

S-III-2.2V2 – DOSAGE DU PHENOL PAR HPLC DANS LES SOLS

1. Objet

Cette procédure a pour objet de décrire la méthode de dosage du phénol par chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplée à un détecteur fluorimétrique de tout échantillon de sol (y compris les sédiments), les matières utilisées sur ou dans les sols et les déchets.

2. Domaine d'application

Cette procédure permet le dosage du phénol par HPLC dans les sols (y compris les sédiments), dans les matières utilisées sur ou dans les sols et les déchets dans des domaines de concentration de 0.04 mg/kg à 20 mg/kg.

Les concentrations plus élevées sont analysées après dilution.

3. Principe

L'échantillon est extrait par agitation par du méthanol acidifié.

Après filtration, le phénol est analysé par HPLC couplé à un détecteur fluorimétrique ($\lambda_{\text{ex}} = 275 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{ém}} = 312 \text{ nm}$).

La quantification du phénol est réalisée par la méthode d'étalonnage interne.

4. Conditionnement et conservation de l'échantillon

Les échantillons doivent être prélevés dans des flacons en verre de préférence remplis à ras bord. Ils sont conservés à l'obscurité et à 4 °C. Ils subissent une phase d'extraction dès que possible (dans la semaine). A -18 °C, les échantillons peuvent être conservés pendant un an.

Les récipients en plastique sont à éviter car les phénols peuvent s'y adsorber. De plus, ils peuvent entraîner des contaminations de l'échantillon

5. Préparation de l'échantillon

Éliminer les pierres et autres matériaux ayant un diamètre supérieur à 10 mm.

6. Appareillages et matériels utilisés

6.1 Agitateur à mouvements horizontaux permettant une agitation d'environ 250 mouvements par minute

6.2 Chromatographe en phase liquide à haute performance, équipé d'un détecteur fluorimétrique à longueurs d'onde d'excitation et d'émission variables. Le dégazage de la phase mobile (avec l'hélium ou sous vide) pour éliminer l'oxygène résiduel est nécessaire car l'oxygène dissous réduit le signal de fluorescence et peut donc affecter la reproductibilité

Ce système comprend également :

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

6.3 Colonne de chromatographie remplie de phase permettant une séparation efficace des phénols (c.à.d. du phénol, des crésols et des dihydroxybenzènes) comme par exemple la colonne Xselect HSS PFP 3.5 μ m 4.6x150 mm

6.4 Balance analytique de précision 0.1 mg

6.5 Micropipettes automatiques de différents volumes ou de volume variable

6.6 Matériel et verrerie

Utilisation d'un matériel en verre nettoyé au détergent (de nature plutôt minérale), rincé à l'eau courante puis à l'eau désionisée et séché.

- Spatule
- Erlenmeyers de 100 ml
- Pipette jaugée de 20 ml
- Seringue de 3 ml en PP (polypropylène)
- Filtre en PVDF avec des pores de 0.45 μ m et un diamètre de 13 mm à adapter sur seringue
- Fiole de 1.5 ml avec septum en PTFE pré-fendu
- Ballons jaugés de différents volumes

7. Réactifs utilisés

Les réactifs et substances chimiques respectant les exigences liées à l'analyse par HPLC, à la détection par fluorescence et ne contenant pas de phénol et de 4-fluorophénol conviennent pour la préparation des échantillons.

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

7.1. Acide acétique concentré, 99-100 % p.a.

7.2. Eau ultra pure, pour HPLC préparée fraîchement



7.3. Méthanol acidifié, utiliser du méthanol pour analyse HPLC ou équivalent dans lequel on ajoute 1 ml par litre d'acide acétique concentré (0.1 % en volume)

7.4. Acétonitrile, utiliser de l'acétonitrile pour HPLC de qualité convenant à la détection par fluorescence

7.5. Phénol certifié à 99.5 % par exemple Dr. Ehrenstorfer GmbH

7.6. 4-fluorophénol pour analyse (CAS - 371-41-5) : étalon interne permettant de contrôler le rendement d'extraction

7.7. Sable pour analyse : purifié à l'acide et calciné pour analyse

7.8. Mélanges étalons

7.8.1. Solution mère phénol 1000 µg/ml

Prélever 10 mg de phénol certifié (7.5) dans un ballon jaugé de 10 ml et mettre au trait avec du méthanol acidifié. Cette solution est stable pendant 6 semaines stockée à 4 °C et protégée de l'évaporation.

7.8.2. Solution fille phénol 10 µg/ml

Prélever à la micropipette 200 µl de la solution mère (7.8.1) dans un jaugé de 20 ml et mettre au trait avec du méthanol acidifié.

7.8.3. Solution étalon interne 500 µg/ml

Prélever 25 mg de 4-fluorophénol p.a. dans un ballon jaugé de 50 ml et mettre au trait avec du méthanol acidifié.

7.8.4. Solutions d'étalonnage

Préparer 6 solutions étalons par dilution appropriée de la solution fille (7.8.2) dans du méthanol acidifié à l'aide de micropipettes et de ballons jaugés de 20 ml.

Solution à 5 µg/ml : 10 ml de la solution-fille (7.8.2)

Solution à 2.5 µg/ml : 5 ml de la solution-fille (7.8.2)

Solution à 0.5 µg/ml : 1 ml de la solution-fille (7.8.2)

Solution à 0.25 µg/ml : 500 µl de la solution-fille (7.8.2)

Solution à 0.05 µg/ml : 100 µl de la solution-fille (7.8.2)

Solution à 0.01 µg/ml : 20 µl de la solution-fille (7.8.2)

Ajouter à chaque solution d'étalonnage 25 µl à la micropipette de la solution étalon interne (7.8.3) et mettre au trait.

8. Mode opératoire

8.1. Extraction

Peser environ exactement 5.00 g d'échantillon représentatif dans un erlenmeyer de 100 ml. Ajouter à la micropipette 25 µl de la solution étalon interne (7.8.3), ensuite 20 ml de méthanol acidifié à l'aide d'une pipette jaugée. Agiter 30 min sur l'agitateur à mouvements horizontaux.

8.2. Purification

Après l'extraction, prélever environ 1.5 ml de la solution surnageante à l'aide d'une seringue de 3 ml. Filtrer à travers le filtre pour seringue directement dans une fiole de 1.5 ml avec septum en PTFE pré-fendu.

8.3. Analyse par chromatographie (HPLC)

Les paramètres suivants se sont révélés satisfaisants pour l'analyse du phénol :

Colonne HPLC : Xselect HSS PFP 3.5 µm 4.6x150 mm

Phase mobile: acétonitrile /eau

20/80 pendant 18 min

100/0 pendant 5 min

20/80 pendant 15 min

Volume injecté: 20 µl

Débit: 0.7 ml/min

Température de colonne : 30.0 ± 1.0 °C

Détecteur à fluorescence : $\lambda_{\text{ex}} = 275 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{ém}} = 312 \text{ nm}$

8.4. Étalonnage

L'étalonnage se fait par étalonnage interne (4-fluorophénol).

8.4.1 Étalonnage initial

Lorsque la méthode est utilisée pour la première fois, effectuer un test de linéarité (cf. ISO 8466-1) dans le domaine de travail choisi en analysant 6 dilutions du mélange étalon.

8.4.2 Étalonnage de routine

Après avoir établi la gamme de travail, analyser 6 dilutions du mélange étalon (7.8.4). Calculer la fonction d'étalonnage par une analyse de régression linéaire de la surface des pics corrigée.

8.4.3 Vérification de la validité de la fonction d'étalonnage de routine

Contrôler la validité de la fonction d'étalonnage de routine pour chaque série d'échantillons en analysant la solution étalon à 250 ng/ml en début de série et tous les 10 échantillons.

Vérifier que les résultats ne diffèrent pas plus de 10 % de la droite d'étalonnage de travail. Dans le cas contraire, effectuer un nouvel étalonnage (8.4.2).

9 Paramètres qualités

9.1 Essai à blanc

Effectuer parallèlement à la détermination un essai à blanc dans les mêmes conditions où l'échantillon est remplacé par du sable blanc purifié (7.7).

9.2 Essai sur matériaux certifiés

Effectuer tous les 6 mois, 3 mesures sur matériau certifié pour vérifier la stabilité de la procédure.

(Par exemple - CRM 131-100 - BNAs – Clay Loam 2).

10 Calcul des résultats

A partir du chromatogramme obtenu, le phénol et le 4-fluorophénol sont identifiés automatiquement à l'aide des temps de rétention des pics correspondants aux solutions d'étalonnage.

Un contrôle manuel des intégrations est également effectué en finale.

La concentration du phénol dans l'extrait est calculée par la méthode d'étalonnage interne par le logiciel en ng/ml sur la base de la courbe d'étalonnage à 6 points.

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 mg/kg sec du phénol à analyser dans l'échantillon de sol ou de boue à l'aide de l'équation suivante :

$$C_i = \frac{(C_e * V_{ex} * 100)}{(m_b * 1000 * MS)}$$

C_e : concentration du phénol dans l'extrait (ng/ml)

V_e : volume final de l'extrait (ml)

m_b : masse de l'échantillon brut (en g)

MS : matières sèches (0 à 100)

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;
- les détails opératoires non prévus dans la méthode, ainsi que tout facteur ayant pu affecter les résultats.

12 Références

ISO 11709 :2011 Qualité du sol -- Dosage d'une sélection de composés phénoliques dérivés du goudron de houille en utilisant la chromatographie liquide à haute performance (CLHP)

ISO 14507 :2003 Qualité du sol- Prétraitement des échantillons pour la détermination des contaminants organiques.

ISO 11465 :1993 Qualité du sol - Détermination de la teneur pondérale en matière sèche et en eau. Méthode gravimétrique.

ISO 8466-1 :1990 Qualité de l'eau – Etalonnage et évaluation des méthodes d'analyse et estimation des caractères de performance – Partie 1 : Evaluation statistique de la fonction linéaire.

ORIGINAL 2014