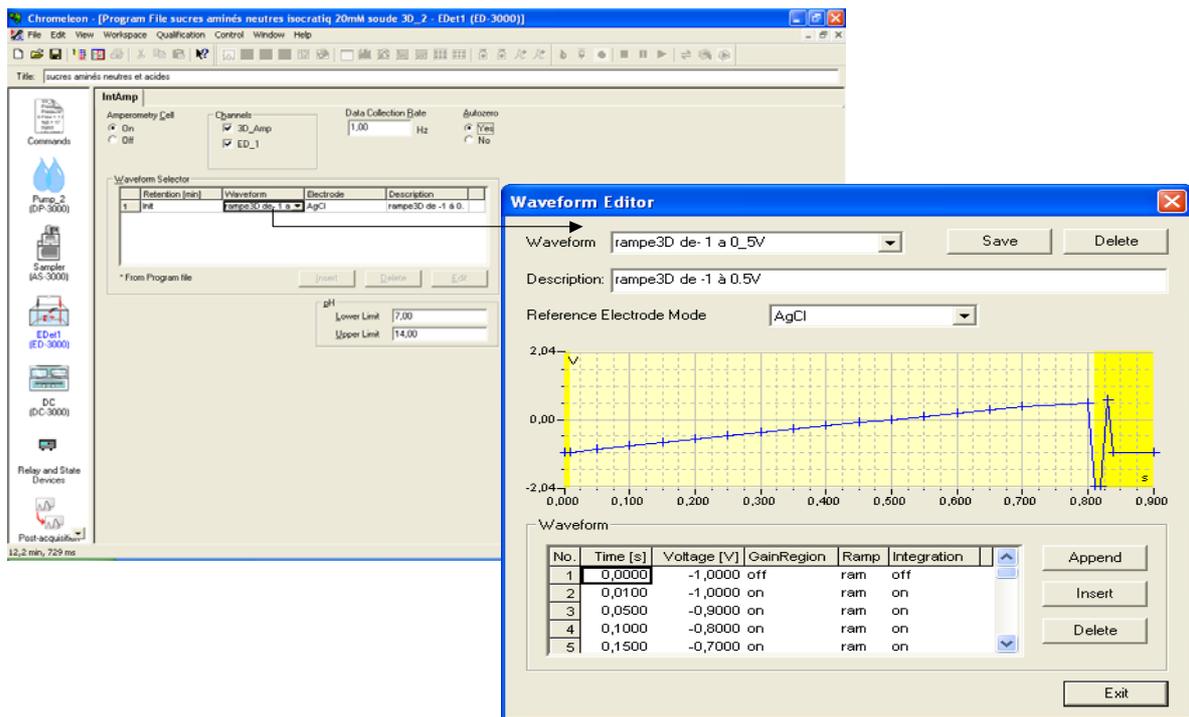


Figure 5 : Programmation de la vague de potentiels dans le « Waveform Editor » sa visualisation et sa sauvegarde.

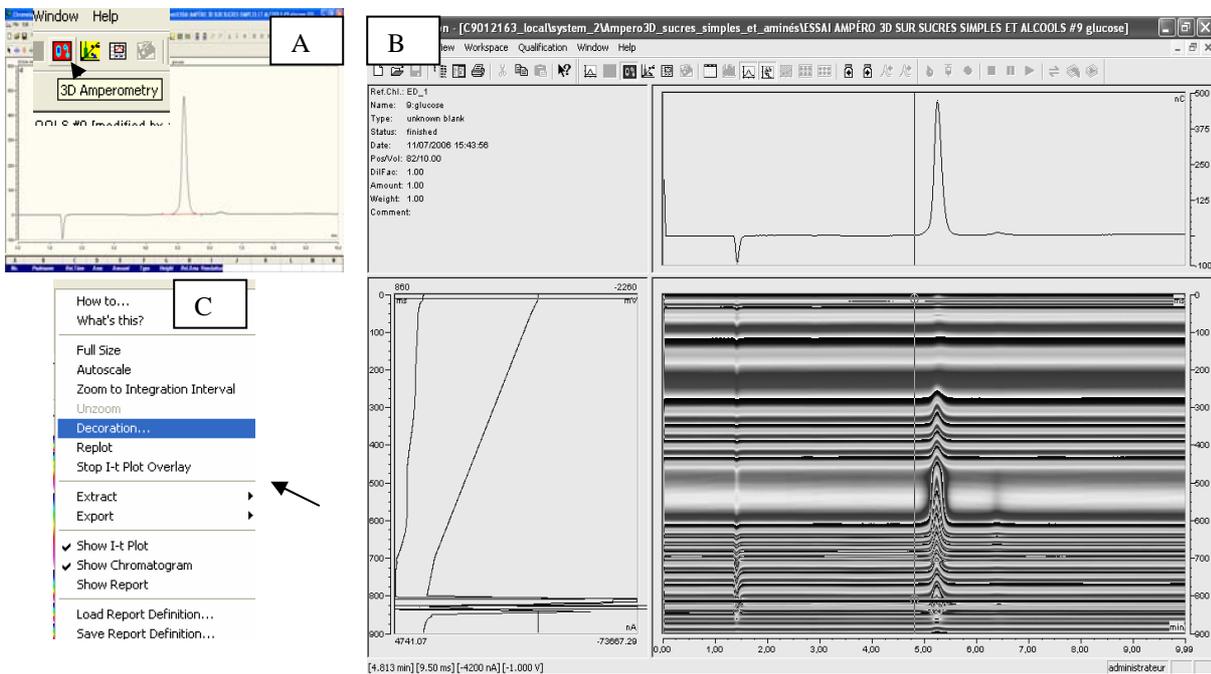


Figure 6 : A : icône pour accéder à la fenêtre «3D Amperometry »
 B : fenêtre «3D Amperometry »
 C : menu déroulant et choix à effectuer avant une nouvelle opération

L'ouverture de la fenêtre de travail permet d'afficher 3 graphiques. Le graphique supérieur représente la valeur résultante des courants mesurés pendant la période d'intégration définie

dans la rampe en fonction du temps de rétention. C'est le chromatogramme classique obtenu en PAD ou IPAD. En bas à gauche, figure la courbe intensité / potentiel $i = f(t)$ où le temps t (en ms) correspond au potentiel décrit dans le « Waveform Editor ». Le troisième graphique représente le courant mesuré (échelle de couleurs) en fonction du temps de rétention (axe des abscisses) et du potentiel (de 0 à 900 ms correspondant aux potentiels de la rampe programmée). Ce dernier graphique représente les données brutes. Il faut à présent retravailler ces données pour les exploiter. Un clic sur le bouton droit de la souris permet d'accéder au menu. En cliquant sur « Decoration », on accède à la fenêtre « 3D Amperometry Decoration » (**figure 7**) dans laquelle divers choix doivent être faits pour optimiser l'affichage et le calcul. Dans l'onglet « General », on élimine les valeurs acquises lors de la phase de reconditionnement de l'électrode c'est-à-dire au delà de 800 ms. Le bruit de fond est soustrait en cochant « Baseline correction ». L'onglet « Iso/3D Plot » permet de choisir entre les représentations 2D ou 3D. L'onglet « Chromatogram Plot » concerne le chromatogramme représenté au dessus des données 3D. Deux options s'offrent à l'utilisateur, l'affichage du courant en fonction d'un seul et unique potentiel ou la résultante des valeurs de courant mesurées pendant une période à définir. Cette intégration peut être faite sur des potentiels différents (principe de l'IPAD). Les valeurs définies dans ces différentes fenêtres sont modulables en utilisant les barres verticales (choix de la courbe $i = f(t)$) et horizontales (choix du potentiel appliqué ou durée de la période d'intégration) présentes sur le graphique.

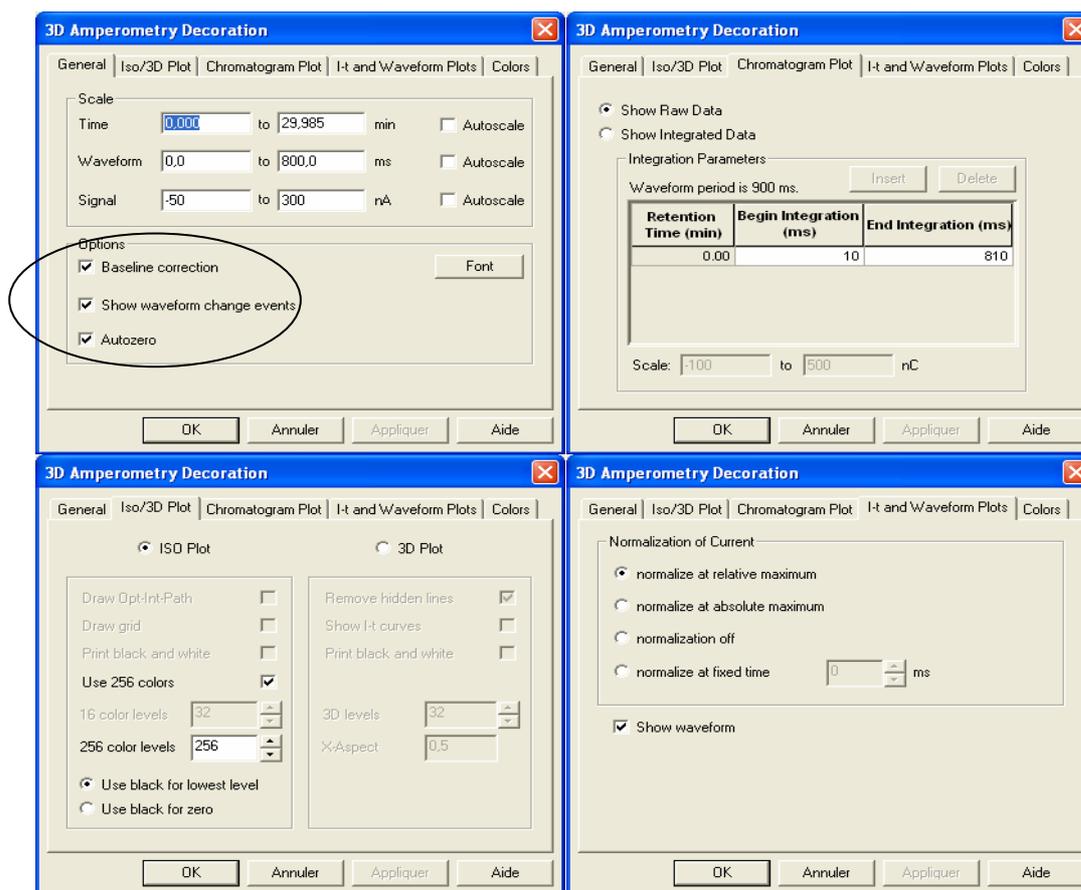


Figure 7 : Fenêtre « 3D Amperometry Decoration » avec le détail de chaque onglet.

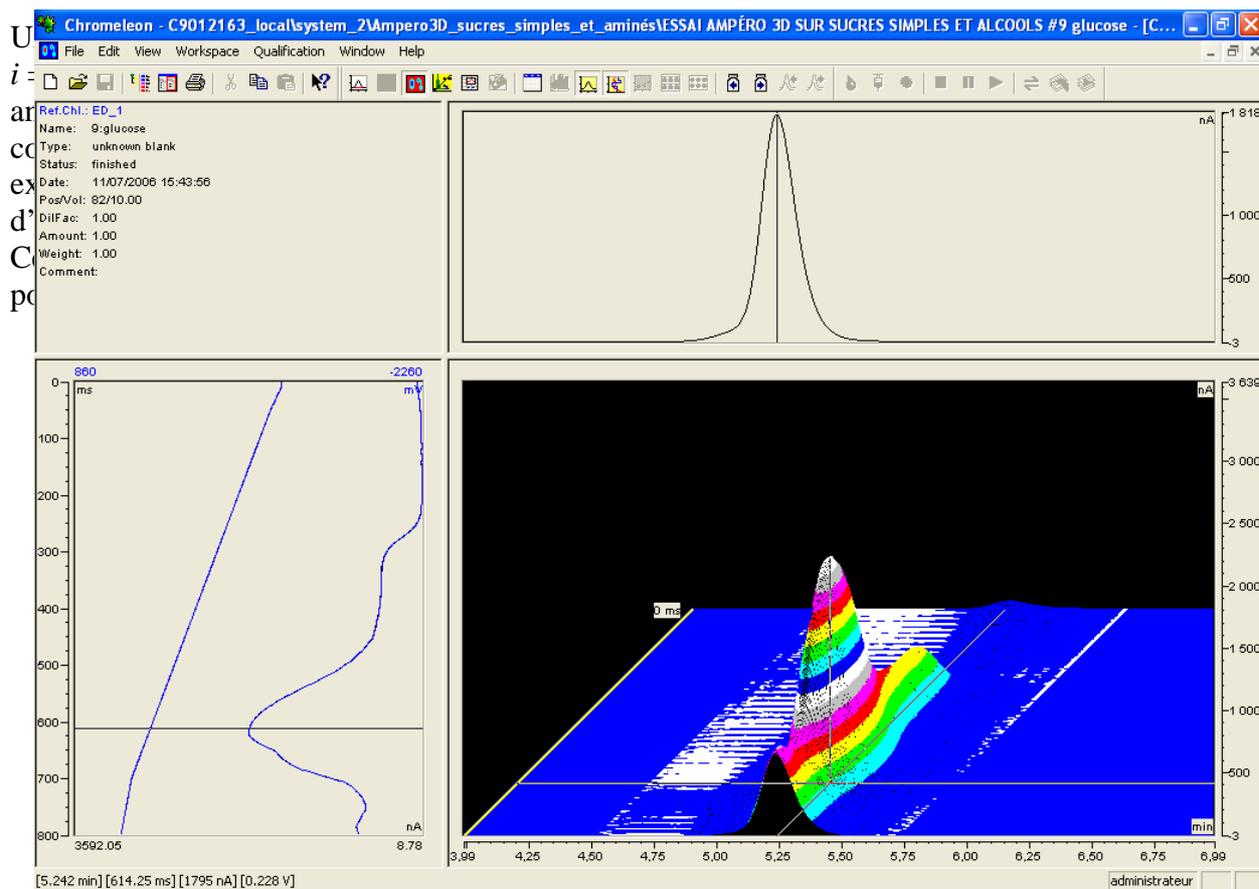


Figure 8 : Fenêtre « 3D Amperometry » après le changement des paramètres dans le menu « 3D Amperometry.Decoration) » : visualisation de la courbe intensité/potentiel et du chromatogramme en trois dimensions (t , E_{app} et i).

3. Application à la détection des sucres simples et aminés

La courbe intensité/potentiel d'une molécule représente en quelque sorte sa signature électrochimique à l'image de son spectre d'absorption UV. Sur cette courbe, on détermine les potentiels pour lesquels le courant généré sera maximal : E_{max} . En pratique, la courbe d'oxydation $i = f(t)$ est tracée pour chaque composé (**figure 9**), glucose, glucosamine et N-acétyl-glucosamine. En analysant ces courbes on peut noter très rapidement que le courant maximal est généré à 600 ms par un potentiel optimal appliqué de 200 mV (E_{max}) pour chacun des composés. Ces courbes mettent en évidence que les sucres ne réagissent pas tous de la même façon face à l'oxydation. A -600 mV seule la glucosamine génère un courant anodique permettant sa détection sélective. Le seuil de détection est un peu plus élevé que si la détection est effectuée à un potentiel de $+200$ mV et le rapport signal sur bruit sera divisé par un facteur 100. En choisissant judicieusement la valeur du potentiel appliqué dans la cellule de détection on peut activer ou désactiver la détection de certains composés sur un chromatogramme comme on peut le faire en choisissant la longueur d'onde avec un détecteur UV. La détection pour chacun des composés est optimale vers 200 mV mais il faut cependant tenir compte d'un paramètre important : la dégradation de l'électrode de travail. Si la limite de détection la plus basse possible est le critère principal de l'analyse alors le choix se portera sur E_{max} soit 200mV. Si la répétabilité sur une longue série d'échantillons et la durée de vie de

l'électrode sont les critères principaux alors il faut éviter de « forcer » l'oxydation. Dans le cas présent, une oxydation à +100 mV induit un niveau de réponse élevé tout en préservant l'électrode. Après la valeur du potentiel, le second paramètre important est la durée d'intégration ($\phi 2$) (**figure 10**). Elle doit débuter après une phase de stabilisation du courant ($\phi 1$) qui est variable et fonction du potentiel choisi. Durant la phase d'intégration, le logiciel calcule la somme des courants mesurés à chaque seconde. Plus la durée d'intégration est longue et plus le courant total mesuré est de ce fait important. Cependant une vague complète de potentiels nécessite une durée de 500 ms et 2 s.

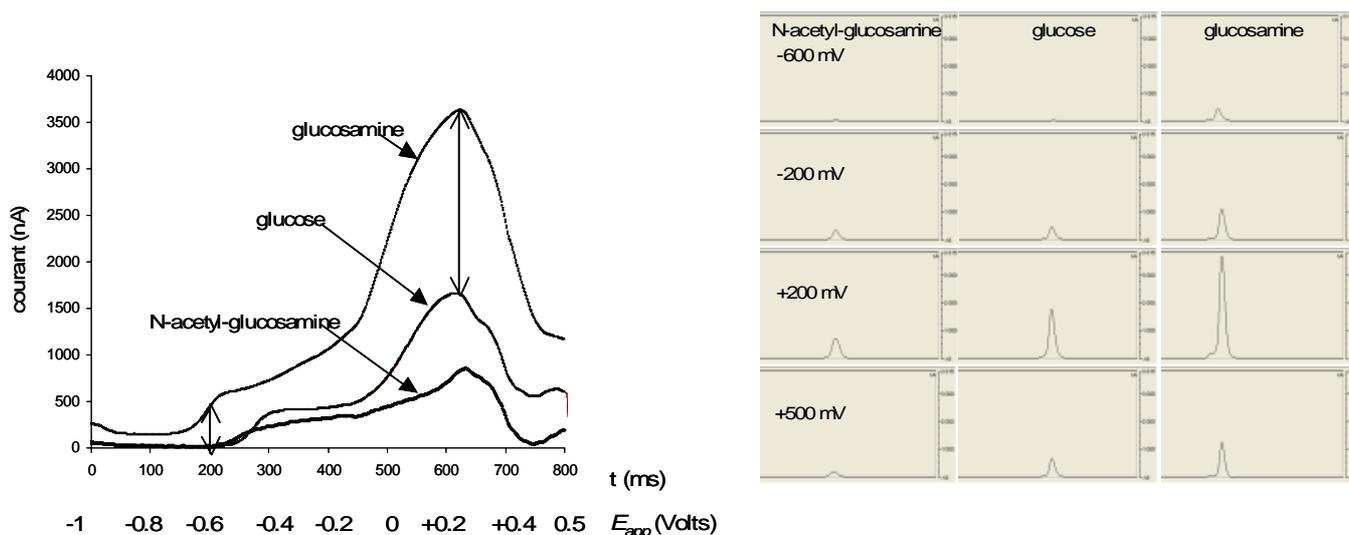


Figure 9 : Courbes d'oxydation du glucose (50 mg.L^{-1}) de la glucosamine (50 mg.L^{-1}) et de la N-acetylglucosamine (50 mg.L^{-1}) (toutes ces données sont générées lors d'une acquisition en ampérométrie 3D et chromatogrammes à différents potentiels).

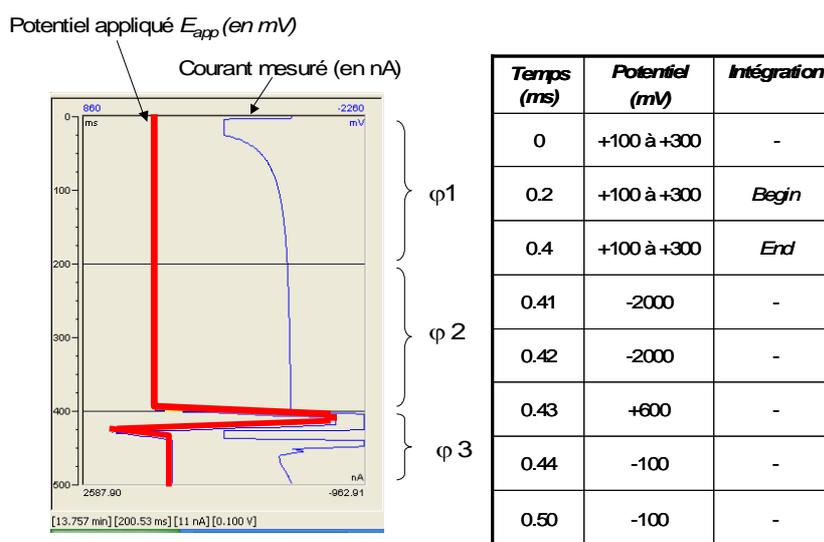


Figure 10 : Vague de potentiels appliqués et courant mesuré pendant la détection des sucres.

La phase ϕ_3 de reconditionnement de l'électrode comprend deux étapes de réduction à -2 V et -100 mV entrecoupées par une oxydation à 600 mV permettant la formation d'une pellicule d'oxyde d'or nécessaire à la détection (Roclin RD et *al* 1998). L'oxydation pour reformer l'oxyde d'or en surface de l'électrode peut se faire à des potentiels plus élevés (750 mV) mais avec des risques de détérioration rapide de l'électrode de travail.

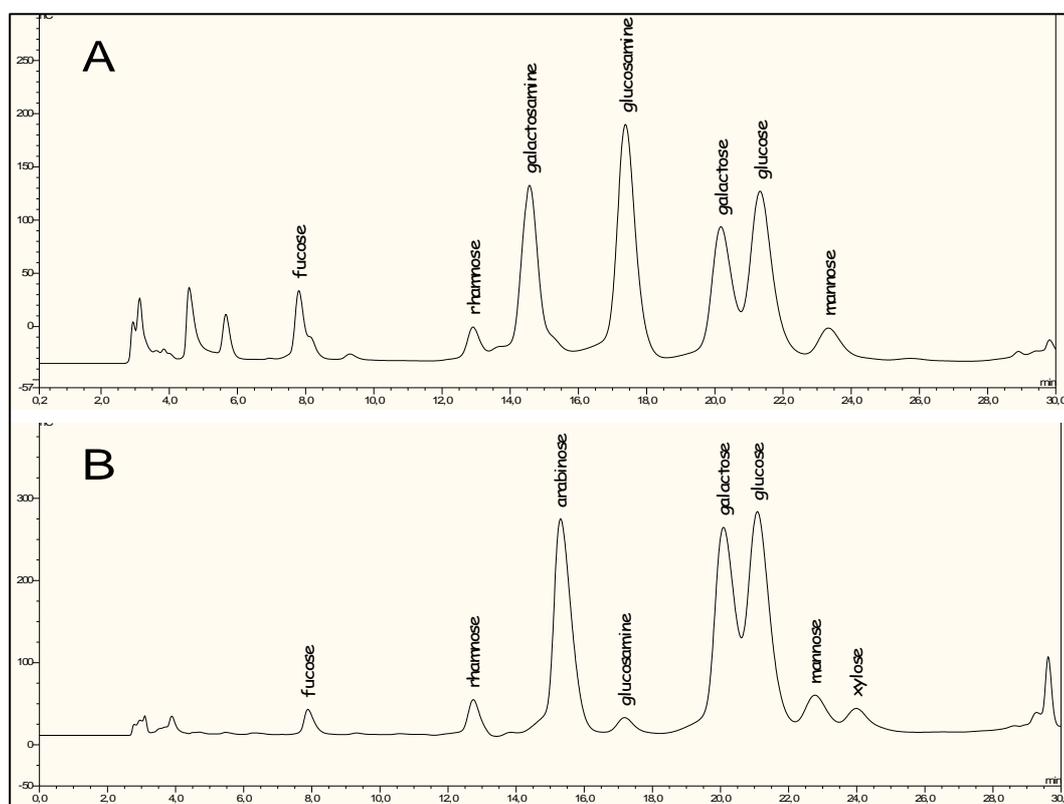


Figure 11 : Chromatogrammes obtenus par HPAE-PAD
 (Colonne Carbopac PA100 thermostatée à 30°C , $1\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, NaOH 20 nM , électrode Au)
 A : composition de la fraction glycosidique d'une matrice calcifiante de brachiopode
 B : composition des polysaccharides pariétaux de graines de moutarde brune

L'ampérométrie 3D permet donc de déterminer le potentiel commun pour lequel deux molécules séparées peuvent être oxydées donc détectées. La **figure 11** représente deux applications de l'utilisation d'une vague de potentiels adaptée à la détection simultanée des sucres simples et aminés (intégration réalisée à 100 mV). La très grande spécificité de la détection électrochimique permet la détection et la quantification des sucres dans des matrices complexes d'origines animale ou végétale.

4. Conclusion

L'ampérométrie en trois dimensions (t , i , E_{app}) est une avancée technique qui permet au chromatographe de mieux s'approprier la détection électrochimique. Même si le retraitement des données est un peu long, cette méthode donne, entre autres, une connaissance plus approfondie du comportement des molécules à analyser vis-à-vis de l'électrooxydation. Ceci facilite l'optimisation de la détection des composés d'intérêt et par voie de conséquence l'interprétation des résultats.

Bibliographie

- Cao X.N., Li J.H., Xu H.H., Lin L., Xian Y.Z., Yamamoto K., Jin L.T. (2004) Platinum particles-modified electrode for HPLC with pulsed amperometric detection of thiols in rat striatum. *Biomedical Chromatography*. ;**18**(8):564-69.
- Ferreres F, Sousa C, Justin M, Valentao P, Andrade P.B, Llorach R, Rodrigues A, Seabra R.M, Leitao A. (2005) Characterisation of the phenolic profile of *Boerhaavia diffusa* L. by HPLC-PAD-MS/MS as a tool for quality control. *Phytochemical Analysis*., **16**(6):451-8
- Marin F, Amons R, Guichard N, Stigter M, Hecker A, Luquet G, Layrolle P, Alcaraz G, Riondet C and Westbroek P (2005) Caspartin and calprismin, two proteins of the shell calcitic prisms of the Mediterranean fan mussel *Pinna nobilis* *Journal of Biological Chemistry*., **280**(40) : 33895-908
- Cataldi T.R, Nardiello D (2003) Determination of free proline and monosaccharides in wine samples by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**(13):3737-42
- consulter le site : <http://fr.answers.com/topic/ampérométrie>
- Ernst S, Heitbaum J, Hamann C.H. (1979) The electrooxidation of glucose in phosphate buffer solutions: Part I. Reactivity and kinetics below 350 mV/RHE *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **100**: 173-83
- Tominaga M., Shimazoe T., Nagashima M. and Tanigushi I. (2005) *Electrochemistry Communications*, **7** (2) 189-93
- Surareungchai W., Deepunya W., and Tasakorn P. (2001) Quadruple-pulsed amperometric detection for simultaneous flow injection determination of glucose and fructose *Analytica Chimica*, **448** : 215-20
- Inoue A., Earley R.L., Lehmann M.W. and Welch L.E. (1998) A consideration of electrode polishing prior to application of pulsed amperometric detection *Talanta* **46** : 1507-14
- Rocklin R.D., Clarke A.P., and Weitzhandler M. (1998) Improved Long-Term Reproducibility for Pulsed Amperometric Detection of Carbohydrates via a New Quadruple-Potential Waveform *Analytical Chemistry*, **70** : 1496-501

