

E-III-3.1 V1 – DOSAGE DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES (HAP) PAR HPLC DANS LES EAUX

1. Objet

Cette procédure a pour objet de décrire la méthode de dosage des 16 hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) par chromatographie liquide haute performance (HPLC) de tout échantillon d'eau.

2. Domaine d'application

Tout échantillon d'eau (eaux potables, eaux souterraines, eaux de surface, eaux de rejet et lixiviats).

La technique de chromatographie liquide haute performance (HPLC) après extraction liquide-liquide permet de doser avec un détecteur à fluorescence les 15 HAP repris ci-dessous à des concentrations supérieures à 5 ou 10 ng/l par composé individuel et de doser l'acénaphthylène à une concentration supérieure à 30 ng/l avec un détecteur à barrette de diodes (DAD).

Les 15 HAP sont les suivants : naphthalène, acénaphthène, fluorène, phénanthrène, anthracène, fluoranthène, pyrène, benzo(a)anthracène, chrysène, benzo(b)fluoranthène, benzo(k)fluoranthène, benzo(a)pyrène, dibenzo(ah)anthracène, benzo(ghi)pérylène et indéno(1,2,3-cd)pyrène

3. Principe

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont extraits de l'échantillon à analyser par du cyclohexane (ou hexane). L'extrait est concentré par évaporation et le résidu est repris dans un solvant approprié pour l'analyse HPLC.

Si nécessaire, les extraits des eaux très contaminées sont purifiés avant analyse.

Les HAP sont séparés par HPLC et détectés par un détecteur fluorimétrique à longueurs d'onde d'excitation et d'émission variables pour les 15 HAP et par un détecteur à barrette de diodes DAD pour l'acénaphthylène.

La quantification des HAP est réalisée par la méthode de l'étalonnage externe.

4. Conditionnement et conservation de l'échantillon

Les échantillons doivent être prélevés dans des bouteilles en verre brun d'un litre (ne pas utiliser de matières plastiques). Ils sont conservés à 4 °C et à l'obscurité et subissent une phase d'extraction dès que possible après le prélèvement afin d'éviter les pertes dues à l'adsorption (de préférence dans les 24 heures et au maximum dans les 4 jours).



5. Appareillages et matériels utilisés

5.1. Chromatographe en phase liquide à haute performance, équipé d'un détecteur fluorimétrique à longueurs d'onde d'excitation et d'émission variables (capable de programmer au moins 6 paires de longueurs d'onde) et d'un détecteur à barrette de diodes (DAD). Le dégazage de la phase mobile (élimination de l'oxygène résiduel) est nécessaire (ex. : avec l'hélium ou sous vide).

Ce système comprend également :

- des pompes analytiques, permettant de réaliser un gradient d'éluion binaire;
- un thermostat de colonne, capable de maintenir une température constante dans un intervalle de ± 0.5 °C;
- un système de traitement des données.

5.2. Colonne de séparation avec une colonne de garde, remplie de phase C18 spécifique pour l'analyse des HAP, comme par exemple la colonne Chromspher PAH - 5 μm - 250 x 4,6 mm i.d.

5.3. Agitateur magnétique avec barreau magnétique recouvert de PTFE (téflon) d'environ 6 cm de long

5.4. Concentrateur à l'azote, type Turbovap et tubes de 200 ml avec senseur de 0,5 ml ou concentrateur de type Kuderna-Danish

5.5. Trébuchet de précision 0.1 à 1 g

5.6. Balance analytique de précision 1 mg

5.7. Micropipettes automatiques de différents volumes ou de volume variable

5.8. Matériel et verrerie

- Erlenmeyer de 2 ou 3 l.
- Ampoule à décanter de 2 l munie d'un robinet en Téflon.
- Pipettes Pasteur de 25 et 15 cm de long.
- Fiole de 1.5ml de préférence silylée avec septum pré-fendu
- Filtre pour analyse quantitative en fibre de verre
- Entonnoir.
- Laine de verre préalablement lavée au dichlorométhane puis séchée.
- Jauges de différents volumes
- Colonne de purification en verre de 30 cm de long et de 1 cm de diamètre et robinet en Téflon.

Utilisation exclusive d'un matériel en verre nettoyé au détergent (de nature plutôt minérale), rincé à l'eau courante puis à l'eau désionisée, séché puis rincé avec le solvant d'extraction avant son utilisation ou passé au four à 450 °C (à l'exception de la verrerie volumétrique).

6. Réactifs et étalons

Les réactifs et substances chimiques respectant les exigences liées à l'analyse par HPLC, à la détection par fluorescence et par DAD et ne contenant pas de HAP conviennent pour la préparation des échantillons.

La vérification de pureté des nouveaux lots est faite par l'intermédiaire des essais à blanc.

6.1. Eau pour HPLC préparée fraîchement à partir d'une installation d'eau ultrapure

6.2. Cyclohexane ou hexane pour analyse de résidus organiques ou équivalent

6.3. Acétonitrile pour HPLC de fluorescence aussi faible que possible

6.4. Sulfate de sodium anhydre pour analyse chauffé à 600 °C pendant 6 heures

6.5. Azote de pureté 4.8 ou plus

6.6. Oxyde d'alumine basique de granulométrie $\pm 100 \mu\text{m}$

Activation et désactivation de l'alumine

Chauffer l'alumine basique pendant huit heures à 150 °C. Laisser refroidir dans un dessiccateur.

Peser 11 g d'eau désionisée pour 89 g d'alumine activée. Agiter jusqu'à dispersion de tous les agrégats en flacon hermétique et laisser reposer l'alumine ainsi désactivée au moins 16 heures avant l'emploi. Utiliser pendant maximum 15 jours.

6.7. Mélanges étalons

Il est recommandé d'utiliser des solutions étalons du commerce à moins que le laboratoire ne possède une grande expérience de la manipulation des substances dangereuses.

6.7.1. Solution mère

Solution commerciale de concentration de 10 mg/l par constituant dans l'acétonitrile et/ou solution de référence certifiée NIST1647« Priority Pollutant Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Acetonitril » de concentrations variables suivant les constituants (de 4 mg/l à 20 mg/l). Cette solution certifiée peut servir de solution - mère pour réaliser les solutions d'étalonnage ou uniquement pour vérifier la solution commerciale.

Après ouverture de l'ampoule, la solution est stockée dans un flacon hermétique dans le frigo. Avant chaque utilisation, le flacon est pesé pour contrôler les pertes éventuelles de solvant. La dernière pesée du flacon est comparée à la nouvelle pesée avant prélèvement pour la réalisation des solutions filles.

6.7.2. Solution fille

Préparer une solution fille à 1000 µg/l (ou de 400 à 2000 µg/l si utilisation du NIST) en diluant 10 fois la solution-mère (6.7.1) dans l'acétonitrile.

6.7.3. Solutions d'étalonnage

Préparer un minimum de 6 solutions étalons par dilution appropriée de la solution fille (6.7.2) dans l'acétonitrile à l'aide de micropipettes et de ballons jaugés (par exemple : 200, 100, 50, 25, 12.5, et 5 µg/l).

6.7.4 Solution étalon commerciale de concentration 10 mg /l dans le cyclohexane ou l'hexane pour tester la purification sur alumine

7. Mode opératoire

7.1. **Extraction**

Remarque : Les HAP étant sensibles à la lumière, il est conseillé d'éviter de travailler à la lumière vive.

Peser un erlenmeyer au trébuchet.

Verser l'échantillon dans l'erlenmeyer et repeser celui-ci.

Rincer la bouteille avec 50 ml de cyclohexane ou d'hexane et transvaser dans l'erlenmeyer. Ajouter un barreau magnétique.

Agiter sur plaque magnétique de façon à avoir une bonne dispersion du solvant dans l'échantillon. Agiter pendant 1 heure.

Transvaser l'eau et l'extrait dans une ampoule à décanter de 2 l et laisser décanter. Evacuer l'échantillon.

Filtrer la phase organique sur du sulfate de sodium anhydre et récupérer dans un tube de réduction en vue de sa concentration à l'azote. Rincer l'ampoule avec quelques millilitres de solvant.

Rincer le sulfate avec quelques millilitres de solvant.

Evaporer l'extrait obtenu de moitié sous courant d'azote à une température de 40 °C .Rincer les parois du tube et continuer à évaporer jusqu'à 0.5 ml puis rincer le col à la pipette Pasteur. Evaporer jusqu'à 0.5 ml.

S'il s'agit d'eaux potables, d'eaux souterraines et d'eaux de surface peu polluées, passer au point 7.3

S'il s'agit d'eaux de rejet ou d'eaux de surface particulièrement polluées, passer au point 7.2.

7.2. Purification

Faire glisser un petit tampon de laine de verre jusqu'à l'extrémité de la colonne de purification.

Remplir la colonne de purification avec 5 g d'alumine désactivée en tapotant légèrement puis avec 1 cm de sulfate de sodium anhydre. Rincer la colonne avec environ 10 ml de cyclohexane (1 à 2 fois le volume d'alumine).

Lorsque le ménisque du solvant affleure la surface du sulfate de sodium, ajouter l'extrait à la pipette Pasteur.

Rincer le tube ayant contenu l'extrait et transférer sur la colonne. Eluer avec 40 ml de cyclohexane.

Concentrer sous azote l'extrait purifié jusqu'à 0.5 ml.

7.3. Concentration

Reprendre par environ 25 ml d'acétonitrile (rincer le tube). Continuer à concentrer jusqu'à disparition du cyclohexane ou de l'hexane et obtention d'un volume de 0.5 ml. Transvaser dans la fiole de 1.5 ml préalablement tarée et rincer le tube avec une petite quantité d'acétonitrile. Peser la fiole contenant l'extrait. Déterminer le volume exact grâce à la pesée et à la masse volumique du solvant.

Ne pas évaporer les extraits à sec car des pertes de naphthalène, acénaphthylène, acénaphthène et fluorène peuvent se produire.

7.4. Analyse par chromatographie (HPLC)

Les paramètres suivants se sont révélés satisfaisants pour l'analyse des eaux :

Colonne Chromspher PAH, 5 μ , 25 cm x 4,6 mm I.D.

Phase mobile : acétonitrile/eau :

- 50/50 ----- 100/0 en 20 minutes
- 100/0 pendant 10 minutes

Volume injecté : 20 μ l

Débit : 1,5 ml/min

Température de la colonne : 20 \pm 0.5 °C

Pour le détecteur à fluorescence, les 2 propositions possibles de programmation de longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont reprises dans le tableau 1 ci-dessous :

Composé		ISSEP		Norme ISO	
		Longueur d'onde (nm)		Longueur d'onde (nm)	
		Excitation	Emission	Excitation	Emission
1	Naphtalène				
2	Acénaphène			275	350
3	Fluorène	260	330		
4	Phénanthrène	250	374		
5	Anthracène	250	400	260	420
6	Fluoranthène			270	440
7	Pyrène	270	400		
8	Benzo(a)anthracène			260	420
9	Chrysène				
10	Benzo(b)fluoranthène				
11	Benzo(k)fluoranthène				
12	Benzo(a)pyrène	290	430	290	430
13	Dibenzo(ah)anthracène				
14	Benzo(ghi)pérylène				
15	Indéno(1,2,3-cd)pyrène	305	500	305	500

Il convient d'éviter toute perturbation de la ligne de base durant la programmation des longueurs d'onde. Les modifications de longueurs d'onde ne peuvent être réalisées que si la résolution entre pics est d'au moins 2.5.

Les chromatogrammes d'une solution étalon (15 HAP) et d'un extrait d'échantillon sont présentés en annexe 1.

Pour le détecteur à barrette de diodes (DAD) placé en série, la quantification de l'acénaphthylène peut être réalisée à 229 nm. La confirmation de l'identité et de la pureté du pic est réalisée par comparaison du spectre UV avec celui des étalons.

Le chromatogramme ainsi que la comparaison avec le spectre de référence sont repris en annexe 2.

7.5. Étalonnage

L'étalonnage se fait par la méthode des standards externes.

La gamme de travail et la linéarité de la fonction d'étalonnage est déterminée en injectant au moins 6 solutions étalons (6.7.3).

Cet étalonnage sera répété avant chaque série d'échantillons.

8. Paramètres qualités

8.1. Contrôle

Avant de procéder à l'étalonnage et aux analyses des échantillons, le bon fonctionnement de l'appareil est vérifié en injectant 1 ou 2 fois, si nécessaire, une des solutions étalons (6.7.3).

Un contrôle de la réponse du système chromatographique est réalisé toutes les 10 injections avec la solution étalon de milieu de gamme. Les résultats individuels ne doivent pas s'écarter de plus de 15 % des concentrations théoriques.

8.2. Essai à blanc

Effectuer parallèlement à la détermination un essai à blanc dans les mêmes conditions où l'échantillon est remplacé par 1 l d'eau ultrapure.

En cas de réponse des HAP les plus volatils, effectuer des cartes de contrôle.

8.3. Essai « rendement »

Effectuer parallèlement à la détermination, un essai « rendement » dans les mêmes conditions où l'échantillon est remplacé par un volume identique (1 l) d'eau ultrapure dopé avec 50 µl de la solution fille 6.7.2.

Effectuer des cartes de contrôle avec les rendements effectués avant chaque série d'échantillon pour 3 HAP dont le naphthalène et le benzo(a)pyrène.

Si les rendements observés sont supérieurs à 95 %, il n'est pas nécessaire d'utiliser un facteur de correction pour le rendement.

8.4. Essai « test alumine » (si purification)

Effectuer parallèlement à la purification un "test alumine" où l'échantillon est remplacé par 100 µl de la solution 6.7.4 diluée 20 x (500 µg/l).

Le pourcentage de récupération de chaque PAH doit se situer entre 85 et 115 %.

9. Calcul des résultats

A partir du chromatogramme obtenu, les HAP sont identifiés automatiquement à l'aide des temps de rétention des pics correspondants aux solutions d'étalonnage (tolérance sur le temps de rétention : 0.15 min).

Un contrôle manuel des intégrations est également effectué en finale.

Les concentrations des différents HAP dans l'extrait sont calculées par le logiciel en µg/l sur la base de la courbe d'étalonnage à 6 points réalisées pour chaque série d'échantillons à analyser.

Si la concentration d'un composé dans un échantillon dépasse la gamme d'étalonnage, diluer l'échantillon pour essai et répéter l'analyse.

Calculer la concentration C_i en $\mu\text{g/l}$ du composé i à analyser dans l'échantillon d'eau à l'aide de l'équation suivante :

$$C_i = \frac{(C_e * V_e * d)}{V_t * r}$$

C_e : concentration du composé i dans l'extrait ($\mu\text{g/l}$)

V_e : volume final de l'extrait (ml)

V_t : volume d'échantillon d'eau analysé (ml)

d : dilution éventuelle

r : rendement (0 à 1)

10. Rapport d'essai

Le rapport doit contenir au minimum :

- une référence à la présente méthode de la Région wallonne;
- l'identification complète de l'échantillon;
- les détails opératoires non prévus dans la méthode, ainsi que tout facteur ayant pu affecter les résultats.

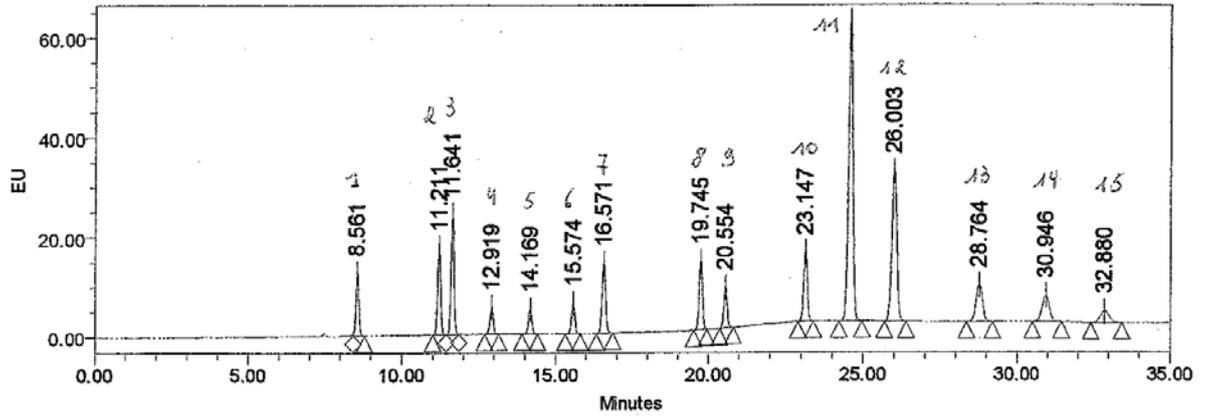
11. Références

NBN EN ISO 17993 :2002 Qualité de l'eau – détermination des 15 hydrocarbures aromatiques polycycliques (PAH) dans l'eau par HPLC avec détection par fluorescence après extraction liquide-liquide.

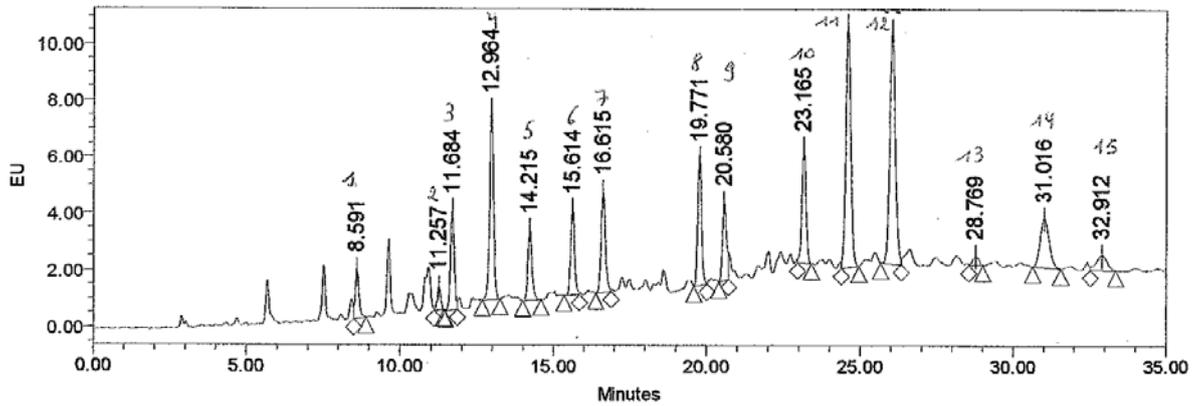
NBN EN ISO 5667-3 :2013 Qualité de l'eau – Échantillonnage – Partie 3 : Lignes directrices pour la conservation et la manipulation des échantillons d'eau.

Annexe 1

Chromatogramme - détection par fluorescence - étalon NIST 1647^e



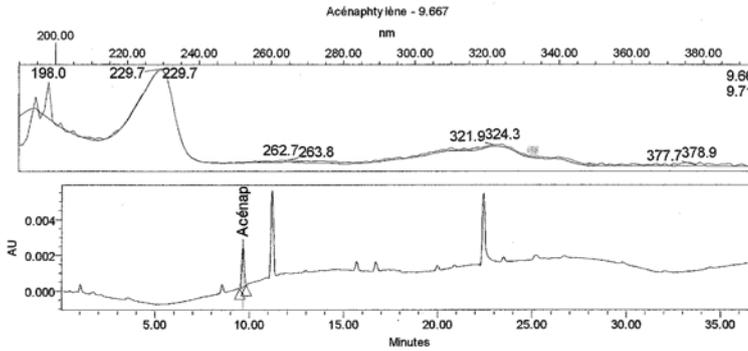
Chromatogramme - détection par fluorescence - extrait d'une eau



La numérotation des pics et leur intitulé sont repris dans le tableau 1

Annexe 2

Chromatogramme - détection DAD - étalon NIST 1647e - acénaphthylène



ORIGINAL 2014

