

INSTITUT SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE
DES PECHES MARITIMES
rue de l'île d'Yeu
B. P. n° 1049
44037 NANTES CEDEX

IPM.3 Pollutions

ETUDE CRITIQUE DES TECHNIQUES D'ANALYSE

UTILISEES POUR LA MESURE DES POLLUTIONS

EN MILIEU MARIN

Micropolluants organiques

par

Claude ALZIEU et Pierre MICHEL

NANTES, juillet 1975

ETUDE CRITIQUE DES TECHNIQUES D'ANALYSE

UTILISEES POUR LA MESURE DES POLLUTIONS

EN MILIEU MARIN

Micropolluants organiques

par

Claude ALZIEU et Pierre MICHEL

S O M M A I R E

3ème PARTIE - MICROPOLLUANTS ORGANIQUES

A - LES PESTICIDES ORGANOCHLORES	1
1. CONDITIONNEMENT DES ECHANTILLONS	1
1.1. Echantillons d'eau	1
1.2. Echantillons de plancton	2
1.3. Echantillons de poissons, crustacés et coquillages	2
2. TECHNIQUES ANALYTIQUES EN USAGE	3
2.1. Extraction des composés organochlorés	3
2.1.1. Les phases d'extraction	3
2.1.2. Extraction à partir de l'eau	4
2.1.3. Extraction à partir des organismes vivants	6
2.2. Purification des extraits	7
2.2.1. Lavage à la diméthylformamide	7
2.2.2. Précipitation des lipides en milieu sulfurique	7
2.2.3. Chromatographie d'adsorption	9
2.2.4. Séparation moléculaire sur gel	10
2.3. Séparation des PCB, du DDT et de ses dérivés	10
2.3.1. Fractionnement sur silice	10
2.3.2. Fractionnement sur silice et célite	10
2.3.3. Fractionnement sur florisol	11
3. IDENTIFICATION ET QUANTIFICATION DES RESIDUS ..	12
3.1. Chromatographie en phase gazeuse	12
3.1.1. Les phases stationnaires	12
3.1.2. Les détecteurs	14
3.2. La chromatographie sur couche mince	15
4. AVANTAGES DES DIFFERENTES METHODES	15
4.1. Critères du choix	15
4.2. Méthodes recommandées	16
4.2.1. Extraction	16
4.2.2. Purification	17
4.2.3. Séparation des PCB	17
4.2.4. Dosage	17
4.3. Equipements nécessaires	17
5. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	18

B - LES TENSIO-ACTIFS ANIONIQUES	21
1. CONDITIONNEMENT DES ECHANTILLONS	21
2. TECHNIQUES ANALYTIQUES EN USAGE	21
2.1. Préconcentration des échantillons	22
2.2. Méthodes au bleu de méthylène	23
2.3. Méthodes à l'orthophénantroline	24
2.4. Méthodes automatiques	25
3. AVANTAGES DES DIFFERENTES METHODES	27
4. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	30
C - LES HYDROCARBURES	31
1. INTRODUCTION	31
2. PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS ET CONDITIONNEMENT	33
2.1. Eau de mer	33
2.2. Sédiments	34
2.3. Matériel biologique	36
3. TECHNIQUES ANALYTIQUES EN USAGE	37
3.1. Extraction de la phase lipidique	37
3.1.1. Dans l'eau	37
3.1.2. Dans les sédiments et les matériaux biologiques..	37
3.2. Purification des extraits	39
3.2.1. Saponification	39
3.2.2. Purification par chromatographie	39
3.3. Identification et analyse des hydrocarbures ..	40
3.3.1. Spectrométrie infrouge	40
3.3.2. Spectrométrie U. V.....	41
3.3.3. Spectrofluorimétrie	41
3.3.4. Détecteur microcalorimétrique	42
3.3.5. Chromatographie en phase gazeuse	42
3.3.6. Spectrographie de masse	44
4. AVANTAGES DES DIFFERENTES METHODES	44
4.1. Critères de choix	44
4.2. Méthodes recommandées	48
4.2.1. Mesure des hydrocarbures dans l'eau par spectrofluorimétrie	48
4.2.2. Mesure des hydrocarbures dans les sédiments et les organismes marins	49
5. BIBLIOGRAPHIE	52



3ème PARTIE - MICROPOLLUANTS ORGANIQUES

A - LES PESTICIDES ORGANOCHLORES

=====

— Le DDT, ses dérivés DDD, DDE et les polychlorobiphényles (PCB) constituent les résidus organochlorés les plus fréquemment rencontrés dans l'environnement marin. Depuis que JENSEN a signalé en 1968 l'interférence des PCB dans les analyses du DDT et de ses dérivés, la plupart des laboratoires utilisent des méthodes permettant d'identifier séparément ces deux groupes de produits.

Nous ne considérerons donc que les méthodes analytiques qui permettent de déterminer simultanément, sur un même échantillon, l'ensemble de ces résidus.

Le mode opératoire de ces procédés analytiques comprend généralement cinq opérations distinctes :

- conditionnement des échantillons,
- extraction des résidus organochlorés par un solvant organique,
- purification de l'extrait,
- séparation des PCB et du DDT,
- dosage de chaque résidu.

Les techniques utilisables au cours de chacune de ces opérations dépendent essentiellement de la nature des échantillons à traiter. —

1. CONDITIONNEMENT DES ECHANTILLONS

1.1. Echantillons d'eau

L'eau prélevée soit par pompage soit par bouteilles à prélèvement est débarrassée des organismes zooplanctoniques par filtration. COX (1971), utilise pour ce faire une toile de porosité 175 μ . Les échantillons doivent être conservés dans des flacons en verre jusqu'à leur traitement au laboratoire.

./.....

Suivant la contamination des zones échantillonnées le volume de chaque prélèvement varie entre quelques litres et plusieurs dizaines de litres.

1.2. Echantillons de plancton

Le plancton est récolté à l'aide de filets de maillage correspondant à la taille des espèces planctoniques que l'on souhaite échantillonner. Cependant, malgré toutes les précautions qui peuvent être prises, les prélèvements sont fréquemment souillés par des détritiques indésirables.

Le phytoplancton et le zooplancton sont prélevés par MARCHAND et Coll. (1974) à l'aide de filets ayant respectivement des mailles de 60 et 300 μ . Le macrozooplancton est échantillonné avec un filet type ISAACS - KID.

WILLIAMS et HOLDEN (1973) recueillent à la vitesse de 10 noeuds et par 10 mètres de fond, le plancton de taille supérieure à 300 μ alors que JENSEN et Coll. (1972) utilisent un filet de 100 μ à la vitesse de 1 noeud.

Les échantillons peuvent être conservés, si nécessaire, dans des bocaux de verre à la température de -20° C.

1.3. Echantillons de poissons, crustacés et coquillages

Les échantillons de poissons, crustacés et coquillages, s'ils ne peuvent être analysés rapidement doivent être conservés congelés de -10° C à -20° C. Pour éviter toute contamination secondaire, il est préférable de les emballer dans une feuille d'aluminium ou de les stocker dans des bocaux de verre. HOLDEN (1970) a montré que les échantillons de phoques pouvaient aussi bien être conservés par réfrigération à -20° C que par immersion dans une solution aqueuse à 5 % d'aldéhyde formique.

2. TECHNIQUES ANALYTIQUES EN USAGE

2.1. Extraction des composés organochlorés

Les composés organochlorés sont séparés de leur milieu support à l'aide de solvants organiques apolaires. Les phases d'extraction sont nombreuses et dépendent à la fois de la nature de l'échantillon et des moyens techniques d'extraction.

2.1.1. Les phases d'extraction

Choix des solvants

Le n-HEXANE est le solvant le plus fréquemment utilisé que ce soit pour les extractions à partir des échantillons d'eau, de coquillages, de poissons ou de plancton (HOLDEN 1970, ZITKO 1971, JENSEN et Coll. 1972, MARCHAND 1974, BRAUD 1972, EADES et Coll. 1970, WILLIAMS et HOLDEN 1973).

Les autres solvants usuels sont moins utilisés tels, le pentane pour les tissus animaux (BERGE et HILLEBRAND 1974, HAGEL et TUINSTRA 1972), l'acétonitrile pour les algues (BRAUD 1972) ou les poissons (MESTRE 1971) et les mélanges éther de pétrole - éther sulfurique.

En raison des teneurs en eau élevées des tissus de mollusques, certains auteurs procèdent d'abord à un broyage dans l'acétone puis à l'extraction des composés organochlorés par l'éther de pétrole (FOUGERAS 1971) ou le pentane (BERGE et HILLEBRAND 1974).

Pureté des solvants

Tous les solvants utilisés pour cette opération doivent être d'une pureté élevée et en particulier exempts de traces d'organochlorés pouvant interférer dans le dosage des résidus recherchés.

Certains fabricants proposent des produits de très haute pureté dits "nanograde" et ne renfermant seulement que quelques dizaines de nanogramme de composé chloré par litre.

./....

Les solvants dits "pour analyse" peuvent être utilisés après traitement et redistillation.

MESTRE et ILLES (1970) ont proposé un procédé de préparation de l'éther de pétrole par traitement à l'eau oxygénée, réduction par Zn - Ni en milieu HCl pur, lavage à l'acide sulfurique et redistillation de la fraction 35 - 60° C. Ce traitement permet d'obtenir un solvant peu coûteux, mais les manipulations sont multiples et très longues. Ces auteurs considèrent que l'éther de pétrole est utilisable quand 5 µl de solvant concentré 150 fois peuvent être injectés dans un chromatographe en phase gazeuse avec détecteur à capture d'électrons sans qu'apparaisse des substances en quantité gênante pour l'analyse des résidus.

HOLDEN et MARSDEN (1969) utilisent du n-hexane, 67 - 70° C redistillé 68 - 69° C exempt de substance détectable en chromatographie en phase gazeuse après une concentration de 100 fois.

2.1.2. Extraction à partir de l'eau

Les composés organochlorés peuvent être séparés de l'eau directement par mise en contact avec le solvant, par concentration sur résine échangeuse d'ions ou supports adsorbants.

- Extraction directe

L'opération peut s'effectuer manuellement dans un décanteur muni d'un robinet verre ou téflon et préalablement rincé avec le solvant d'extraction.

Les résidus organochlorés contenus dans le volume d'eau à traiter (1 litre) sont extraits par agitations répétées avec un solvant. Généralement trois extraits successifs soit deux fois 100 ml et une fois 50 ml de solvant, sont suffisants pour retenir la totalité des résidus présents.

Différents systèmes d'automatisation de ces opérations ont été proposés dont ceux de MESTRE (1971) et de AHNOFF et JOSEFSSON (1974).

Le premier dispositif consiste à faire circuler, par dépression, l'échantillon et un solvant plus léger que l'eau dans un serpentín rempli de billes de verre. Le mélange eau-solvant est recueilli à la sortie du serpentín dans un récipient de décantation. La phase organique est ensuite transférée par aspiration dans un ballon récepteur. Cet appareillage tout en verre peut traiter 900 ml d'eau en 10 à 20 mn, mais nécessite cependant des interventions manuelles telles que ouverture et fermeture de robinets à périodes déterminées.

Le système mis au point par AHNOFF et JOSEFSSON est constitué par un cylindre clos à l'intérieur duquel se trouve un bol de téflon renfermant 150 ml de solvant (cyclohexane) et un barreau aimanté. L'eau pénétrant au sommet du cylindre est mise au contact du solvant grâce au vortex formé par la rotation du barreau aimanté. Une zone de décantation ménagée autour du bol permet d'évacuer par pompage l'eau traitée. En fin d'opération le cyclohexane est recueilli dans le bol. Cet appareil de conception simple, peu encombrant et d'emploi facile, permet de traiter "in situ" de 8 à 10 litres d'eau par une faible quantité de solvant. Cependant, une partie est perdue au cours de l'opération et les paramètres tels que turbidité et salinité jouent un rôle dans la récupération du cyclohexane initial.

- Concentration sur résines

Quand les concentrations dans l'eau sont très faibles, il peut être avantageux de réunir, dans un faible volume de solvant, les résidus contenus dans d'importantes quantités d'eau. Cette concentration s'effectue par écoulement de l'eau sur une substance adsorbante qui ensuite éluee par un solvant, restitue les substances fixées.

Ce sont les graisses de silicone et certains polymères synthétiques qui, parmi les nombreuses substances étudiées, possèdent les meilleures propriétés adsorbantes.

AHLING et JENSEN (1970) retiennent de 50 à 100 % de pesticides sur une colonne de chromosorb W 60-80 mesh, traité par du carbowax 4 000 et du n-undécane.

Les billes de polyuréthane peuvent être utilisées comme adsorbant soit seules, pour retenir les PCB, soit enrobées de graisses de silicones, pour fixer un grand nombre de pesticides.

UTHE et Coll. (1972) ont trouvé des rendements supérieurs à 90 % avec des billes de polyuréthane traitées par du DC 200. Pour l'aldrine et le DDT, SE 30, QF 1 et DEGS donnent de bons résultats alors que les séries OV sont inefficaces. Les pesticides fixés peuvent être élués par un faible volume d'hexane (100 ml).

Contrairement au polyuréthane qui est compressible, la résine AMBERLITE X AD 2, polymère du styrène et du divinylbenzène, résiste à l'écrasement et retient les dérivés organochlorés par liaison hydrophobe. Sa capacité d'adsorption est élevée et les rendements de récupération par l'acétonitrile du DDE, DDT et de la dieldrine sont voisins de 100 %.

2.1.3. Extraction à partir des organismes vivants

- Extraction liquide-liquide

Cette technique consiste à solubiliser les corps gras et les pesticides par broyage et macération dans un premier solvant puis à procéder à une deuxième extraction sélective.

FOUGERAS (1971) utilise 25 g de chair d'huître qu'il broye dans 100 ml d'acétone puis maintient sous agitation pendant 20 mn. Après filtration sur hyflosupercel, la phase acétonique est additionnée de 300 ml d'eau et extraite par deux fois 100 ml d'éther de pétrole.

BERGE et Coll. (1974) utilisent une technique analogue avec des échantillons de plancton. 50 g de plancton sont mixés pendant 30 secondes dans 100 ml d'acétone et l'extraction s'effectue après addition de 900 ml d'eau par deux fois 150 ml de pentane.

BRAUD (1972) procède à l'extraction par l'hexane d'échantillons de 75 g d'algues broyés dans 50 ml d'acétonitrile et 30 ml d'eau.

- Extraction solide-liquide

L'utilisation d'un appareil de SOXHLET pour l'extraction des résidus dans les tissus organiques est d'un usage très courant. Les échantillons sont préalablement deshydratés soit par lyophilisation, soit par broyage avec du sulfate de soude anhydre.

Les prises d'essai sont de l'ordre de 5 g pour les poissons gras, 10 à 30 g pour les poissons maigres et les coquillages et de 50 g pour les sédiments. L'extraction dure environ 8 h, le solvant le plus fréquemment utilisé étant le n-hexane.

Bien que l'extraction liquide-liquide paraisse plus rapide à mettre en oeuvre que l'utilisation du soxhlet, ce dernier présente cependant de nombreux avantages.

2.2. Purification des extraits

2.2.1. Lavage à la diméthylformamide

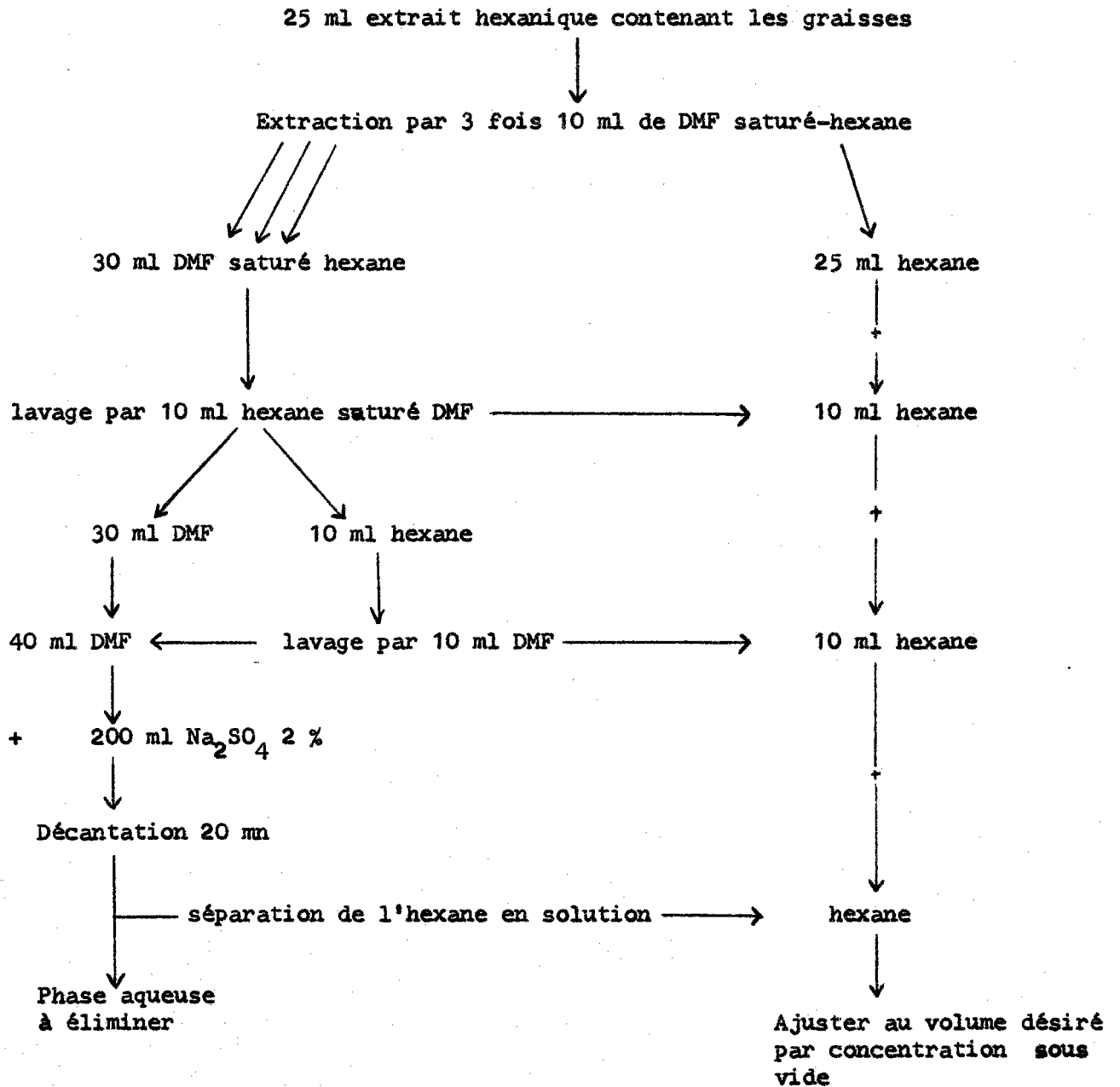
DE FAUBERT-MAUDER (M-J) et Coll. (1964) séparent les lipides des extraits hexaniques par lavages successifs à la diméthylformamide (DMF) saturée d'hexane. Ce procédé donne des extraits d'une pureté convenable mais comporte de longues et multiples manipulations "d'agitation - décantation" qui nécessitent la mise en oeuvre d'importantes séries de décanteurs. Le schéma 1 donne l'ordre chronologique des manipulations à réaliser.

2.2.2. Précipitation des lipides en milieu sulfurique

MURPHY (P.G.) (1972) précipite les lipides par addition de 1 ml d'acide sulfurique concentré à 5 à 10 ml d'extrait hexanique. Après agitation et centrifugation 10 mn à 600 tours par mn, la phase hexanique surnageante est prélevée. L'opération peut être répétée si la teneur initiale en lipides est trop élevée.

Cette méthode appliquée à des extraits à raison de 4 ml d'hexane par gramme de tissu donne des rendements de récupération de 98 à 100 % pour les PCB, le lindane, α et γ chlordane, DDMU, DDE, DDT et DDD. L'aldrine

/...



SCHEMA n° 1

et l'endrine (94 %), l'heptachlor époxide (91 %) sont faiblement affectés alors que la dieldrine (4 %) et les composés organophosphorés sont détruits.

2.2.3. Chromatographie d'adsorption

Le florisol qui est un silicate de magnésium synthétique a été utilisé pour la purification des extraits, puis la séparation des résidus organochlorés et organophosphorés. Son utilisation expose à des aléas en raison de la présence occasionnelle d'impuretés, mais aussi à cause de variations dans la composition chimique des différents lots, ce qui entraîne des variations notables des degrés d'activité.

L'alumine préalablement désactivée à 800° C puis réactivée avec 5 ou 10 % d'eau, donne de bons résultats. Son élution par de l'hexane est quantitative pour les PCB, le DDT et ses dérivés. Le tableau n° 1 donne quelques systèmes d'élution du florisol et de l'alumine.

ABSORBANT	SYSTEME D'ELUTION	REFERENCES
Florisol	Chlorure de méthylène + hexane (20 + 80)	MILLS
Florisol (40 g)	Chlorure de méthylène + éther de pétrole (35 + 65)	FOUGERAS
Florisol	1 n-hexane 2 n-hexane + diéthyléther(90+10)	KOEMAN
Florisol 3 %	1 hexane 2 hexane + diéthylether	RICHARDSON
Alumine 5 % (10 g)	Hexane (90 ml)	DE FAUBER-MAUDER
Alumine 5 % (2 g)	Hexane (10-20 ml)	HOLDEN
Alumine 10 % (15 g)	Pentane (20 ml)	HAGEL

TABLEAU n° 1 : Absorbants et systèmes d'élution.

2.2.4. Séparation moléculaire sur gel

La séparation des lipides et des pesticides, suivant leur poids moléculaire, est possible en utilisant des gels appropriés.

STALLING et Coll. (1972) séparent à partir d'extraits de poissons, le DDT, DDE, DDD et les PCB sur un gel de polystyrène "Bio Beads SX 2". La séparation est totale si l'on élue par le cyclohexane et la récupération des pesticides est supérieure à 95 % pour des concentrations au niveau des tissus comprises entre 0,01 et 1 mg/kg.

Après emploi, le gel peut être recyclé par lavage ce qui permet l'automatisation de la méthode.

2.3. Séparation des PCB, du DDT et de ses dérivés

Pour éviter l'interférence de certains constituants des PCB avec le DDT ou ses dérivés, il est indispensable de fractionner les extraits avant de procéder à la détermination qualitative et quantitative des résidus. Ce fractionnement s'effectue sur colonnes de silice, de silice et célite, ou de florisol.

2.3.1. Fractionnement sur silice

Cette technique a été mise au point et développée par HOLDEN et MARSDEN (1969). La silice (70 - 325 mesh) est d'abord lavée à l'eau distillée chaude puis par l'éther éthylique. Après séchage elle est activée à 120° C pendant deux heures puis partiellement désactivée par addition de 5 % d'eau. Deux grammes de silice humidifiée à l'hexane sont versés dans une colonne en verre borosilicaté de 0,6 cm de diamètre intérieur et de 45 cm de long. L'élution des PCB, du pp'DDE et de 45 % de op'DDT contenus dans un millilitre d'extrait est obtenue avec 5 ml d'hexane. Les composés restant sont ensuite élués par un mélange contenant 10 % de diethyl éther dans le n-hexane.

2.3.2. Fractionnement sur silice et célite

AMOUR et BURKE (1970) séparent les PCB du groupe des DDT avec un mélange de silice (100 mesh), activée pendant 7 h à 130° C et partiellement désactivée par 3 % d'eau, et de célite 545. Cinq grammes de célite et vingt grammes d'acide silicique sont mis en suspension dans 80 ml d'éther

de pétrole et versés dans une colonne en verre de 0,22 cm de diamètre et 40 cm de haut. L'extrait purifié (5 ml) est élué à raison de 5 ml/min par 250 ml d'éther de pétrole puis par 200 ml d'un mélange d'acétonitrile - hexane - chlorure de méthylène (1 + 19 + 80). Le premier éluat contient les PCB et l'aldrine, le second le DDT et ses dérivés.

2.3.3. Fractionnement sur florisil

La séparation des PCB et des pesticides du groupe du DDT peut être effectuée sur colonne de florisil en utilisant deux éluants de polarité différente :

- hexane et diéthyéther dans l'hexane,
- éther de pétrole et diéthyléther dans l'éther de pétrole.

Le tableau n° 2 donne les différents systèmes d'éluion utilisés ainsi que les pesticides élués dans chaque éluant.

SYSTÈME D'ELUTION	PRODUITS ELUES	REFERENCES
n-hexane	Heptachlor, aldrine, DDE, PCB,	REYNOLDS
n-hexane + dié- thyléther (50+50)	Heptachlor -époxyde, DDD, DDT,	
n-hexane	DDE, PCB,	KOEMAN
n-hexane + dié- thyléther(90+10)	Dieldrine, endrine,	
n-hexane	BHC, PCB, aldrine, pp'DDD, pp'DDT,	RICHARDSON
n-hexane + dié- thyléther(90+10)	dieldrine, endrine,	
Ether de pétrole	DDE, DDD, DDT,	MESTRES
Ether de pétrole + diéthyléther (50 + 50)	PCB, dieldrine,	

TABLEAU n° 2 : Systèmes d'éluion pour la séparation des PCB et des DDT sur florisil.

3. IDENTIFICATION ET QUANTIFICATION DES RESIDUS

De façon générale, les pesticides peuvent être dosés en faisant appel à un grand nombre de techniques analytiques, mais ce sont essentiellement les techniques chromatographiques qui sont utilisées en raison de leur sensibilité.

La chromatographie en phase gazeuse est plus souvent utilisée que la chromatographie sur couche mince pour l'identification et la quantification des résidus de PCB et DDT dans les extraits d'échantillons d'eau ou de tissus animaux.

3.1. Chromatographie en phase gazeuse

3.1.1. Les phases stationnaires

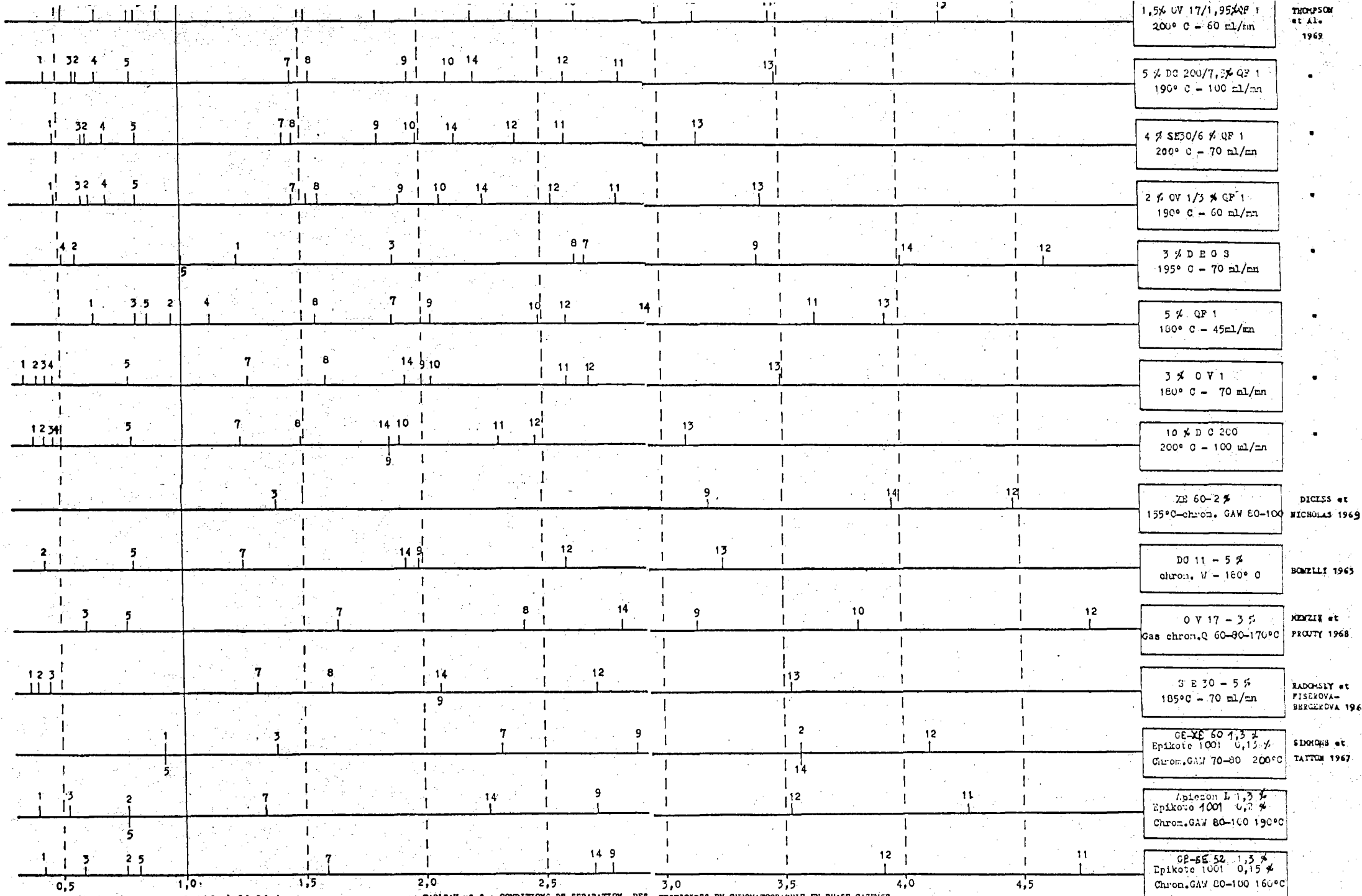
A cause du point d'ébullition relativement élevé des composés organochlorés, les phases stationnaires doivent être parfaitement stables pour des températures voisines de 200° C.

Les graisses de silicone SE 30, DC 200 ou les silicones fluorées QF 1 et OV, faiblement imprégnées remplissent généralement les conditions requises. L'association d'une phase QF 1 avec du DC 200, du SE 30 ou de l'OV 17 donne également de bonnes séparations.

Le chromosorb W, qualité AW ou DMCS, est le support le plus fréquemment utilisé avec le Gaschrom Q.

Le tableau n° 3 donne pour quelques unes des phases stationnaires habituellement employées, les taux d'imprégnation, les températures d'utilisation et l'ordre de sortie des pesticides séparés dans ces conditions.

./....



THOMPSON et AL. 1962

DICISS et NICHOLAS 1969

BONELLI 1963

KENZIE et PROUTY 1968

RADOŠIY et FISEKOVA-BERKEKOVA 1967

SIMONS et TATTON 1967

TABLEAU n° 3 : CONDITIONS DE SEPARATION DES PESTICIDES EN CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

- | | | | |
|---|-------------|----|--------|
| 1 | BHC | 8 | op'DDE |
| 2 | BHC | 9 | pp'DDE |
| 3 | Lindane | 10 | op'DDD |
| 4 | DHC | 11 | pp'DDD |
| 5 | Heptachlore | 12 | op'DDT |
| 6 | Aldrine | 13 | pp'DDT |

Temps de rétention relatifs à l'aldrine

3.1.2. Les détecteurs

Les quantités généralement très faibles de résidus présents dans les extraits soumis à la chromatographie en phase gazeuse ne peuvent être décelés qu'au moyen de détecteurs sensibles à quelques picogrammes de produit.

Le détecteur dit à capture d'électrons muni d'une source de tritium ou de ^{63}Ni est universellement utilisé pour le dosage des pesticides organohalogénés. Sa sélectivité est faible mais sa sensibilité est très élevée pour les dérivés organiques du chlore. La majorité des appareillages existants, permettent de déceler entre 0,1 et 1 picogramme de LINDANE par exemple, Le remplacement de la source tritium primitivement utilisée par une source de ^{63}Ni a permis d'obtenir des détecteurs d'une durée de vie plus longue et pouvant fonctionner à des températures plus élevées (350 - 400° C) sans encrassement.

Le chromatographe en phase gazeuse peut être couplé avec des détecteurs spécifiques du chlore, généralement moins sensibles que la capture d'électrons, faisant appel à la microcoulométrie, la conductivité électrolytique, ou la spectrométrie de masse.

Quand les résidus de PCB sont en quantité élevée dans les extraits, le spectromètre de masse peut se révéler d'un emploi avantageux. Mais, de façon générale, ces détecteurs sont très coûteux et d'un fonctionnement plus délicat que le détecteur à capture d'électrons. Ils nécessitent en outre un personnel très familiarisé à leur utilisation. Si, pour des analyses de routine, l'utilisation d'un détecteur à capture d'électrons est particulièrement fiable, l'usage d'un microcoulomètre ou d'un détecteur de HALL peut se révéler précieux pour l'identification particulièrement délicate de certains résidus.

./....

3.2. La chromatographie sur couche mince

D'un emploi peu courant, elle est parfois utilisée comme une technique de confirmation des résultats acquis en chromatographie en phase gazeuse.

Les composés organochlorés peuvent être séparés sur couche mince d'alumine ou de silice en utilisant, le n-heptane ou des mélanges acétone - n-heptane et diméthylformamide - isoctane, comme systèmes d'élution.

Après développement, un réactif chromogénique tel que :

- nitrate d'argent et 2-phénoxyéthanol en milieu acétonique,
- diphénylamine et chlorure de zinc dans l'acétone,
- rhodamine B en solution aqueuse à 10 % de carbonate de sodium,
- o-tolidine en solution acétonique,
- vapeurs d'iode,

est pulvérisé sur les plaques. L'exposition à un rayonnement ultraviolet est souvent nécessaire pour visualiser les spots.

Suivant les techniques employées et le composé recherché, les seuils de détection sont compris entre 0,02 et 1 µg.

4. AVANTAGES DES DIFFERENTES METHODES

4.1. Critères du choix

On ne peut estimer le niveau de contamination du milieu qu'en interprétant de façon statistique les résultats des analyses pratiquées sur un grand nombre d'échantillons. Les laboratoires doivent donc disposer de méthodes effectuant, dans les meilleurs délais et à un coût raisonnable, un grand nombre d'analyses de routine. Pour être adaptables à de grandes séries, les techniques ne devront comporter qu'un minimum de manipulations simples n'utilisant qu'un appareillage courant de laboratoire.

Chacune des techniques en usage qui, du point de vue de la sensibilité et de la reproductibilité, donne des résultats comparables, peut être plus particulièrement examinée sous l'aspect de :

./...

- la durée des manipulations ; elles devront être aussi courtes que possible et ne pas nécessiter des attentes prolongées dues par exemple à la formation d'émulsions stables ou de débits sur colonne trop lents ;

- l'importance de la verrerie utilisée ; il est souhaitable de procéder avant utilisation à un lavage de toute la verrerie par les solvants utilisés pour la suite des opérations. Un nombre limité de pièces réduira d'autant la durée de l'analyse ;

- la nature et le volume des solvants qui sont un facteur important du prix de revient d'une technique analytique. En raison des redistillations préalables, il est souhaitable de n'utiliser qu'un ou deux solvants au plus, et en faible quantité ;

- la nature des absorbants qui devra être choisie essentiellement en fonction de la constance de leur composition, de la reproductibilité du degré d'activité désiré, de leur pureté, de leur durée de conservation et des quantités nécessaires.

4.2. Méthodes recommandées

Les méthodes qui correspondent le mieux à une utilisation de routine pourraient comprendre les opérations suivantes :

4.2.1. Extraction

L'extraction solide-liquide par le n-hexane sur appareil de soxhlet présente des avantages importants :

- manipulations limitées ne nécessitant pas de surveillance particulière,
- utilisation d'une faible quantité de solvant,
- possibilité de déterminer simultanément la teneur en graisse des échantillons par simple pesée,
- matériel de verrerie peu important.

Ce même solvant peut aussi être utilisé pour l'extraction directe des échantillons d'eau. Certains extraits peuvent être injectés après concentration et sans purification dans un chromatographe en phase gazeuse ; l'hexane étant un très bon solvant d'injection en capture d'électrons.

4.2.2. Purification

Si la dieldrine n'est pas recherchée, la précipitation des lipides en milieu sulfurique est rapide et se prête facilement au traitement simultané d'un grand nombre d'échantillons.

Le florisil peut être utilisé dans la mesure où la dieldrine est recherchée, mais sa préparation est trop souvent considérée comme aléatoire et source de contamination. Enfin, la séparation moléculaire sur gel peut être intéressante dans la mesure où l'on dispose d'un système automatique, mais d'importants volumes de solvants sont nécessaires.

4.2.3. Séparation des PCB

La méthode sur gel de silice (HOLDEN et MARSDEN 1969) présente de nombreux avantages sur celle utilisant le mélange silice et célite :

- bonne séparation PCB et DDT,
- quantités de produits très nettement inférieures,
- vitesse de passage du solvant plus rapide,
- injection directe des éluants en chromatographie en phase gazeuse à capture d'électrons.

4.2.4. Dosage

Le chromatographie en phase gazeuse avec détecteur à capture d'électrons est une technique indispensable pour le dosage des résidus d'organochlorés. Elle est de plus actuellement très répandue dans tous les laboratoires.

4.3. Equipements nécessaires

- Matériel

extracteur solide-liquide
 évaporateur rotatif sous vide
 centrifugeuse de pailleasse
 chromatographe en phase gazeuse équipé d'un détecteur capture d'électrons au ⁶³Ni

- Produits

n-hexane redistillé
 diethyl éther redistillé
 gel de silice
 acide sulfurique

5. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AHLING (B.) et JENSEN (S.), 1970. - Anal. Chem. - 42, p. 1483.
- AHNOFF (M.) et JOSEFSSON (B.), 1974. - Simple apparatus for on-site continuous liquid-liquid extraction of organic compounds from natural waters. - Anal. Chem. 46, 6, p. 658 - 663.
- ALBRO (P.W.) et FISHBEIN (L.), 1972. - Quantitative and qualitative analysis of polychlorinated biphenyls by gas-liquid chromatography and flame ionization detection. I. One to three chlorine atoms. - J. chromatogr. 69, p. 273 - 283.
- ARMOUR (J.A.) et BURKE (J.A.), 1970. - Method for separating polychlorinated biphenyls from DDT and its analogs. - J.A.O.A.C. 53, 4, p. 761-768.
- COX (J.L.), 1971. - DDT residues in seawater and particulate matter in the California current system. - Fish. Bull. 69, 2, p. 443-450.
- EADES (J.F.) et CROWLEY (M.), 1970. - Pesticide residue levels in mussels in Irish coastal waters. - Fisheries Improvement Committee E 4.
- DE FAUBERT - MAUDER (M.J.), EGAN (H.), GODLY (E.W.), HAMMOND (E.W.), ROBURN (J.) et THOMSON (J.), 1964. - Clean up of animal fats and dairy products for the analysis of chlorinated pesticide residues. - Analyst, 89, 1056, p. 168-174.
- FISHBEIN (L.), 1972. - Chromatographic and biological aspects of polychlorinated biphenyls. - J. Chromatogr. 68, p. 345 - 426.
- FOUGERAS - LAVERGNOLLE (J.), 1971. - Recherche des pesticides organochlorés dans les milieux littoraux. - Rev. Trav. Inst. Pêches marit. 35, 3, p. 367 - 371.
- FRANKLIN (F.L.), 1974. - Seasonal variations in the organo-chlorine content of shrimps and oysters. - Fisheries Improvement Committee, E 21.
- GRIFFITT (K. R.) et CRAUN (J. C.), 1974. - Gel permeation chromatographic system : an evaluation. - J. A. O. A. C., 57, 1, p. 168 - 172.
- HAGEL (P.) et TUINSTRA (L.G.M.Th.), 1972. - Chlorinated aromatic hydrocarbon content of fishes, mussels and shrimps in the North Sea. - Netherlands Institute for Fishery investigation (RIVO), IJmuiden.
- HARVEY (G.R.), BOWEN (V.T.), BACKUS (R.H.) et GRICE (G.D.), 1971. - Chlorinated hydrocarbons in Open-Ocean Atlantic organisms. - Fisheries Improvement Committee, E 24.
- HARVEY (G.R.), 1972.- Adsorption of chlorinated hydrocarbons from seawater by a crosslinked polymer. - National Technical Information Service U. S. Department of commerce.

./.....

- HOLDEN (A. V.) et MARSDEN (K.), 1969. - Single-stage clean-up of animal tissue extracts for organochlorine residue analysis. - J. chromatogr. 44, p. 481 - 492.
- HOLDEN (A.V.), 1970. - Monitoring organochlorine contamination of the marine environment by the analysis of residues in seals. - FAO Technical Conference on Marine Pollution and its effects on living resources and fishing, Rome.
- JENSEN (S.), RENBERG (L.) et OLSSON (M.), 1972. - PCB contamination from boat bottom paint and levels of PCB in plankton outside a polluted area. - Nature, 240, p. 358 - 360.
- MARCHAND (M.), VAS (D.) et DUURSMA (E.), 1974. - Résidus de DDT et de polychlorobiphényles (PCB) dans les moules, le sédiment et le plancton de la côte Nord-Ouest méditerranéenne. - Journées d'études sur la Pollution marine. MONACO, 6 - 14 décembre 1974.
- MESTRES (R.) et ILLES (S.), 1970. - Procédé de préparation d'éther de pétrole purifié pour l'analyse des résidus de pesticides. - Trav. Soc. Pharm. Montpellier, 30, 3, p. 219 - 226.
- MESTRES (R.), ILLES (S.) et CHEVALLIER (Ch.), 1970. - LE DDT n'était pas coupable. Cas d'une erreur due au diphényles chlorés d'un emballage plastique. - Trav. Soc. Pharm. Montpellier, 30, 3, p. 227 - 236.
- MESTRES (R.), ILLES (S.), GUNTHER (F.A.) et OTT (D.E.), 1971. - Préparation automatique des extraits pour la recherche des résidus de pesticides dans les eaux naturelles. - Trav. Soc. Pharm. Montpellier, 31, 1, p. 13 - 20.
- MESTRES (R.) et ILLES (S.), 1971. - Expérience de fixation de plastifiant chlorés par des poissons. - Trav. Soc. Pharm. Montpellier, 31, 3, p. 237-244.
- MILLS (P.A.), BONG (B.A.), KAMPS (L.R.) et BURKE (J.A.), 1972. - Elution solvent system for florisol column cleanup in organochlorine pesticide residue analyse. - J. A. O. A. C. 55, 1, p. 39 - 43.
- MURPHY (P. G.), 1972. - Sulfuric acid for the clean-up of animal tissues for analysis of acid-stable chlorinated hydrocarbons residues. - J. A. O. A. C. 55, 6, p. 1360 - 1362.
- RICHARDSON (A.), ROBINSON (J.), CRABTREE (A.N.) et BALDWIN (M.K.), 1971. - Residues of Polychlorobiphenyls in biological samples. - Pestic. Monit. J. 4, 4, p. 169 - 176.
- STALLING (D. L.), TINDLE (R.C.) et JOHNSON (J. L.), 1972. - Cleanup of pesticide and polychlorinated biphenyl residues in fish extracts by Gel Permeation Chromatography. - J. A. O. A. C., 55, 1, p. 32 - 38.
- TEN BERGE (W.F.) et HILLEBRAND (M.), 1974. - Organochlorine compounds in several marine organisms from the north sea and the dutch wadden sea. - Neth. J. Sea Res. 8, 4, p. 361 - 368.

- UTHE (J.F.), REINKE (J.) et GESSER (H.), 1972. - Extraction of organochlorine pesticides from water by porous polyurethane coated with selective absorbent. - Environ. Lett. 3, 2, p. 117 - 135.
- WILLIAMS (R.) et HOLDEN (A.V.), 1973. - Organochlorine résidues from plankton. - Mar. Poll. Bull. 4, 7, p. 109 - 111.
- ZITKO (V.), 1971. - Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in some freshwater and marine fishes. - Bull. Environm. contam. Toxicol. 6, 5, p. 464 - 470.
- ZITKO (V.), 1971. - Effets of pesticide - grade hexanes on the silicic acid chromatography of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides. - J. Chromatogr. 59, p. 444 - 445.
- ZWEIG (G.), 1973. - Analytical methods for pesticides and plant growth regulators - V 1 à 7.
- =====

B - LES TENSIO-ACTIFS ANIONIQUES

Parmi les molécules présentant des propriétés tensio-actives, on distingue des composés anioniques, cationiques, non ioniques et ampholytes. En raison de leur emploi massif dans les lessives ménagères, ce sont les dérivés anioniques que l'on retrouve le plus fréquemment dans le milieu marin. Ils sont composés essentiellement d'alkylbenzènesulfonates, d'alkylsulfonates, d'alkylsulfates et d'alkylcarboxylates dont la chaîne hydrocarbonée comporte de 10 à 20 atomes de carbone.

De nombreuses méthodes analytiques ont été développées pour les rechercher dans les eaux car, en raison de leur relative stabilité, ils peuvent être considérés comme des traceurs des déversements urbains.

Nous nous limiterons ici aux méthodes de dosage des tensio-actifs anioniques dans les eaux littorales.

1. CONDITIONNEMENT DES ECHANTILLONS

Les tensio-actifs conservés en milieu clos peuvent être adsorbés sur les parois des récipients et subir des réactions de biodégradation. COSSA (1973) a montré que des échantillons d'eau de mer, contenant 100 µg/l de détergent, congelés à - 10° C en flacon de polyéthylène, étaient relativement stables pendant trois semaines. Par contre au-delà de 24 h de stockage à la température ambiante, on pouvait noter chez les mêmes échantillons une diminution non négligeable de la concentration initiale.

2. TECHNIQUES ANALYTIQUES EN USAGE

Il est possible de doser les tensio-actifs anioniques en utilisant la polarographie (JEHRING 1966 ; PHILIPPS 1967), la titrimétrie (EPTON 1948), la spectrophotométrie infrarouge et la colorimétrie au vert de méthyle (ABBOTT 1963). Ces méthodes sont cependant peu usitées en raison, soit de leur complexité, soit de leur manque de sensibilité.

•/....

Les techniques les plus employées procèdent par complexation du bleu de méthylène ou de l'orthophénantroline avec le radical sulfonate du tensio-actif.

Suivant les teneurs à doser, il peut être nécessaire de pratiquer une préconcentration des échantillons avant d'appliquer l'une ou l'autre de ces deux méthodes.

2.1. Préconcentration des échantillons

Le charbon actif, les résines cationiques fortement basiques et certains copolymères peuvent fixer de manière quasi quantitative les alkylbenzènesulfonates.

Les liaisons entre les chaînes hydrophobes et le charbon actif, plus solides que celles obtenues avec le gel de silice ou l'alumine, sont difficilement déplacées par élution. SALLEE et FAIRING (1956) obtiennent un taux de récupération compris entre 70 et 95 % par ébullition en milieu alcalin. L'absorption se faisant de manière non sélective, les éluats contiennent fréquemment des matières organiques indésirables que l'on doit éliminer.

Certains auteurs dont COSSA (1973), ont montré que, parmi les résines anioniques fortement basiques, la DUOLITE A-102.D possède une capacité d'échange très élevée. Au bout de 72 h de contact à 60° C avec une solution à 1 mg/l de dodécylbenzènesulfonate, le taux de fixation dépasse 95 %. L'élution par une solution de méthanol ou d'acétone à 50 % dans l'acide chlorhydrique normal, ne permet de recueillir que 75 % du produit fixé. D'autre part, les valeurs des densités optiques des essais à blanc sont élevées en raison de l'interférence des sulfates, chlorures, nitrates, phosphates et matières organiques dissous.

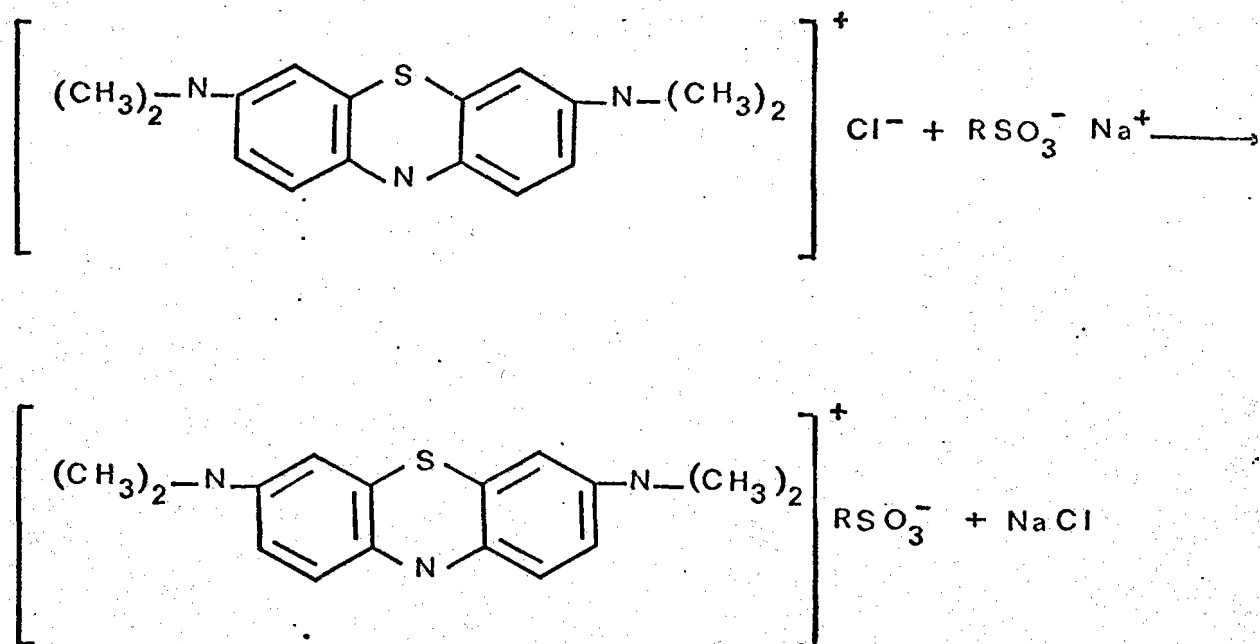
RAYBAUD (1972) obtient de bons résultats en utilisant une résine copolymère styrène - divinylbenzène, éluee par le méthanol. Les rendements de fixation et d'élution sont supérieurs à 90 %.

./...

L'emploi des absorbants ou des résines pour la préconcentration des échantillons contenant des traces de tensio-actifs, donne souvent des résultats peu reproductibles. L'utilisation d'une méthode de dosage très sensible est souvent préférable quand cela est possible.

2.2. Méthodes au bleu de méthylène

Les tensio-actifs anioniques par liaison du radical sulfuré avec le bleu de méthylène, forment un complexe coloré extractible par le chloroforme, suivant la réaction :



Le spectre d'absorption de la lumière par ce complexe présente un maximum correspondant à la longueur d'onde 650 m μ . La relation entre densité-optique et concentration est linéaire (Loi de Beer-Lambert) pour des concentrations comprises entre 50 et 100 $\mu\text{g/l}$.

Cette méthode a surtout été développée grâce aux travaux de ABBOTT(1962). Ce dernier procède à trois doubles extractions successives au chloroforme, sur le complexe formé d'abord en milieu alcalin puis en milieu acide. Les phases chloroformiques réunies sont ajustées à un volume déterminée et leur absorption est mesurée à 650 m μ .

Les milieux tampons alcalins et acides sont respectivement constitués par du tétraborate de sodium 0,05 M additionné d'une quantité égale de soude 0,1 N et par de l'acide sulfurique normal.

Les impuretés dues aux produits d'oxydation du bleu de méthylène sont éliminées en milieu alcalin comme en milieu acide par lavage au chloroforme.

En utilisant cette technique, COSSA (1973) dose avec une précision de 20 %, des concentrations de l'ordre de 50 μ g de dodé-cylbenzènesulfonate par litre d'eau de mer. Pour des teneurs supérieures à 100 μ g/l la précision est améliorée mais elle est rarement inférieure à 5 %.

Les teneurs relevées dans les eaux littorales étant fréquemment inférieures à 50 μ g/l, cette méthode ne peut être employée que dans des zones où les niveaux de contamination sont particulièrement élevés : voisinage des émissaires, estuaires fortement urbanisés.

2.3. Méthodes à l'orthophénantroline

LE BIHAN et COURTOUCOPEZ (1970), ont publié une méthode originale de dosage des tensio-actifs anioniques par formation d'un complexe avec l'orthophénantroline cuivrique. Le cuivre du complexe extrait par la méthylisobutylcétone est dosé par spectrophotométrie d'absorption atomique à 324,7 m μ .

Des teneurs équivalentes en dioctylsulfosuccinate (Manoxol O.T.) comprises entre 10 et 500 μ g/l peuvent être dosées dans l'eau de mer avec une précision de l'ordre de 5 % pour des concentrations supérieures à 50 μ g/l.

./.....

COSSA (1973) a notablement amélioré la sensibilité de cette méthode en procédant sous agitation magnétique dans une fiole de un litre.

950 ml d'échantillon filtré sur millipore $0,45 \mu$ sont maintenus sous agitation magnétique tandis qu'on ajoute 10 ml d'HCl N et 10 ml d'une solution de sulfate d'orthophénantroline à 0,025 M. Après homogénéisation 10 ml de méthylisobutylcétone sont introduits et l'agitation est maintenue pendant deux minutes. La phase organique décantée est pipetée et l'extraction est répétée avec 10 ml de solvant. Les deux fractions sont réunies, et leur densité optique (A) est lue à 324,7 $m\mu$. La phase aqueuse est ensuite épuisée par quatre fois 25 ml de solvant, la densité optique de la dernière fraction constituant la valeur du blanc (B). La teneur en tensio-actif est proportionnelle à la différence A - B (Loi de Beer-Lambert).

Les densités optiques ^{sont} comparées à celles obtenues avec une gamme de concentrations étalon établies à partir d'un tensio-actif bien défini. Généralement le dodécylbenzènesulfonate, le dioctylsulfosuccinate de sodium (Manoxol O.T.) et le sulfate de sodium d'alcool trioxyéthyléné sont retenus comme produits étalons. Les différentes courbes étalons reportées sur la figure n° 1 montrent que le Manoxol O.T. qui occupe une position intermédiaire constitue un excellent produit de référence.

2.4. Méthodes automatiques

La méthode manuelle de dosage au bleu de méthylène a été adaptée sur autoanalyseur par SÖDERGREN (1966).

COSSA (1973) a d'une part obtenu une meilleure séparation de la phase chloroformique en supprimant les entrées d'air, d'autre part supprimé la dérivé de la ligne de base par lavage du circuit avec une solution d'acide acétique à 5 %.

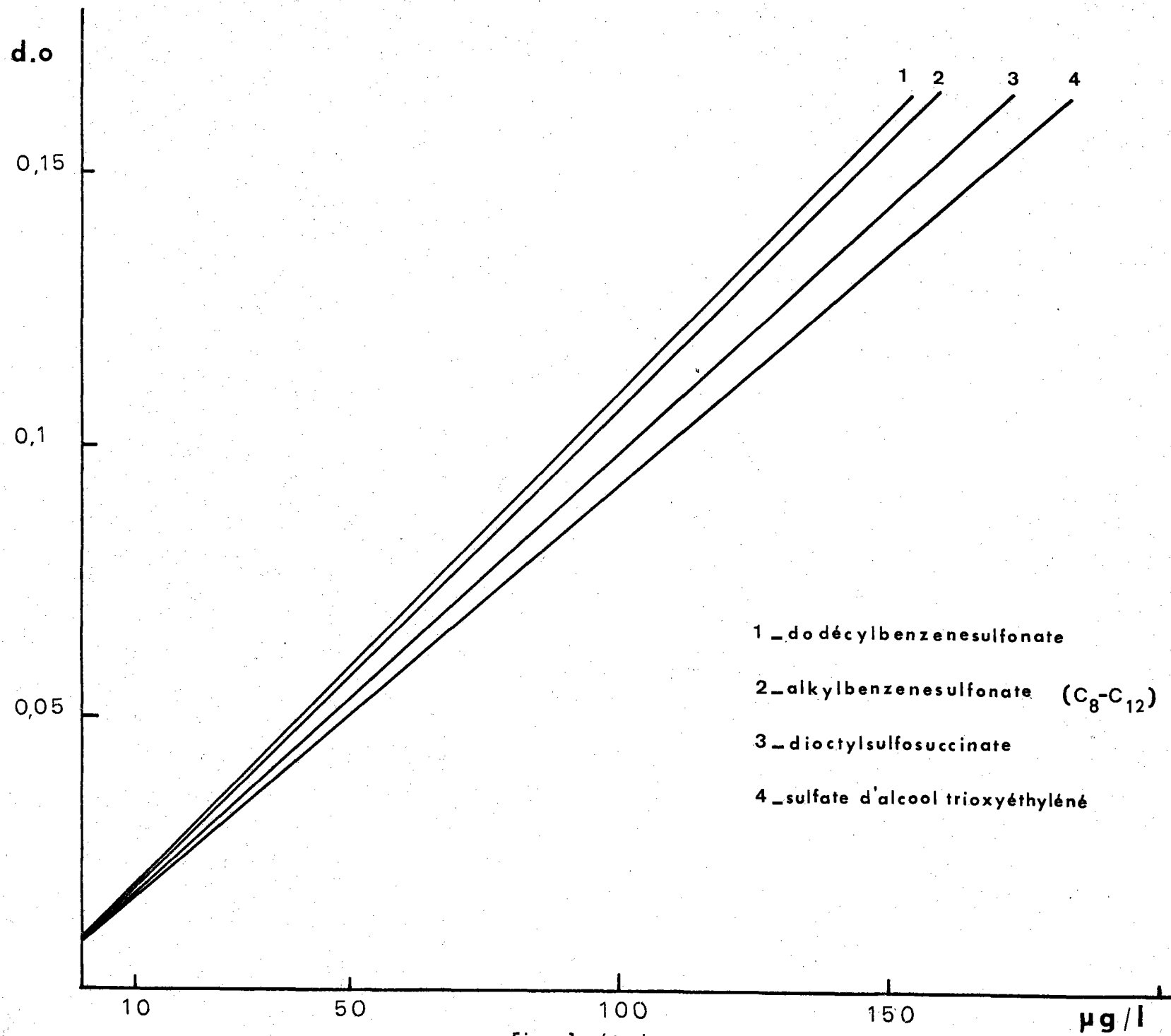


Fig : 1 - étalonnages

Le "manifold" utilisé est indiqué sur le schéma n° 2, et les réactifs employés sont les suivants :

- bleu de méthylène alcalin (BM.OH⁺)
600 ml de tampon borate (pH 10,6) et 50 ml d'une solution mère de bleu de méthylène à 0,25 g/l sont lavés par 50 ml de chloroforme puis 50 ml d'éther de pétrole,
- bleu de méthylène acide (BM.A)
100 ml de tampon borate + 1 000 ml d'eau distillée et 50 ml de solution mère de bleu de méthylène sont lavés quatre fois par 50 ml de chloroforme puis additionnés de 100 ml d'acide sulfurique normal,
- chloroforme "pour analyse" redistillé.

Dans ces conditions, la cadence de l'autoanalyseur est de sept échantillons par heure, le seuil de détection se situe aux environs de 50 µg/l et la courbe d'étalonnage est linéaire entre 100 et 1 000 µg/l. La précision est de l'ordre de 10 et 20 % pour les concentrations, respectivement supérieures et inférieures à 500 µg/l.

3. AVANTAGES DES DIFFERENTES METHODES

Les teneurs en tensio-actifs anioniques des eaux littorales sont généralement inférieures à 50 µg/l et excèdent très rarement 100 µg/l. La méthode d'analyse qui sera retenue doit donc être suffisamment sensible pour permettre avec précision le dosage de traces inférieures à 10 µg/l.

La méthode au bleu de méthylène ne peut atteindre cet objectif qu'après une étape de préconcentration sur résine alors que la spectrophotométrie d'absorption atomique du complexe orthophénantroline - détergent, permet de déceler directement moins de 5 µg/l.

Les performances respectives de chacune de ces méthodes ainsi que les équipements nécessaires sont rassemblés dans le tableau n° 4.

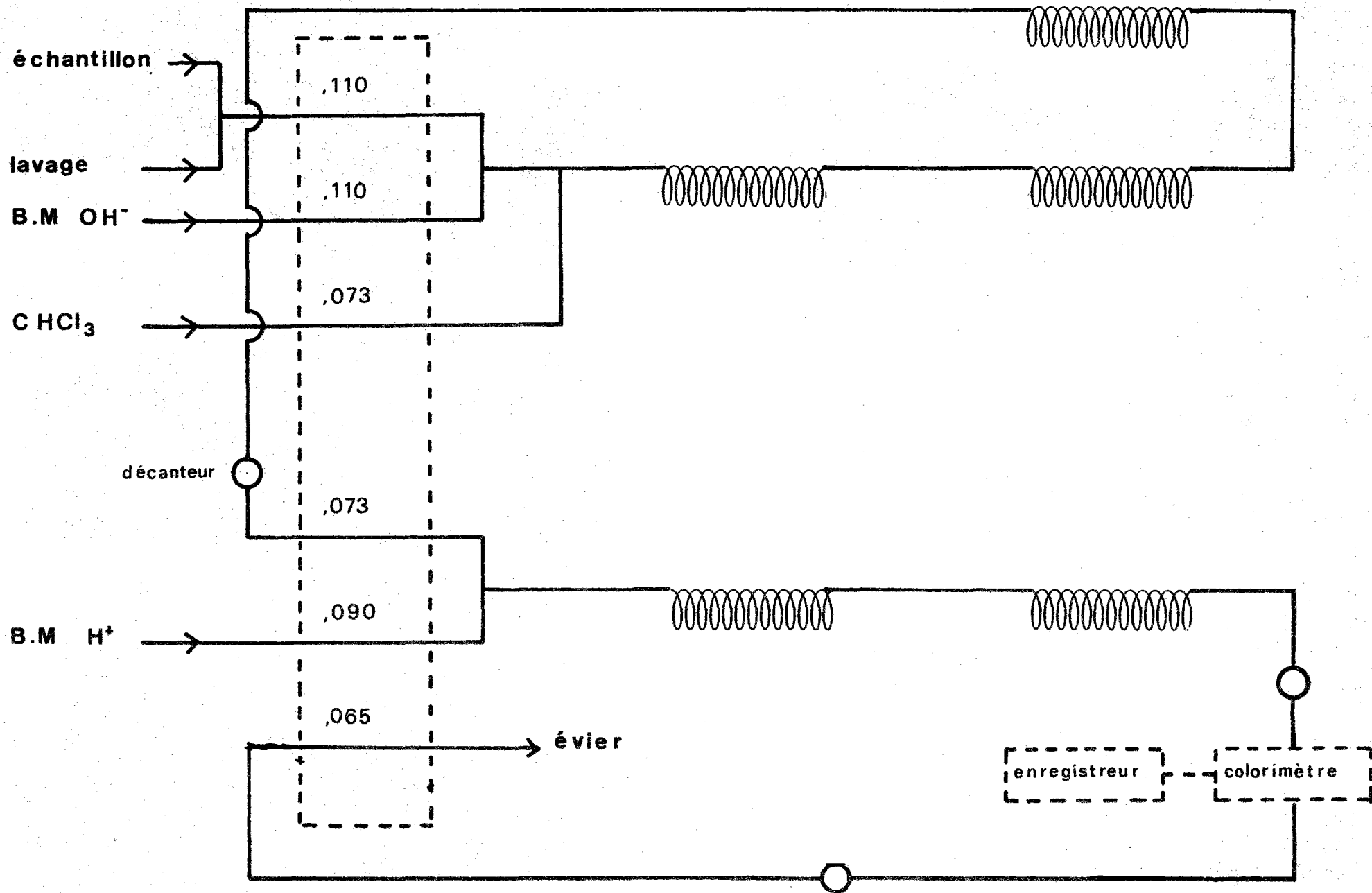


Schéma: 2 - Analyse automatique des détergents

Méthode	Seuil de détection en µg/l	Précision %		Inter-férences	Volume de la prise d'essai en l.	Durée de l'analyse d'une série en heures	Equipement nécessaire
		< 50 µg/l	> 50 µg/l				
Bleu de méthylène avec préconcentration de l'échantillon	1 à 2	20	10	sulfures sulfates thiosulfates protéines	10	16	Spectrophotomètre visible
Orthophénantroline cuivrique	2	5	5	sulfures supprimés par addit. H ₂ O ₂	1	4	Spectrophotomètre d'absorption atomique

TABEAU N° 4 : Caractéristiques des méthodes de dosage au bleu de méthylène et à l'orthophénantroline cuivrique.

L'examen de ce tableau montre que la méthode au bleu de méthylène est sujette à un plus grand nombre d'interférences, nécessite un volume d'échantillon plus important, de réalisation plus longue.

Par contre, l'utilisation d'un spectrophotomètre d'absorption atomique rend la technique à l'orthophénantroline cuivrique plus onéreuse en matériel d'équipement.

4. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABBOTT (D.C.), 1962. - The colorimetric method for determination of surface active materials in water. - *The Analyst* 87 p. 286 - 293.
- COSSA (D.), 1973. - Contribution à l'étude de la pollution du milieu marin par les détergents anioniques. - Thèse de doctorat. Université de Nantes.
- EPTON (S.R.), 1948. - A New method for the rapide titrimetric analysis of ABS and related compounds. - *Trans. Faraday Soc.*, 44, p. 226-230.
- JEHRING, 1966. - *Abh. Dent. Akad. Wiss (Berlin) KI. chem. Geol. Biol.* 6, p. 197.
- LE BIHAN (A.), et COURTOT-COUCPEZ (J.), 1970. - "Dosage des traces de détergents anioniques et cationiques dans l'eau de mer et les eaux douces par spectrophotométrie d'absorption atomique". - *Bull. Soc. Chim. de France*, 1, p. 406 - 411.
- PHILLIPS (S.L.), 1967. - Effects of surfactants on Polarographic currents times curves. - *Anal. chem.*, 39, p. 679 - 681.
- RAYBAUD (H.), 1972. - Les biocides organochlorés et les détergents anioniques dans le milieu marin. Thèse 3ème cycle (Océanographie biologique Marseille).
- SALLEE (E.M.) et FAIRING (J.D.), 1956. - Determination of traces amounts of alkylbenzene sulfonates in water. - *Anal. Chem.* 28, p. 1822-1826.
- SÖDERGREN (A.), 1966. - An Automatic Method for the determination of Anionic Surface active Material in Water. - *The Analyst*, 91, p. 113-118.

C - LES HYDROCARBURES

1. INTRODUCTION

L'analyse des hydrocarbures dans le milieu marin est l'un des problèmes les plus compliqués que l'on doit résoudre pour le contrôle de la qualité du milieu naturel. Tout le monde sait en effet que les produits pétroliers d'origine fossile (pétroles bruts et produits de raffinage) sont des mélanges complexes de plusieurs centaines de constituants. La nécessité d'obtenir une sensibilité extrêmement basse devrait donc logiquement conduire à analyser globalement des familles de composés plutôt que chacun d'entre eux individuellement. Mais il faut tenir compte du fait que certains hydrocarbures sont d'origine récente et qu'on ne peut sans erreur grossière les confondre avec ceux d'origine fossile. Or, il se trouve que dans toutes les familles d'hydrocarbures que l'on pourrait détecter globalement avec une bonne sensibilité figurent à la fois des hydrocarbures d'origine fossile et des hydrocarbures d'origine biogénique récente.

Les hydrocarbures d'origine fossile (pétroles bruts ou de raffinage) contiennent le plus souvent une série de N-paraffines dont la longueur de chaîne va au maximum de C1 à C60 mais avec le plus souvent des séries consécutives plus courtes, par exemple C10 à C25 pour un fuel-oil. Les chaînes à nombre de carbones pairs et les chaînes à nombre de carbones impairs sont en proportions sensiblement égales. On y trouve également des hydrocarbures saturés à chaîne ramifiée notamment le phytane et le pristane. Les hydrocarbures aromatiques y sont nombreux, du benzène au benzo 3-4 pyrène, mais ce dernier ainsi que les autres hydrocarbures polyaromatiques sont surtout leur origine dans les gaz d'échappement des moteurs. Notons que les hydrocarbures oléfiniques (insaturés) sont à peu près absents des pétroles bruts et abondants dans les produits de raffinage. Dans ces mélanges complexes il est important de remarquer qu'il existe le plus souvent des familles de produits homologues ou isomères (1) et que la connaissance de ces groupes est utile pour l'identification des sources d'hydrocarbures.

./....

Les hydrocarbures de synthèse récente sont également nombreux dans l'environnement marin et il est possible de les retrouver aussi bien dans les organismes qui les synthétisent que dans l'eau ou dans d'autres organismes qui les ont accumulés. L'un des exemples les plus connus concerne la synthèse du pristane à partir du phytol (2).

Toutes les familles d'hydrocarbures existent naturellement dans les organismes vivants (3 - 4). Les n-alcanes sont synthétisés dans les organismes marins. Curieusement, les composés à nombre de carbones impairs prédominent par rapport aux autres bien que tous les termes consécutifs soient souvent présents. Ainsi dans le phytoplancton, les n-alcanes en C15, C17, C19 et C21 sont prédominants (4 - 5), d'autres algues contiennent surtout les termes impairs de C21 à C29. Toutefois, chez certaines bactéries qui synthétisent les n-alcanes entre C25 et C32 on ne note pas cette différenciation entre les termes pairs et impairs (6). Les hydrocarbures saturés à chaînes ramifiées sont parfois les plus abondants dans certains organismes marins. Parmi eux, le pristane qui est le plus abondant dans la chair et le foie de certains élastomobranches ; on l'a détecté aussi à la surface de la mer (7 - 8). Les hydrocarbures insaturés (oléfines) d'origine biogéniques sont nombreux. Parmi eux, le squalène abondant dans l'huile de foie de requin et présent dans les foies de morue. On trouve également des hydrocarbures en C18, C20 et C21 dans les algues benthiques, phytoplanctoniques ou dans le zooplancton (C20 - C21 - C22). Les carotènes très abondants dans les coquillages sont des hydrocarbures insaturés.

Cette revue succincte des hydrocarbures d'origines diverses dans le milieu marin permettra de mieux comprendre l'étude critique des méthodes analytiques proposées dans la littérature et qui sont plus ou moins spécifiques de certains types particuliers.

Le mode opératoire de ces procédés analytiques comporte généralement les opérations suivantes :

- prélèvement et conditionnement des échantillons,
- extraction de la fraction lipidique,
- purification de l'extrait,
- analyse des hydrocarbures.

./...

Ces différentes étapes dépendent non seulement des échantillons à traiter mais aussi de la technique envisagée pour la mesure finale.

2. PRELEVEMENT DES ECHANTILLONS ET CONDITIONNEMENT

2.1. Eau de mer

Il existe de nombreuses tentatives pour prélever des films minces d'hydrocarbures à la surface de l'eau. LARSSON et al (9) décrivent un plateau en téflon alvéolé susceptible de prélever une surface de 100 cm². CHANG et JADAMEC (10) décrivent quatre systèmes testés par les U. S. Coast Guards mettant en jeu divers produits absorbants. GORDON et KAISER (11) utilise un procédé dénommé "SLURP" déjà décrit par GOERING et MENZEL (12) permettant de prélever par aspiration quelques centaines de millilitres d'eau de surface sans qu'une relation directe puisse être faite entre volume et surface échantillonnée. Les résultats obtenus par ces diverses méthodes sont peu reproductibles. On ne peut attacher à ces données qu'une valeur statistique. Ils présentent cependant un intérêt puisque le film superficiel contient la majeure partie des hydrocarbures présents dans la colonne d'eau : GORDON et KAISER (11), MACKIE et al (13).

Les prélèvements d'eau subsuperficielle nécessitent de grandes précautions pour éviter les risques de contamination. Il est exclu d'utiliser les bouteilles à prélèvements et les treuils hydrographiques classiques. GORDON et KAISER (11) ont parfaitement démontré que ces moyens étaient inadéquats. La meilleure solution consiste à prélever l'échantillon directement dans le flacon en verre destiné au stockage de l'échantillon en évitant ainsi le contact de l'intérieur du flacon avec le film de surface. Le processus adopté dans le cadre du projet IGOSS (14)* est le suivant : 50 ml de CCl₄ exempt d'hydrocarbures sont placés dans un flacon propre en verre brun de 3-4 litres. La bouteille est maintenue fermée par une capsule à vis,

./.....

* IGOSS : Integrated Global Ocean Station System, crée à l'instigation de la Commission Océanographique Internationale (I O C) et l'Organisation Météorologique mondiale (W M O).

dégraissée, jusqu'au moment de son utilisation. Cette préparation doit être faite en laboratoire. Immédiatement avant usage, la bouteille est débouchée et mise dans un support lesté (fig. 1). Avant que le bateau stoppe complètement, l'ensemble est jeté aussi loin que possible par dessus le bastingage. La bouteille coule immédiatement et se remplit. Elle est ensuite remontée et quelques millilitres éliminés pour l'expansion thermique. Le flacon est ensuite soigneusement bouché. Le CCl_4 est considéré comme bactériostatique efficace et aucune autre mesure n'est nécessaire pour le stockage des échantillons. Si l'on s'intéresse exclusivement aux hydrocarbures dissous, il ne faut pas mettre de CCl_4 dans le flacon avant prélèvement mais effectuer d'abord une filtration sur filtre en fibre de verre prénettoyé. Cette opération suivie de l'addition de CCl_4 à l'échantillon pour sa conservation doit être pratiquée aussitôt que possible. Cette méthode n'est malheureusement pas convenable pour les prélèvements très profonds. Des solutions nouvelles et efficaces sont donc attendues en ce domaine.

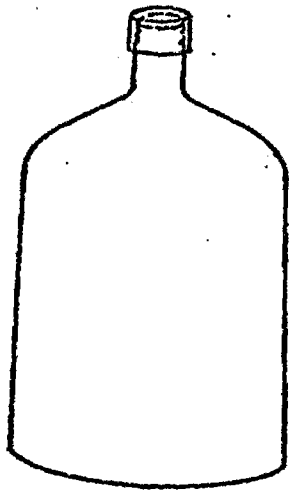
2.2. Sédiments

Les sédiments doivent être prélevés par un système qui respecte leur structure et permette d'isoler aisément les 5 centimètres superficiels de la couche sous-jacente.

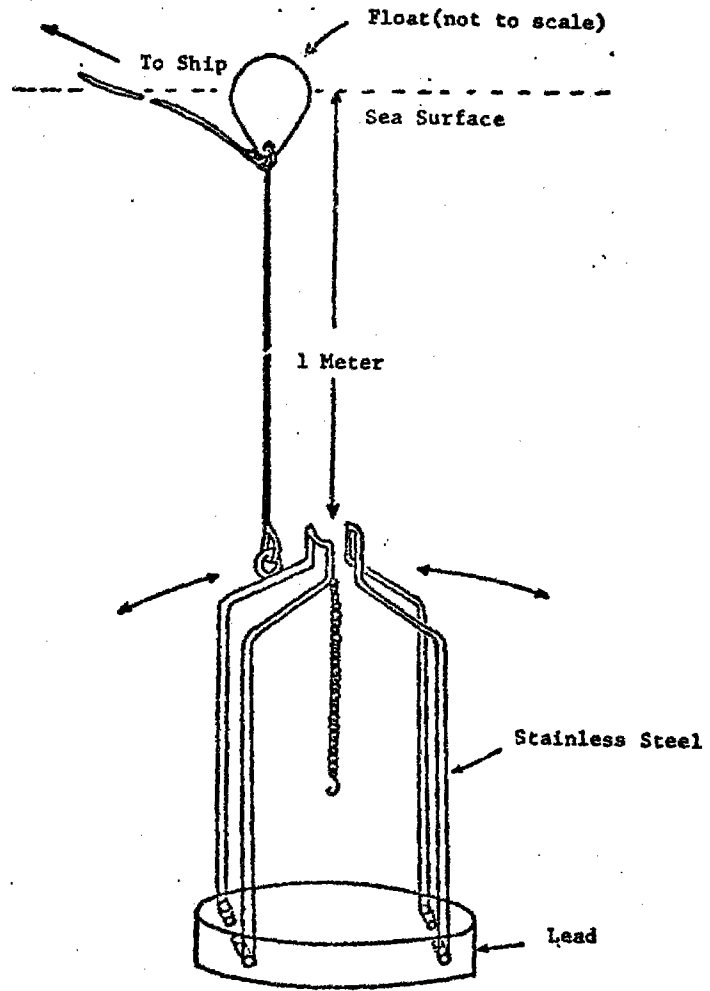
Les échantillons doivent être stockés dans des récipients en verre à fermeture hermétique et conservés à -20°C jusqu'à leur analyse.

Il faut noter selon STRAUGHAM (15) que l'échantillonnage d'un lieu déterminé doit s'effectuer de manière statistique pour avoir quelques valeurs et le tableau I peut témoigner des écarts possibles en un même lieu.

./....



Sample Bottle with Cap



Bottle Holder with Floatation Unit

Figure 1.

DISSOLVED HYDROCARBON SAMPLING DEVICE

ECHANTILLON	A	B	% Différence
1	110	460	318
2	340	390	15
3	400	730	82
4	3 800	4 600	21
5	4 000	4 700	18
6	4 200	4 800	14
7	5 200	5 800	12
8	20 000	25 000	25

Tableau I : Matières organiques en mg/l extraites par CCl_4 dans la couche superficielle de 8 échantillons de sédiments ⁴ prélevés dans une même zone. Les analyses sont faites en 2 exemplaires A et B. (STRAUGHAM, 1974).

2.3. Matériel biologique

Les organismes vivants sont habituellement conservés à $-20^{\circ} C$ dans des flacons en verre soigneusement nettoyés au préalable. L'utilisation de carboglace permet le transport des échantillons dans des conditions convenables. STRAUGHAM (15) envisage même le stockage à long terme des échantillons dans un freezer à $-70^{\circ} -80^{\circ} C$.

Avant stockage, les échantillons de coquillages doivent être lavés à l'eau propre afin de les débarrasser des sédiments ou autres salissures externes. Autant que possible, ils seront également débarrassés de leurs coquilles avant congélation.

Les échantillons de plancton peuvent être prélevés par les moyens classiques en utilisant des filets dont les mailles correspondent à l'échantillonnage désiré. Il faut cependant tenir compte d'une part des

./...

micro "Tar balls" récupérés et d'autre part de la contamination de l'échantillon par le film d'huile à la surface de l'eau. Ces deux sources d'hydrocarbures sont susceptibles de fausser totalement l'analyse du matériel biologique récolté. GRICE et al (42) ont décrit une méthodologie très précise qui a été par la suite recommandée pour le projet IGOSS.

3. TECHNIQUES ANALYTIQUES EN USAGE

3.1. Extraction de la phase lipidique

3.1.1. Dans l'eau

Les lipides contenus dans l'eau de mer peuvent être extraits au moyen de divers solvants : éther de pétrole, pentane, chlorure de méthylène, chloroforme, tétrachlorure de carbone. Ce dernier est le plus utilisé car il est pratique de manipulation et peu servir au dosage ultérieur par spectrométrie infrarouge.

En pratique, les échantillons de 3-4 litres conservés dans des flacons en verre peuvent être extraits par deux fois 50 ml de solvant directement dans ce flacon ce qui évite des risques supplémentaires de contamination. Un agitateur magnétique avec barreau aimanté en téflon permettent une bonne extraction en un temps d'une dizaine de minutes.

3.1.2. Dans les sédiments et les matériaux biologiques

L'extraction des hydrocarbures dans ces échantillons peut mettre en oeuvre des techniques extrêmement variées (tableau II).

En fait, les solutions classiquement adoptées font appel à une extraction par solvant binaire sur un échantillon préalablement desséché. La dessiccation peut être réalisée par lyophilisation ou par utilisation de sulfate de sodium anhydre car il faut éviter le chauffage qui provoque une modification du spectre hydrocarboné. L'extraction est réalisée par des mélanges benzène/méthanol ou pentane/acétone.

L'homogénéisation des échantillons en présence de sulfate de sodium, de pentane et d'acétone permet de récupérer facilement et efficacement la fraction lipidique dans les sédiments et les matériaux biologiques.

Technique d'extraction	Application	Echantillon requis	Equipement nécessaire
1 - Extraction au Soxhlet par un mélange benzène/méthanol ou d'autres systèmes solvants de même polarité.	Echantillon frais, congelé, humide ou lyophilisé.	1 g minimum couramment 10 à 40 g poids humide.	Soxhlet Décanteurs Evaporateur rotatif.
2-Saponification, extraction par CCl_4 ou les solvants ci-dessus.	" " "	" " "	Appareil à ultra-sons Décanteurs Evaporateur rotatif.
3 - Extraction à la vapeur suivie d'une extraction à l'éther éthylique.	Echantillon frais, congelé ou humide (hydrocarbures légers).	1 à 10 g poids humide.	Appareil d'extraction à la vapeur Décanteurs.
4 - Homogénéisation, dessiccation au sulfate de sodium et extraction au pentane.	Echantillons frais, congelés humides ou lyophilisés.	1 g minimum couramment 10 à 40 g poids humide.	Homogénéiseur ou broyeurs divers.
5 - Homogénéisation avec sulfate de magnésium et sable puis extraction par solvant.	" " "	" " "	Mortier.
6 - Digestion dans la potasse alcoolique.	" " "	" " "	Appareil à reflux.
7 - Extraction par solvant puis saponification.	Extrait lipidique	10^{-3} g	Tube à centrifugation centrifugeuse.
8 - Stripping par l'hélium à 120°C.	Sédiment humide	0,5 g	Système de stripping piégeage et chromatographe
9 - Stripping par l'azote à 20°C en phase aqueuse.	" "	"	idem + spectrographe de masse.
10 - Vaporisation directe de l'échantillon dans un spectrographe de masse.	Sédiment sec	0,05 g	Spectrographe de masse.

Tableau II : Techniques d'extraction des hydrocarbures dans des échantillons biologiques ou des sédiments.
D'après CLARK (16) 1974.

3.2. Purification des extraits

3.2.1. Saponification

La saponification des extraits lipidiques par la potasse méthanolique est encore utilisée par certains auteurs : FARRINGTON et al (17), MEDEIROS (18). Elle permet d'éliminer la majeure partie des acides gras et de leurs dérivés. Cependant, c'est une opération longue 24 à 36 heures et qui ne supprime pas la nécessité d'une étape ultérieure de purification chromatographique.

3.2.2. Purification par chromatographie

Le choix de la technique de purification dépend de la nature de l'échantillon initial et de la technique de mesure finale. La chromatographie liquide-solide permet de résoudre la plupart des problèmes par un choix convenable de l'absorbant ou du mélange d'adsorbants et du solvant ou système de solvant d'élution (Tableau III).

La chromatographie sur colonne de silice permet de séparer les hydrocarbures des autres matériaux. L'utilisation d'alumine permet d'éliminer des composés polaires de haut poids moléculaire (CLARK, 16). On peut réunir ces deux adsorbants pour combiner leurs propriétés. Il est toutefois nécessaire de les désactiver par 5 % d'eau pour éviter des artéfacts par dégradation de molécules autres que les hydrocarbures.

Les extraits déjà purifiés par saponification peuvent être traités sur de courtes colonnes contenant 4 g d'alumine à 5 % d'eau sur 4 g de silice à 5 % d'eau : FARRINGTON (17). Les hydrocarbures paraffiniques sont alors élués par 20 ml de pentane environ. Les hydrocarbures oléfiniques ou aromatiques sont élués à la suite par le benzène ou un mélange pentane/benzène 4 : 1.

La purification directe des extraits lipidiques peut être réalisée directement avec des systèmes d'absorbants et d'éluants identiques. Il faut alors utiliser des colonnes beaucoup plus grandes. EHRARDT (22) utilise 100 g de silice à 5 % d'eau et 100 g d'alumine à 6 % d'eau.

/.....

Volume de l'extrait	Adsorbant	Diamètre de la colonne	Référence
20 ml	Florisil 5 g	1 cm	AFNOR (19)
25 ml	Alumine 10 g	1 cm	CARLBERG (20)
25 - 125 ml réduit à 2 ml	Silice CCl ₄ + 1 % pentane → H.C. Saturés CHCl ₃ + 1 % benzène → Aromatiques		BROWN (21)

Tableau III : Purification des extraits lipidiques par chromatographie.

On peut aussi traiter les extraits lipidiques par le florisil qui est un silicate de magnésium synthétique. Il est utilisé dans la norme AFNOR (19) pour la purification des extraits d'hydrocarbures issus de l'eau. D'après l'expérience de l'auteur, il est possible de traiter dans de bonnes conditions 200 mg d'extraits lipidiques issus de tissus vivants par seulement 6 g de florisil. L'élution par le pentane (40 ml) puis par 40 ml d'un mélange pentane/benzène 4 : 1 permet d'éluer successivement les paraffines puis les hydrocarbures insaturés.

3.3. Identification et analyse des hydrocarbures

3.3.1. Spectrométrie infrarouge

La teneur en hydrocarbures dans l'eau peut être déterminée par spectrométrie infrarouge par mesure de l'absorption due aux vibrations C-H dans la zone de 2920 - 2930 cm⁻¹.

L'extrait CCl₄ obtenu doit préalablement être séché sur sulfate de sodium puis par chromatographie d'adsorption pour éliminer les matériaux indésirables. Les techniques de purification utilisées sont variables selon les auteurs, elles sont schématisées dans le tableau III.

/.....

L'extrait purifié est placé dans une cuve en quartz de 1 à 5 cm de trajet optique selon la sensibilité requise. Une cuve de référence de même dimension permet d'annuler l'absorption due au solvant. L'enregistrement du spectre d'absorption entre 2800 et 3200 Cm^{-1} peut fournir des indications sur la nature des hydrocarbures, mais le maximum d'absorption se situe généralement à 2920 - 2930 Cm^{-1} . La quantité d'hydrocarbures contenue dans l'échantillon est donc mesurée à cette longueur d'onde avec étalonnage par un mélange d'hydrocarbures de référence : 37,5 % de N-hexadécane, 37,5 % d'isooctane et 25 % de benzène selon CARLBERG (20).

La limite de détection est classiquement de 0,05 mg/l bien que BROWN (21) indique une sensibilité de 0,006 mg/l.

3.3.2. Spectrométrie U. V.

L'utilisation de la spectrophotométrie U. V. permet d'indiquer la présence d'hydrocarbures aromatiques. Elle a été utilisée par FARRINGTON pour contrôler les diverses fractions obtenues en chromatographie. Cependant, sa faible sensibilité (environ 1 mg/l) et la difficulté de quantifier des échantillons dont le coefficient d'extinction moléculaire est inconnu, expliquent les limitations de cette méthode.

3.3.3. Spectrofluorimétrie

Les hydrocarbures aromatiques à plusieurs noyaux ont la caractéristique d'être fluorescents et de permettre ainsi une autre approche analytique extrêmement sensible. LEVY (23) a décrit un mode opératoire repris depuis par de nombreux auteurs (11, 14, 24, 25, 26).

Les hydrocarbures sont extraits des échantillons d'eau par CCl_4 sans filtration préalable. L'extrait est ensuite évaporé à sec et repris par 5 ml de pentane. L'analyse est faite sur un spectrofluorimètre avec excitation à 310 nm, mesure de l'émission à 360 nm. L'étalonnage est réalisé avec un pétrole brut standard.

Cette méthode permet facilement d'atteindre une sensibilité de l'ordre de 0,001 mg/l d'équivalent pétrolier.

./...

Dans le cadre du projet IGOSS (monitoring des hydrocarbures à l'échelle mondiale) c'est la méthode de LEVY qui a été choisie comme méthode standard (14).

Il est possible d'améliorer la sélectivité de cette méthode en couplant un appareil de chromatographie liquide à haute pression avec un détecteur à fluorescence (CRETNEY, 26).

Par ailleurs, on peut citer une tentative de mesure de luminescence à température $< 100^\circ \text{K}$ par HORNIG (24) mais son intérêt est plus théorique que pratique.

3.3.4. Détecteur microcalorimétrique

Depuis de nombreuses années, ZSOLNAY (27, 28, 29, 30) a mis au point et utilise un détecteur microcalorimétrique mesurant l'augmentation de température due à l'adsorption des hydrocarbures sur une colonne chromatographique garnie de charbon actif. Ce détecteur a l'avantage d'être sensible et peu sélectif, c'est à dire de donner une réponse sensiblement équivalente pour les diverses familles d'hydrocarbures qu'il détecte au fur et à mesure de leur élution.

Cette méthode n'a cependant pas été diffusée peut être par manque de disponibilité du matériel hormis le prototype.

3.3.5. Chromatographie en phase gazeuse

C'est dans le domaine de la chromatographie en phase gazeuse que l'on relève les publications les plus nombreuses et les plus variées, tant pour l'identification que pour la quantification des hydrocarbures (9, 13, 16, 17, 18, 22, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39).

Les conditions générales d'utilisation sont les suivantes : l'extrait purifié est évaporé à sec sous léger vide et repris par le minimum de CS_2 . Une part de cette échantillon est injectée dans un chromatographe à température programmée dans la gamme 100 à 300°C . Les hydrocarbures sont mesurés en sortie par un détecteur à ionisation de flamme.

•/••••

TEMPERATURE DU FOUR	COLONNE	PHASES FIXES	GAZ VECTEUR	REFERENCE
80-290°C + 6°/min	8 1/2' x 1/46 "	3 % Apiezon L 80-100 Chrom WAW	5,6 ml/min N2	BIERI 1974
125°-270°C + 4°/min	2,34 m x 3,2 mm	3 % Apiezon L 80-100 Chrom W		FARRINGTON 1974
70-270° C + 6°/min	3,10 m x 3,2 mm	12 % FFAP 80-100 Chrom W		FARRINGTON 1974
60-332° C + 6°/min	5' x 1/8 "	1,5 % OV 101 100-120 Chrom HP	10/15 ml/min	MEDEIROS 1974
60-300° C + 8°/min	1,9 m x 3,2 mm	1,5 % RTV 502 80-100 Chrom GHP	29 ml/min N2	CLARK 1974
70-255° C + 6°/min	3,5 m x 2 mm	3 % OVI + 3 % OV17 100-120 Gas Chrom Q		WARNER 1974
80-290° C + 6°/min	S C O T 100 m	S E 30	He	MAYO 1974
150-350° C + 2°/min	S C O T 50'	O V I	He	EHRARDT 1974
100-300° C + 6°/min	2 m x 1/16"	3 % Apiezon L 80-100 Chrom W H P		BARBIER 1973
165-240° C + 2°/min	4 m x 1/8"	15 % S E 30		BLUMER 1970
165-250° C + 2°/min	10' x 1/8"	22 % Apiezon L 70-80 Chrom W		LARSSON 1974
80-210° C + 2°/min	Capillaire 50m 0,01"	5 % OV-1 80-100 Chrom W	2,3 ml/min	LARSSON 1974
150-275° C + 2°/min	Capillaire 50 m x 0,25 mm	20 % DEGS 80-100 Chrom W	2,5 ml/min N2	MACKIE 1972
120,190 ou 275° C	2 m x 4 mm	Apiezon L	35 ml/min N2	MACKIE 1974
75-275° C + 6°/min	SCOT 15 m x 0,5 mm	Dexil 300	15 ml/mm He	ZAFIRIOU 1973
		5 % Apiezon L		
		OV 101 ou Apiezon L		

Tableau IV : Revue des conditions opératoires utilisées en C.P.G. par divers auteurs.

Les paramètres variables portent essentiellement sur la taille et la nature des colonnes utilisées, la nature et la proportion des phases fixes, la quantité d'échantillon injectée, la vitesse de programmation de montée en température, la nature et le débit du gaz vecteur (tableau IV).

Toutes ces conditions permettent d'améliorer soit l'identification des hydrocarbures par une meilleure séparation, soit la sensibilité des mesures. Malheureusement, ces deux exigences sont antagonistes et il vaut souvent mieux faire un compromis permettant de concilier les deux.

La sensibilité des méthodes est rarement publiée par les auteurs. Elle dépend d'ailleurs de la nature et de la complexité des mélanges à analyser. Elle peut cependant être jugée suffisante pour mesurer le taux d'hydrocarbures habituellement rencontrés dans l'eau de mer et les organismes marins si l'on se réfère aux nombreuses réalisations existantes.

3.3.6. Spectrographie de masse

La spectrographie de masse couplée avec la chromatographie gazeuse est une méthode de choix pour l'identification individuelle des hydrocarbures issus d'échantillons marins.

Elle a été utilisée par plusieurs auteurs (EHRARDT, 22 - BARBIER, 34 - ZAFIRIOU, 40 - ANBAR, 41). Il est possible ainsi de préciser une fois pour toute l'identité de certains pics chromatographiques obtenus dans des conditions précises.

4. AVANTAGES DES DIFFERENTES METHODES

4.1. Critères de choix

Les méthodes requises pour contrôler le taux de contamination de l'eau de mer par les hydrocarbures doivent être suffisamment sensibles pour être utilisables non seulement dans les zones très polluées mais aussi dans les eaux du large. Les résultats disponibles à ce jour montrent qu'il est nécessaire d'atteindre une sensibilité de l'ordre du microgramme par litre (tableaux V et VI).

./....

Hydrocarbures	1	2	3
Rang ppb	10 - 63	9 - 67	4 - 442
Moyenne	23	33	18

Tableau V : D'après BROWN (21) hydrocarbures en surface mesurés en spectrométrie I. R. sur la route des tankers

- 1 - Golfe de Mexico - New York
- 2 - Mer des Caraïbes - New York
- 3 - La Spezia (Italie) Brega (Lybie)

Profondeur	Nombre de mesures	Moyenne ug/l	Déviaton standard
1 - 5 m	53	9,28	18,38
1 m	23	0,56	0,58
5 m	24	0,37	0,42

Tableau VI : D'après GORDON (11), concentration en hydrocarbures (équivalent crude oil) détectés dans l'eau de mer sur le trajet Halifax - Bermudes en avril 1974. Mesure en spectrofluorimétrie.

Par ailleurs, les méthodes retenues devront autant que possible permettre de distinguer entre les hydrocarbures de biosynthèse récente et ceux que l'on considère comme issus de la pollution pétrolière sous ses formes diverses. La courte revue sur l'origine des hydrocarbures que nous avons présenté en introduction, sans être exhaustive, montre à quel point la résolution de ce problème est difficile.

Enfin, les méthodes choisies devront permettre l'analyse de routine dans de nombreux laboratoires c'est à dire qu'elles nécessiteront le minimum de manipulations, un matériel courant et si possible peu onéreux.

./....

Nous avons regroupé dans le tableau VII les qualités et implications des six méthodes en usage actuellement. Les appréciations indiquées sont forcément un peu arbitraires puisqu'en fait elles varient assez largement d'un laboratoire à un autre. Elles constituent cependant une base de choix qui permet d'éclaircir le problème. On peut ainsi éliminer d'emblée la spectrométrie U. V. trop peu sensible, le détecteur microcalorimétrique non diffusé commercialement et peu spécifique et la spectrographie de masse qui reste une méthode de recherche fondamentale beaucoup trop onéreuse.

Il convient également d'éliminer la spectrométrie infrarouge qui ne permet d'atteindre des sensibilités extrêmes qu'au prix de précautions manipulatoires difficiles à maintenir en analyse de routine. Par ailleurs, les connaissances actuelles sur la composition des hydrocarbures rencontrés dans le milieu marin permet d'affirmer que cette méthode n'est pas spécifique et qu'en ce qui concerne les hydrocarbures d'origine fossile, elle permet principalement de doser la fraction la plus biodégradable (paraffines) et ignore les hydrocarbures aromatiques les plus persistants.

A l'inverse, la spectrofluorimétrie est la méthode la plus sensible et elle mesure des hydrocarbures moins susceptibles d'être biosynthétisés et dont on peut craindre la rémanence. Le choix convenable des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission permet d'éliminer les interférences dues aux matériaux naturels. La simplicité de son application a déjà été reconnue puisqu'elle est mise en oeuvre sur le plan mondial pour le monitoring des hydrocarbures dans le cadre du projet IGOSS (*), et plus récemment pour la Méditerranée dans le cadre d'un projet pilote IOC/UNEP/WMO.

*/...

(*) Workshop on Marine Pollution Monitoring (Petroleum) Gaithersburg (1974)
 The workshop decided to focus the quantitative analysis on aromatic hydrocarbons because :

- 1°) they are considered to have the greatest environmental impact in terms of toxicity ;
- 2°) they seem to offer a mean to differentiate between biogenic and petroleum derived hydrocarbons ;
- 3°) relatively straightforward and sensitive analytical methods exist for their determination.

It is recommended therefore, to use fluorescence spectrophotometry for quantitative measurements.....

METHODE	SENSIBILITE	SPECIFICITE HC récents/ HC fossiles	EQUIPEMENT	QUALIFICATION REQUISE	DUREE D'ANALYSE PURIFICATION + MESURE
Spectrométrie I. R.	0,05 mg/l moyenne	nulle	Spectrophotomètre I.R. 50 000 F.	moyenne	20 minutes
Spectrométrie U. V.	1 mg/l faible	faible	Spectrophotomètre UV 50 000 F.	moyenne	20 minutes
Spectrofluorimétrie	0,001 mg/l excellente	bonne	Spectrofluorimètre 50 000 F.	moyenne	20 minutes
Détecteur microcalori- métrique	bonne	nulle	Non disponible		
Chromatographie gazeuse	faible	excellente	Chromatographe 50 000 F.	Chercheur expérimenté	1 à 5 heures
Spectrographe de masse	moyenne	excellente	Chromatographe + Spectrographe de masse + computer 1 000 000	spécialiste	?

Tableau VII : Critères de choix pour une méthode d'analyse des hydrocarbures.

Par ailleurs, la chromatographie en phase gazeuse à haute performance reste la seule méthode d'un coût abordable permettant d'identifier individuellement chaque hydrocarbure. De plus, la connaissance du spectre global permet de déterminer l'origine de la contamination. C'est aussi la seule méthode qui permette de détecter une pollution pétrolière dans les organismes marins ou dans les sédiments. Malgré ses difficultés de mise en oeuvre, la chromatographie en phase gazeuse ne saurait être abandonnée.

4.2. Méthodes recommandées

4.2.1. Mesure des hydrocarbures dans l'eau par spectrofluorimétrie selon LEVY (1971)

4.2.1.1. Mode opératoire

Après agitation du mélange eau/ CCl_4 , laisser décanter et transférer le solvant dans un ballon à col rodé de 250 ml au moyen d'une pipette.

Effectuer une seconde extraction par 50 ml de CCl_4 et joindre les deux extraits.

Evaporer le solvant dans un évaporateur rotatif et reprendre quantitativement par 5 ml de N-hexane. Transférer dans une cuve en quartz de 1 cm pour mesure de fluorescence. Le pétrole brut et les résidus pétroliers ont des maximum d'excitation et d'émission respectivement à 310 et 360 nanomètres environ. Il convient cependant de tracer les spectres correspondants pour éviter toute interférence. L'intensité de la fluorescence est mesurée et comparée avec une série de solutions standards dans des conditions similaires.

4.2.1.2. Matériel nécessaire

- Matériel de prélèvement (cf fig. 1)
- Agitateur magnétique
- Evaporateur rotatif
- Spectrofluorimètre muni d'une source d'excitation au xénon, d'un monochromateur d'excitation, d'un monochromateur d'émission et enregistrement de spectres (ex : PERKIN ELMER 204).

4.2.1.3. Méthodes alternatives

- Mesure par spectrométrie infrarouge (cf CARLBERG, 1972, 20)
- Mesure par chromatographie en phase gazeuse (voir 4-2-2).

4.2.2. Mesure des hydrocarbures dans les sédiments et les organismes marins

4.2.2.1. Mode opératoire

L'échantillon est séché sur sulfate de sodium anhydre et la fraction lipidique extraite au Soxhlet par un mélange pentane/acétone 1 : 1. Puis le solvant est évaporé.

La purification est faite sur florisil à 5 % d'eau dans une colonne de 14 mm de diamètre (fig. 2). On y verse successivement : 10 ml de pentane, 3 g de florisil, l'extrait lipidique (200 mg maximum) repris par 10 ml de pentane et enfin 3 g de florisil. Eluer par 40 ml de pentane (fraction saturée) puis par 40 ml de mélange pentane/benzène 4 : 1 (fraction insaturée et aromatique). Ces fractions évaporées à sec et reprises par 1 ml de C S 2 seront injectées directement dans le chromatographe.

Selon que l'on désire une méthode sensible ou une identification précise des constituants on choisira les conditions suivantes :

	Méthode sensible	Identification précise
Colonne	2 m x 1/8"	SCOT 50 m x 0,5 mm
Support	Chrom. W.A.W. 80-100	Apiezon L ou SE 30
Phase fixe	3 % Apiezon L ou SE30	5 µl Splitter 1/100e
Volume injecté	5 µl	
Températures :		
- injecteur	250° C	250° C
- détecteur	250° C	250° C
- four	100 - 270° C	100 - 270° C
Vitesse de montée en température	8° C/min.	2°/min
Gaz vecteur	N2 30 ml/min	N2 2 ml/min
Détecteur	F. I. D.	F. I. D.

diamètre 14mm

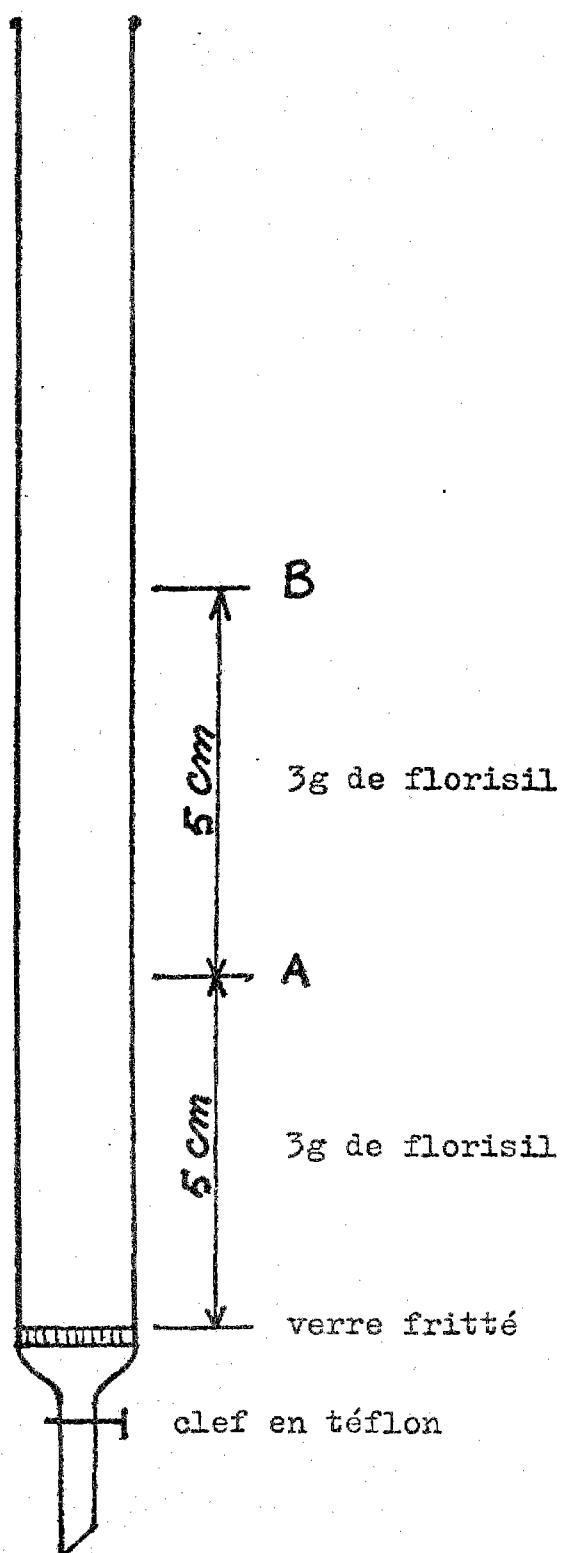


Fig 2: Colonne pour purification des extraits sur florisil.

4.2.2.2. Matériel nécessaire

- Appareil de Soxhlet
- Evaporateur rotatif
- Colonne chromatographique (fig. 2)
- Chromatographe en phase gazeuse avec détecteur à ionisation de flamme et température programmée.

4.2.2.3. Méthode alternative

- Spectrographie de masse.

=====

5. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) BESTOUGEFF (M.A.), 1967. - Petroleum hydrocarbons. In fundamentals of petroleum geochemistry, chapitre 3, Nagy et Colombo editeur.
- (2) AVIGAN (J.) and BLUMER (M.), 1968. - On the origin of pristane in marine organisms. - J. of lipid Research. 9 : 350 - 352.
- (3) GERARDE (H.W.) and GERARDE (D.F.), 1961 - 1962. - The ubiquitous hydrocarbons. - 65 th Annual conference of the Association of Food and Drug Official of the U. S. Washington 18-23 Juin 1961.
- (4) CLARK (R.C.) Jr, 1966. - Saturated hydrocarbons in marine plants and sediments. - M. S. Thesis, Department of geology and geophysics. Massachusetts Institute of Technology.
- (5) BLUMER (M.), GUILLARD (R.R.L.) and CHASE (T.), 1971. - Hydrocarbons of Marine phytoplankton. - Marine Biology 8 : 183 - 189.
- (6) DAVIS (J.B.), 1968. - Paraffinic hydrocarbons in the sulfate reducing bacterium Desulforibrio Resulfuricaus. Chemical geology. 3 : 155 - 160.
- (7) BLUMER (M.), 1967. - Hydrocarbons in digestive tract and liver of a basking shark. - Science 156 : 390 - 391.
- (8) WHITTLE (K.J.), MACKIE (P.R.) and HARDY (R.), 1974. - Hydrocarbons in the marine ecosystem. - South African J. of Science 70 : 141-144.
- (9) LARSSON (K.), ODHAM (G.) and SODERGREN (A.), 1974. - On lipid surface film on the sea. - I - A simple method for sampling and studies of composition. - Marine chemistry 2 : 49 - 57.
- (10) CHANG (W.J.), JADAMEC (J.R.), 1974. - Evaluation of thin film oil samplers. - Marine Pollution Monitoring (Petroleum). Proceedings of a symposium and Workshop held at the National Bureau of Standards. Gaithersburg May 13 - 1974, pages 85 - 88.
- (11) GORDON (D.C.) and KAISER (P.D.), 1974. - Hydrocarbons concentrations in Sea-Water along the Halifax - Bermuda, section : Lesson learned regarding sampling and some results. Marine Pollution Monitoring (Petroleum). Proceedings of a symposium and Workshop held at the National Bureau of Standards. Gaithersburg May 13 - 1974, pages 113 - 116.
- (12) GOERING (J.J.) and MENZEL (D.W.), 1965. - Deep sea research 12 : 839-843.
- (13) MACKIE (P.R.); WHITTLE (K.L.), HARDY (R.), 1974. - Hydrocarbons in the marine environment. I - n alkanes in the first of Clyde. Estuarine and Coastal Marine Science 2 : 359 - 374.
- (14) Report of the workshop on marine Pollution monitoring. Marine Pollution Monitoring (Petroleum). Proceedings of a symposium and Workshop held at the National Bureau of Standards. Gaithersburg May 13 - 1974, pages 271 - 300.
- (15) STRAUGHAM (D.), 1974. - Field sampling methods and techniques for marine organisms and sediments. Marine Pollution Monitoring (Petroleum). Proceedings of a symposium and Workshop held at the National Bureau of Standards. Gaithersburg May 13 - 1974, pages 183 - 188.

- (16) CLARK (R.C.), 1974. - Methods for establishing levels of petroleum contamination in organisms and sediment as related to marine pollution monitoring. Marine Pollution Monitoring (Petroleum). Proceedings of a symposium and Workshop held at the National Bureau of Standards. Gaithersburg May 13 - 1974, pages 189 - 194.
- (17) FARRINGTON (J.W.) et al, 1974. - Analyses of hydrocarbons in marine organisms : Results of IDOE intercalibration exercises. Marine Pollution Monitoring (Petroleum). Proceedings of a symposium and Workshop held at the National Bureau of Standards. Gaithersburg May 13 - 1974, pages 163 - 166.
- (18) MEDEIROS (G.C.) and FARRINGTON (J.W.), 1974. - IDOE-5 intercalibration sample : Results of analysis after six months storage. Marine Pollution Monitoring (Petroleum). Proceedings of a symposium and Workshop held at the National Bureau of Standards. Gaithersburg May 13 - 1974, pages 167 - 170.
- (19) Norme AFNOR (1973). - Dosage des hydrocarbures totaux. Norme T 90-203 AFNOR Cédex 7 92080 PARIS LA DEFENSE.
- (20) CARLBERG (R.), SKARSTEDT (C.), 1972. - Determination of small amounts of non polar hydrocarbons (oil) in sea water. - J. Cons. Int. Explor. Mer 34 pages 506 - 515.
- (21) BROWN (R.A.), ELLIOT (J.J.), SEARL (T.D.), 1974. - Marine Pollution Monitoring (Petroleum). Proceedings of a symposium and Workshop held at the National Bureau of Standards. Gaithersburg May 13 - 1974, pages 131 - 134.
- (22) EHRARDT (M.) and HEINEMANN (J.), 1974. - Marine Pollution Monitoring (Petroleum). Proceedings of a symposium and Workshop held at the National Bureau of Standards. Gaithersburg May 13 - 1974, pages 221 - 225.
- (23) LEVY (E. M.), 1971. - Water Research 5, pages 723 - 733.
- (24) HORNIG (A.W.), 1974. - Identification, estimation et monitoring of petroleum in marine waters by luminescence methods. - Marine Pollution Monitoring (Petroleum). Proceedings of a symposium and Workshop held at the National Bureau of Standards. Gaithersburg May 13 - 1974, pages 135 - 144.
- (25) KEISER (P.D.) and GORDON (D.C.), 1973. - J. Fish Res. Board of Canada 30 : pages 1039 - 1046.
- (26) CRETNEY (W.J.) and WONG (C.S.), 1974. - Fluorescence monitoring study at ocean weather station "P". Marine Pollution Monitoring (Petroleum). Proceedings of a symposium and Workshop held at the National Bureau of Standards. Gaithersburg May 13 - 1974, pages 175 - 178.
- (27) ZSOLNAY (A.), 1971. - Preliminary study of the dissolved hydrocarbons and hydrocarbons on particulate material in the Gotland Deep of the Baltic. Kieler Meeresforsch 27 : pages 120 - 134.
- (28) ZSOLNAY (A.), 1973. - The relative distribution of non aromatic hydrocarbons in the Baltic in september 1971. - Marine Chemistry 1 : pages 127 - 136.

- (29) ZSOLNAY (A.), 1973. - Measurements made at sea of saturated and aromatic hydrocarbons in the Baltic in April 1973. - I.C.E.S. C.M. 1973/E : 22.
- (30) ZSOLNAY (A.), 1974. - Determination of aromatic and total hydrocarbon content in submicrogram quantities in aqueous systems by means of high performance liquid chromatography. Marine Pollution Monitoring (Petroleum). Proceedings of a symposium and Workshop held at the National Bureau of Standards. Gaithersburg May 13 - 1974, pages 119 - 120.
- (31) BIERI (R.H.) et al, 1974. - Identification of hydrocarbons in an extract from estuarine water accomodated n° 2 fuel oil. Marine Pollution Monitoring (Petroleum). Proceedings of a symposium and Workshop held at the National Bureau of Standards. Gaithersburg Mai 13 1974, pages 149 - 153.
- (32) WARNER (J.S.), 1974. - Quantitative determination of hydrocarbons in marine organisms. - Marine Pollution Monitoring (Petroleum). Proceedings of a symposium and Workshop held at the National Bureau of Standards. Gaithersburg May 13 - 1974, pages 195 - 196.
- (33) MAYO (D.W.) et al, 1974. - Long term weathering characteristics of iranian crude oil : the wreck of the "northern gulf". Marine Pollution Monitoring (Petroleum). Proceedings of a symposium and Workshop held at the National Bureau of Standards. Gaithersburg Mai 13 - 1974, pages 201 - 204.
- (34) BARBIER (M.) et al, 1973. - Hydrocarbons from sea water. Deep. Sea Research 20 : pages 305 - 314.
- (35) BLUMER (M.) et al, 1970. - Hydrocarbon pollution of edible shellfish by an oil spill. Marine Biology 5 : pages 195 - 202.
- (36) MACKIE (P.R.) et al, 1972. - Diesel oil contamination of brown trout. Environ. Pollut. 3 : pages 9 - 16.
- (37) WHITTLE (K.J.) et al, 1973. - Hydrocarbons in the marine environment. Meeting of European Fish Technologists Hambourg.
- (38) WHITTLE (K.J.) et al, 1973. - A survey of hydrocarbons in scottish coastal waters. - International Council for the Exploration of the Sea E : 30.
- (39) WHITTLE (K.J.) et al, 1974. - The fate of n-alkanes in marine organisms. International council for the Exploration of the sea E : 33.
- (40) ZAFIRIOU (O.C.), 1973. - Petroleum hydrocarbons in Narragansett bay II Chemical and isotopic analysis. - Estuarine and Coastal Marine Science, 1 : pages 81 - 87.
- (41) ANBAR (M.) et al, 1974. - Identification of mineral oils by field ionization mass spectrometry. Marine Pollution Monitoring (Petroleum). Proceedings of a symposium and Workshop held at the National Bureau of Standards. Gaithersburg Mai 13 - 1974, pages 229 - 232.
- (42) GRICE (G.D.), HARVEY (G.R.), BOWEN (V.T.) and BACUS (R.H.), 1972. - The collection and preservation of open ocean marine organisms for pollutants analysis. - Bull. Environ. Contam. Toxicol. 7 : pages 125 - 132.

=====