

E-II-9V1 - DÉTERMINATION DES ORTHOPHOSPHATES PAR SPECTROPHOTOMETRIE

1. Objet

La présente méthode de référence spécifie 3 méthodes de détermination des orthophosphates avec détection spectrophotométrique. La méthode d'analyse pouvant être : l'analyse en flux, l'analyse séquentielle ou l'utilisation de kits (tests en cuvette)

2. Domaine d'application

En ce qui concerne l'analyse en flux et l'analyse séquentielle, la méthode s'applique à tous types d'eau (eau souterraine, eau potable, eau de surface et eaux usées), pour des concentrations en masse allant de 0.050 mg/l à 0.5 mg/l, pour des échantillons non dilués.

En ce qui les kits prêts à l'emploi, il en existe pour différentes gammes de concentration. Leur limite de quantification est cependant supérieure à celle des 2 autres méthodes (0.15 mg/l pour les kits Hach Lange).

3. Principe

Les phosphates réagissent avec le molybdate d'ammonium. L'acide molybdophosphorique qui en résulte est ensuite réduit par l'acide ascorbique en bleu de molybdène. Cette réaction est catalysée par le tartrate d'oxyde d'antimoine potassique. L'absorbance du colorant bleu formé est mesurée à 880 nm.

4. Interférences

L'arséniate produit une couleur similaire à celle des orthophosphates. Cette interférence peut être éliminée en réduisant l'arséniate en arsénite. De concentrations élevées en silicate (> 5 mg/l), sulfure (> 2 mg/l), nitrite (> 3 mg/l), chrome, fer et cuivre (> 10 mg/l) peuvent aussi interférer. Si la présence d'un de ces interférents est suspectée dans l'échantillon, il faudra en évaluer l'impact avant l'analyse.

5. Conditionnement et conservation de l'échantillon

Prélever les échantillons dans des bouteilles en verre. Pour conserver l'échantillon, ajouter 6 ml de chloroforme par litre d'échantillon et stocker à l'obscurité entre 2 et 5°C. L'analyse doit s'effectuer dans les 7 jours.



6. Appareillages et matériels utilisés

Méthode d'analyse en flux

6.1. **Dispositif d'analyse avec injection de flux (FIA)**, comprenant généralement les composants suivants :

- Réservoirs à réactifs
- Pompe à faible pulsation
- Si nécessaire, tubes de pompage appropriés
- Injecteur d'échantillon de volume d'injection de 10 à 300 μ l
- Tubes de circulation et bobines de mélange de 0,5 à 0,8 mm de diamètre intérieur, avec des raccords de tubes et pièces en T en matière plastique chimiquement inerte
- Si nécessaire, cellule de dialyse avec, par exemple, une membrane à cellulose afin de prédiluer l'échantillon ou d'éliminer les composés interférents
- Détecteur photométrique à flux
- Unité enregistreuse (par exemple traceur, intégrateur ou imprimante). Généralement, les signaux de hauteur de pic sont évalués
- Si nécessaire un échantillonneur automatique

6.2. **Appareil de filtration sur membrane**, avec membranes filtrantes, de porosité 0,45 μ m

6.3. **Matériel de laboratoire courant**

Méthode d'analyse séquentielle

6.4. **Analyseur séquentiel** se composant des éléments suivants :

- Un plateau de prélèvement pouvant contenir un nombre variable de godets dans lesquels les échantillons à analyser sont placés.
- Un plateau réactionnel composé de cuvettes transparentes qui reçoivent la prise d'essai de l'échantillon à analyser et le ou les réactifs nécessaires. Ces cuvettes sont maintenues à température constante dans un bain thermostaté et permettent une lecture colorimétrique.
- Un plateau de réactifs supportant les réservoirs des réactifs pour réaliser les dosages souhaités.
- Un ou des bras de prélèvement permettant de prélever, à l'aide d'un système de seringue automatique, les échantillons sur le plateau de prélèvement et les réactifs sur le plateau des réactifs et de les placer successivement dans la cuvette réactionnelle.
- Un lecteur optique permettant une mesure colorimétrique des différentes cuvettes réactionnelles.
- Un module électronique-informatique qui assure le pilotage du système et les calculs nécessaires pour obtenir le résultat recherché.

6.5. **Appareil de filtration sur membrane**, avec membranes filtrantes, de porosité 0,45 μ m

6.6. **Matériel de laboratoire courant**

Méthode d'analyse utilisant les tests en cuvettes

6.7. **Tests en cuve Phosphore total/ Phosphate ortho** (par exemple HACH Lange LCK 348, LCK349 ou LCK350).

6.8. **Spectrophotomètre** permettant la lecture des cuvettes.



6.9. **Appareil de filtration sur membrane**, avec membranes filtrantes, de porosité 0,45 μm

6.10. **Matériel de laboratoire courant**

7. Réactifs utilisés

Méthode d'analyse en flux

Sauf indication contraire, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue. Dégazer toutes les solutions vecteurs et les solutions de réactifs pour les dosages FIA, par exemple par filtration sur membrane (sous vide)..

7.1) **Eau** de qualité 1 (conformément à l'ISO 3696).

7.2) **Acide sulfurique concentré**, 98%

7.3) **Chlorure de sodium**, NaCl

7.4) **Acide ascorbique**, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$

7.5) **Tartrate de potassium et d'antimoine hémihydraté**, $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6,1/2\text{H}_2\text{O}$

7.6) **Heptamolybdate d'ammonium tétrahydraté**, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

7.7) **Réactifs de molybdate et tartrate d'antimoine**

7.7.1) **Solution de molybdate**. Dissoudre 40g d'heptamolybdate d'ammonium tétrahydraté (7.6) dans environ 800 ml d'eau (7.1) et compléter à 1000ml avec de l'eau (7.1). Cette solution est stable pendant 3 mois à température ambiante.

7.7.2) **Solution de tartrate de potassium et d'antimoine**. Dissoudre 3.0 g de tartrate de potassium et d'antimoine hémihydraté (7.6) dans environ 800 ml d'eau (7.1) et compléter à 1000ml avec de l'eau (7.1). Cette solution est stable pendant 3 mois à température ambiante.

7.7.3) **Réactif I de molybdate et de tartrate d'antimoine**. Ajouter 35 ml d'acide sulfurique (7.2) à environ 500 ml d'eau (7.1). Après refroidissement, ajouter 213 ml de solution de molybdate (7.7.1) et 72 ml de solution de tartrate de potassium et d'antimoine (7.7.2) et compléter à 1000ml avec de l'eau (7.1). Cette solution est stable pendant 2 semaines à température ambiante.

7.8) **Dodécylsulfate de sodium**, $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$.

7.9) **Solution d'acide ascorbique**. Dissoudre 6.0 g d'acide ascorbique (7.4) dans environ 80 ml d'eau (7.1), ajouter 0.1g de dodécylsulfate de sodium (7.8) et compléter à 100 ml avec de l'eau (7.1). Cette solution est à préparer chaque jour avant utilisation.

7.10) **Solution vecteur pour les dispositifs FIA** : la solution vecteur est l'eau (7.1) sans agent de surface.

7.11) **Solution étalon d'orthophosphate** à 1000 mg/l.

Méthode d'analyse séquentielle

7.1) **Eau** de qualité 1 (conformément à l'ISO 3696).

7.7.1) **Solution de molybdate**. Dissoudre 40g d'heptamolybdate d'ammonium tétrahydraté (7.6) dans environ 800 ml d'eau (7.1) et compléter à 1000ml avec de l'eau (7.1). Cette solution est stable pendant 3 mois à température ambiante.

7.7.2) **Solution de tartrate de potassium et d'antimoine**. Dissoudre 3.0 g de tartrate de potassium et d'antimoine hémihydraté (7.6) dans environ 800 ml d'eau (7.1) et compléter à 1000ml avec de l'eau (7.1). Cette solution est stable pendant 3 mois à température ambiante.

7.12) **Solution d'acide sulfurique**. Ajouter prudemment (70 ± 2) ml d'acide sulfurique concentré (7.2) à 400 ml d'eau (7.1) dans un bécher de 500 ml puis compléter approximativement à 500ml.



7.13) **Solution d'acide ascorbique.** Dans un ballon jaugé de 250 ml, dissoudre 4,5 g d'acide ascorbique (7.4) dans 250 ml d'eau. Cette solution est stable une semaine si elle est conservée entre 2 et 8°C dans une bouteille en polyéthylène.

7.13) **Réactif I :** dans une bouteille en polyéthylène, ajouter 75 ml de solution de molybdate (7.7.1) à 250 ml d'acide sulfurique (7.12). Ensuite, ajouter 25 ml de solution de tartrate de potassium et d'antimoine (7.7.2). Cette solution est stable 2 semaines si elle est conservée entre 2 et 8°C dans une bouteille en polyéthylène.

7.14) **Réactif II :** dans béccher, mélanger ($14 \pm 0,5$) ml de réactif I (7.13) avec ($6 \pm 0,2$) ml de solution d'acide ascorbique (7.13). Préparer cette solution le jour de son utilisation.

7.15) **Solution étalon d'orthophosphate** à 1000 mg/l.

7.16) **Solution de contrôle :** Matériau de référence certifié MRC

8. Préparation de l'échantillon

Si l'échantillon contient des matières particulaires dont la granulométrie est supérieure à 0,1 mm, une filtration de l'échantillon est nécessaire.

9. Mode opératoire

Méthode d'analyse en flux

9.1. Préparation pour l'analyse

Avant de procéder aux mesures, faire passer sans interruption pendant 10 minutes les réactifs à travers le dispositif en flux.

Le dispositif est prêt à fonctionner dès que la ligne de base n'indique plus de dérive. Il convient d'atteindre une relation signal/bruit satisfaisante.

9.2. Contrôle du réactif à blanc

Atteindre la stabilisation de la ligne de base.

Au lieu de la solution de réactif I (7.7.3) et de la solution du réactif, faire passer de l'eau dans tous les tubes et noter le changement d'absorbance.

Si l'absorbance par cm diminue de plus de 0,01 cm⁻¹, il est possible que l'eau utilisée ou les réactifs soient contaminés. Prendre des mesures appropriées pour éliminer ces interférences avant de commencer l'analyse.

Ensuite, faire passer de nouveau les réactifs.

Il est également possible d'injecter de l'eau distillée (7.1) exempte de phosphates.

9.3. Etalonnage

Sélectionner le domaine de travail souhaité et au moins 5 solutions d'étalonnage appropriées.

Préparer les solutions d'étalonnage pour le domaine choisi.

Procéder à un étalonnage par domaine de travail.



Avant de commencer l'étalonnage, régler la ligne de base selon les instructions du fabricant.

Déterminer les valeurs mesurées correspondant aux solutions d'étalonnage utilisées.

Les conditions d'analyse utilisées pour les étalons et les échantillons sont identiques. Le signal obtenu est proportionnel à la concentration en orthophosphates.

L'équation générale suivante est appliquée :

$$y = b * \rho + a$$

où

y est la valeur mesurée, en unités correspondant à l'instrument

b est la pente de la courbe d'étalonnage, en unités correspondant à l'appareil

ρ est la concentration en masse des orthophosphates, en milligrammes par litre

a est l'ordonnée à l'origine de la fonction d'étalonnage, en unités correspondant à l'instrument

9.4. Mesurage des échantillons

Analyser les échantillons éventuellement prétraités de la même manière que les solutions d'étalonnage avec le dispositif en flux.

Si la concentration en masse de l'échantillon dépasse le domaine de validité du domaine de travail choisi, diluer l'échantillon ou l'analyser dans un autre domaine de travail.

Après chaque série d'échantillons, mais au plus tard après 10 à 20 mesurages, contrôler la validité de la fonction d'étalonnage du domaine de travail, en utilisant une solution d'étalonnage dans le premier et dans le dernier tiers du domaine de travail. Etalonner de nouveau le dispositif si nécessaire.

Méthode d'analyse séquentielle

Se référer aux instructions du fabricant de l'analyseur séquentiel.

9.5. Etalonnage et préparation des solutions standards

Etablir la droite d'étalonnage en préparant une série de solutions d'étalonnage incluant une solution de concentration zéro. Par exemple, les standards : 0, 25, 50, 100, 200, 300, 400 et 500 ppb à partir de la solution (7.15).

9.6. Vérification de la fonction d'étalonnage

Lors de chaque étalonnage, un essai de contrôle est effectué avec un standard qui aura été préparé à partir d'un MRC (7.16). Vérifier la validité de la courbe d'étalonnage en analysant la solution de contrôle tous les 20 échantillons et au moins à la fin de chaque série d'échantillons. Réétalonner si nécessaire.



9.6. Analyse des échantillons

Remplir le chariot de l'appareil avec les réactifs, l'eau, la solution de contrôle et des godets vides pour permettre à l'appareil de réaliser les standards nécessaires à l'établissement de la courbe d'étalonnage.

Dans le rack à échantillons, mettre les échantillons à analyser puis démarrer l'analyse. La température d'incubation se situe entre 30°C et 40°C.

Méthode d'analyse utilisant les tests en cuvettes

Se référer au mode d'emploi fourni avec les kits.

Remarque : Sans hydrolyse, seul l'orthophosphate dissous est détecté. Avec hydrolyse, c'est principalement le phosphore total qui est détecté.

10. Calcul

Méthode d'analyse en flux

Déterminer la concentration en masse du composé à analyser dans la solution de mesure à partir de la valeur mesurée obtenue selon 9.4, par la fonction d'étalonnage.

Pour l'évaluation, utiliser la fonction d'étalonnage appropriée. Ne pas extrapoler celle-ci au-delà du domaine de travail choisi.

Calculer ρ selon l'équation :

$$\rho = \text{Erreur ! Signet non défini.} \frac{y - a}{b}$$

où les symboles sont tels que définis en 9.3.

Consigner les résultats avec deux chiffres significatifs au plus.

Méthode d'analyse séquentielle

Les concentrations en phosphates des échantillons sont directement calculées par le logiciel de l'appareil.

Méthode d'analyse utilisant les tests en cuvettes

La concentration en phosphates apparaît directement sur l'écran du spectrophotomètre lors de la lecture de la cuvette.



11. 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 ;
- La spécification de la méthode utilisée (analyse en flux, analyse séquentielle, kits) ;
- Les précisions relatives au traitement préalable auquel l'échantillon a éventuellement été soumis ;
- Une description du type d'appareillage utilisé ou des conditions de flux ;
- Les résultats du dosage conformément au point 10 ;
- La fidélité et la justesse des résultats, si disponibles ;
- Les détails opératoires non prévus dans la présente méthode, ainsi que tout facteur ayant pu affecter les résultats.

12. Référence

NBN EN ISO 15681-1 : 2005 - Qualité de l'eau – Dosage des orthophosphates et du phosphore total par analyse en flux (FIA et CFA)

ISO 15681-1 : 2013 - Qualité de l'eau – Détermination de paramètres sélectionnés par des systèmes d'analyse discrète – Partie 1 : ammonium, nitrate, nitrite, chlorure, orthophosphate, sulfate et silicate par détection photométrique.