

**DIRECTION DE L'ENVIRONNEMENT ET
DE L'AMENAGEMENT LITTORAL**

**DOSAGE AUTOMATIQUE DU MERCURE TOTAL DANS
LES ORGANISMES MARINS
PAR FLUORESCENCE ATOMIQUE**

par

Jane SANJUAN et Daniel COSSA



R. INT. DEL / 93.12 / NANTES

IFREMER
 Centre de Nantes
 BP 1049
 F. 44037 Nantes cedex 01

AUTEURS Jane Sanjuan et Daniel Cossa Laboratoire Chimie des contaminants et modélisation	CODE : N° <u>R. INT. DEL/93.12/NANTES</u>
TITRE DOSAGE AUTOMATIQUE DU MERCURE TOTAL DANS LES ORGANISMES MARINS PAR FLUORESCENCE ATOMIQUE	date : 19 novembre 1993 tirage nb : 200 Nb pages : 9 Nb figures : 4 Nb photos : 0
CONTRAT (intitulé) N° _____	DIFFUSION libre <input checked="" type="checkbox"/> restreinte <input type="checkbox"/> confidentielle <input type="checkbox"/>

Résumé

L'utilisation d'une chaîne automatique pilotée par un micro-ordinateur permet le dosage du mercure total dans des minéralisats d'organismes marins à un rythme analytique élevé. Pour une prise d'essai de 0,3 g la précision est de 2 %, la justesse de 0,5 % et la limite de détection de 0,016 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (poids sec).

Mots clés: Dosage, Automatisation, Mercure, Tissus biologiques



Avant-propos

La méthode décrite ici est utilisée pour le dosage du mercure total dans les huîtres et les moules analysées dans le cadre du Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin (RNO) depuis octobre 1992. Elle est applicable telle quelle à d'autres matrices biologiques en particulier le muscle de poisson. Elle consiste en l'automatisation de la méthode décrite par Thibaud (1986).

**DOSAGE AUTOMATIQUE DU MERCURE TOTAL DANS LES
ORGANISMES MARINS
PAR FLUORESCENCE ATOMIQUE**

PRINCIPE

Après minéralisation par voie humide d'échantillons lyophilisés, on procède à la réduction par le chlorure stanneux du mercure en solution. Le mercure élémentaire formé est entraîné sous forme de vapeur par un courant d'argon dans un spectromètre de fluorescence atomique. L'utilisation d'une chaîne automatique pilotée par un micro-ordinateur (chaîne Merlin-Plus, PSA) permet l'obtention rapide des résultats analytiques.

MATERIEL UTILISE

1. Bloc de minéralisation

Pour la minéralisation on utilise un bloc de minéralisation programmable (Skalar, Digester 5600) pouvant recevoir 42 tubes.

2. Chaîne analytique PS Analytical comprenant trois modules (Fig. 1):

- un *auto-échantillonneur programmable* pouvant recevoir 48 tubes polypropylène de 50 ml : étalons, standards certifiés, blancs et échantillons (modèle PSA 20.040) ;
- un *générateur de vapeur froide* : par réduction du mercure par le chlorure stanneux (modèle PSA 10.003) ;
- un *détecteur par fluorescence atomique* (modèle Merlin 10.023).

Chaque module est relié à un *micro-ordinateur* et piloté par un *logiciel Touch Stone*[®] (PSA) qui permet de plus, l'étalonnage et l'exploitation des résultats.

- une *imprimante* (modèle Citizen 120 DT)

REACTIFS

- Pentoxyde de vanadium : V_2O_5 Merck (Très pur).
- Acide nitrique : HNO_3 Merck 65 % (Hg max.: 0,000005 %).
- Bichromate de potassium : $K_2Cr_2O_7$ Merck (Hg max.: 0,000001 %).
- Chlorure stanneux : $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ Merck (Hg max.: 0,000001 %).
- Acide sulfurique : H_2SO_4 Merck (Hg max.: 0,0000005 %).

MINERALISATION

Dans des tubes en Téflon (PFA, Oak Ridge de 37 ml) à bouchon à vis en PVDF, on pèse exactement environ 300 mg d'échantillon de tissu biologique lyophilisé.

On rajoute successivement 40 à 45 mg de pentoxyde de vanadium et 5 ml d'acide nitrique.

On laisse au repos pendant une nuit sans visser les bouchons pour éviter les surpressions.

On chauffe ensuite les tubes fermés hermétiquement sur le bloc de minéralisation à $90^\circ C$ pendant 4 heures.

Après refroidissement on ajoute 2 ml d'une solution de bichromate de potassium à 10 % et on complète à 37 ml (trait de jauge du tube) avec de l'eau déionisée (Milli-Q).

Chaque échantillon est ensuite dilué au 1/10 avec eau Milli-Q dans des tubes en polypropylène (PP) gradués à 50 ml et munis de bouchons à vis incolores (Sarstedt).

Chaque série de minéralisation comprend :

- 36 échantillons,
- 3 échantillons de référence certifiés de tissu mous de moule (CRM 278 du BCR, Bureau de référence de la Communauté européenne),
- 3 "blancs" constitués du mélange acide nitrique-pentoxyde de vanadium ayant subi toutes les étapes de chauffage et dilution.

SOLUTIONS

Eau déionisée

L'eau déionisée utilisée est obtenue à partir d'un système Milli-Q[®] (Millipore). Cette eau contient moins de 1 ng de mercure par litre.

Solution diluante

Toutes les solutions de travail sont préparées dans une solution diluante ; cette solution constitue en outre le zéro de la gamme d'étalonnage. Elle contient: 10 ml d'HNO₃ concentré et 4 ml de K₂Cr₂O₇ à 10 % (p/v) dans 900 ml d'eau déionisée.

Solution mère de mercure à 1 g l⁻¹

A un standard de mercure (1,000 g ± 0,002 g Hg) on ajoute une quantité suffisante de solution diluante pour un litre. Conservée dans un flacon en Téflon fermé hermétiquement à la pince multiprise, cette solution se conserve un an.

La **solution réductrice** est préparée par dissolution de 120 g de SnCl₂ dans 500 ml d'eau déionisée et 100 ml d'H₂SO₄.

CONDITIONS D'UTILISATION DU SYSTEME ANALYTIQUE

Les conditions d'utilisation du générateur de vapeur et du fluorimètre sont données dans la figure 2.

Débits des liquides

La solution réductrice d'une part et l'échantillon ou le blanc d'autre part sont aspirés et homogénéisés en continu grâce à une pompe péristaltique et un mélangeur. Une valve permet d'alterner le pompage de l'échantillon avec de l'eau déionisée. Le débit de l'échantillon ou du blanc est de 8 ml.min⁻¹ ; celui de la solution réductrice de 1,2 ml.min⁻¹. Ces conditions sont obtenues avec des tuyaux en silicone de diamètre intérieur respectifs de 1,9 et 0,7 mm et une vitesse de rotation de la pompe fixée à 25 (unités arbitraires).

Débits de gaz

On utilise l'argon qualité C Alphagaz[®] comme gaz vecteur et pour le gainage du détecteur. Le gaz est filtré sur filtre Téflon et cartouche de sable doré pour y piéger les traces de mercure. Les débits sont les suivants:

- débit du gaz vecteur : environ $0,150 \text{ l.min}^{-1}$,
- débit de la gaine d'argon du détecteur : $0,250 \text{ l.min}^{-1}$.

Il importe d'ajuster le débit du gaz vecteur pour faire en sorte que la pointe du diffuseur soit immergée d'environ 1 mm dans le liquide présent dans le séparateur gaz/liquide (Fig. 1). Cette position permet une extraction optimale du mercure en phase gazeuse.

Séquences

Les quatre phases sont expliquées sur la figure 3. Au cours des trois premières est pompé l'échantillon, au cours de la quatrième est pompée de l'eau déionisée (Milli-Q).

Séquences de pompage de l'échantillon:

$T1 = 20$ secondes: "*Delay time*", c'est le temps de pompage correspondant au volume d'échantillon nécessaire pour remplir le système jusqu'à la cellule de réaction.

$T2 = 20$ secondes: "*Rise time*", c'est le temps de pompage correspondant au volume d'échantillon nécessaire pour permettre au signal d'atteindre un maximum.

$T3 = 30$ secondes: "*Analysis time*", c'est la durée de pompage de l'échantillon nécessaire pour permettre au signal de se maintenir en plateau.

Séquence de pompage de l'eau déionisée:

$T4 = 40$ secondes: "*Memory time*", la durée nécessaire au rinçage du système, et permettant le retour à la ligne de base du signal.

Mesure

La mesure du signal de fluorescence est effectuée en mesurant la hauteur maximale atteinte lors de la phase de plateau (T2). La valeur du blanc est déduite systématiquement lors des calculs de concentration.

ETALONNAGE

A partir de la solution mère, on prépare deux solutions : une solution A à $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, puis une solution B à $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Les deux solutions peuvent se conserver une semaine en flacon Téflon (PFA) hermétiquement fermé.

De façon extemporanée on prépare la gamme d'étalonnage à partir de la solution B et de la solution diluante qui comprend les concentrations suivantes :

0	$\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$
0,125	$\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$
0,250	$\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$
0,500	$\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$

Le zéro de l'étalonnage est obtenu par dosage de la solution diluante. Il convient de ne pas confondre ce blanc avec celui des échantillons qui contient les réactifs utilisés lors de la minéralisation (cf. "minéralisation").

Les résultats de la calibration linéaire sont indiqués sur la figure 3.

PRECISION ET LIMITE DE DETECTION

Les critères d'évaluation des performances de la méthode sont empruntés à Taylor (1987).

Précision

La précision de la méthode (justesse et répétabilité) a été étudiée sur un échantillon de référence certifié de tissu de moules lyophilisé produit par le Bureau de référence de la Communauté européenne [CRM 278 ; BCR].

Douze minéralisations ont été réalisées au cours de quatre séries d'analyses du RNO correspondant aux prélèvements de l'année 1991.

Les concentrations suivantes ont été déterminées pour l'échantillon de référence CRM 278:

1ère série:	0,192 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, poids sec
	0,195 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, poids sec
	0,193 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, poids sec
2ème série	0,197 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, poids sec
	0,192 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, poids sec
	0,189 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, poids sec
3ème série:	0,186 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, poids sec
	0,188 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, poids sec
	0,190 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, poids sec
4ème série:	0,186 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, poids sec
	0,182 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, poids sec
	0,185 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, poids sec

Moyenne des mesures : 0,189 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, poids sec

Ecart-type : 0,004 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, poids sec

La valeur certifiée étant de $0,188 \pm 0,007 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, la justesse de la présente méthode, calculée comme l'écart à la valeur certifiée, est de 0,5 %.

La précision (répétabilité) exprimée par le coefficient de variation (défini comme le rapport de l'écart-type à la moyenne) est de 2 %.

Limite de détection

La limite de détection est définie comme l'écart-type de la concentration d'un échantillon dont la teneur est proche de zéro (dans la pratique du présent dosage il s'agit des blancs) multiplié par 3,29 pour tenir compte des erreurs de types I et II. La limite de quantification quant à elle sera l'écart-type sur le blanc multiplié par 10. Entre les valeurs limites, on exprimera les résultats en les qualifiant de "traces".

A partir de la série de blancs suivants:

0,013 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

0,015 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

0,001 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

0,009 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

0,007 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

0,006 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

0,003 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

de moyenne $0,008 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ et d'écart-type $0,005 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, on a calculé une **limite de détection** de :

$$3,29 \times 0,005 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} = 0,016 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$$

et une **limite de quantification** de :

$$10 \times 0,005 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} = 0,050 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$$

RYTHME ANALYTIQUE

Compte tenu de la minéralisation des échantillons et du processus d'assurance de qualité, on évalue à 42 le nombre d'analyse quotidienne, incluant 36 échantillons, 3 blancs et 3 échantillons de référence.

REFERENCES

- Thibaud, Y.** 1986. La minéralisation des tissus biologiques en vue de la détermination du mercure. Rapport IFREMER, *DERO 86-15 MR*, Nantes, France.
- Taylor, J. K.** 1987. *Quality Assurance of Chemical Measurements*. Lewis Publishers, New York, USA.

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Chaîne automatique du dosage du mercure.

Figure 2. Illustration de la page "Méthode" du logiciel "Touch Stone" indiquant les conditions opératoires pour l'analyse du mercure dans les coquillages.

Figure 3. Courbe de réponse du détecteur de fluorescence pour une solution de mercure à $0,5 \text{ ng.ml}^{-1}$.

Figure 4. Courbe d'étalonnage.

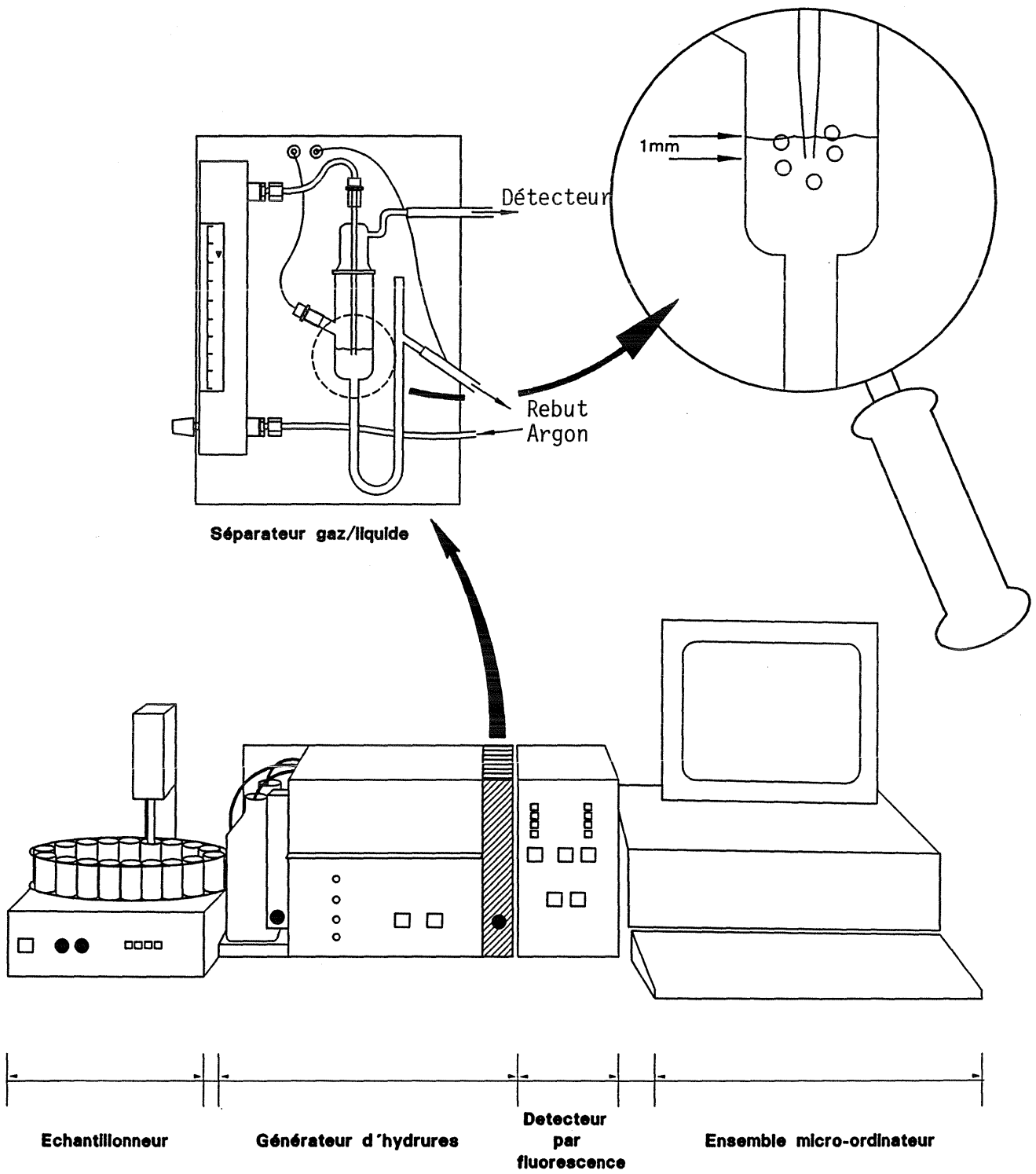


Figure 1. Chaîne automatique du dosage du mercure.

```
Method: MERCURE dans les COQUILLAGES
Curve Fit by Equal Weight Slope Average
Measured by : Peak Ht

PSA Merlin Calibration Setup:
RANGE 1000      FINE 3.90      ZERO Auto
Range & Running 1/4s set automatically

Hydride Generator Setup:
DELAY      RISE      ANALYSIS      MEMORY
20sec     20sec     0.5min      40sec

CARRIER: Argon .150 l/min
SHEATH: Argon 0.2 l/min
Solution 1: Stannous Chloride 20% w/w
Solution 2: K2Cr2O7 0.04%+HNO3 1%

N.B. Parametrer le generateur
```

Figure 2.- Illustration de la page "Méthode" du logiciel "Touch Stone" indiquant les conditions opératoires pour l'analyse du mercure dans les coquillages.

RNO Ref 003 Run 1
BaseLine= -0.118

Peak Area: 6050.166%sec
Peak Height: 135.518%

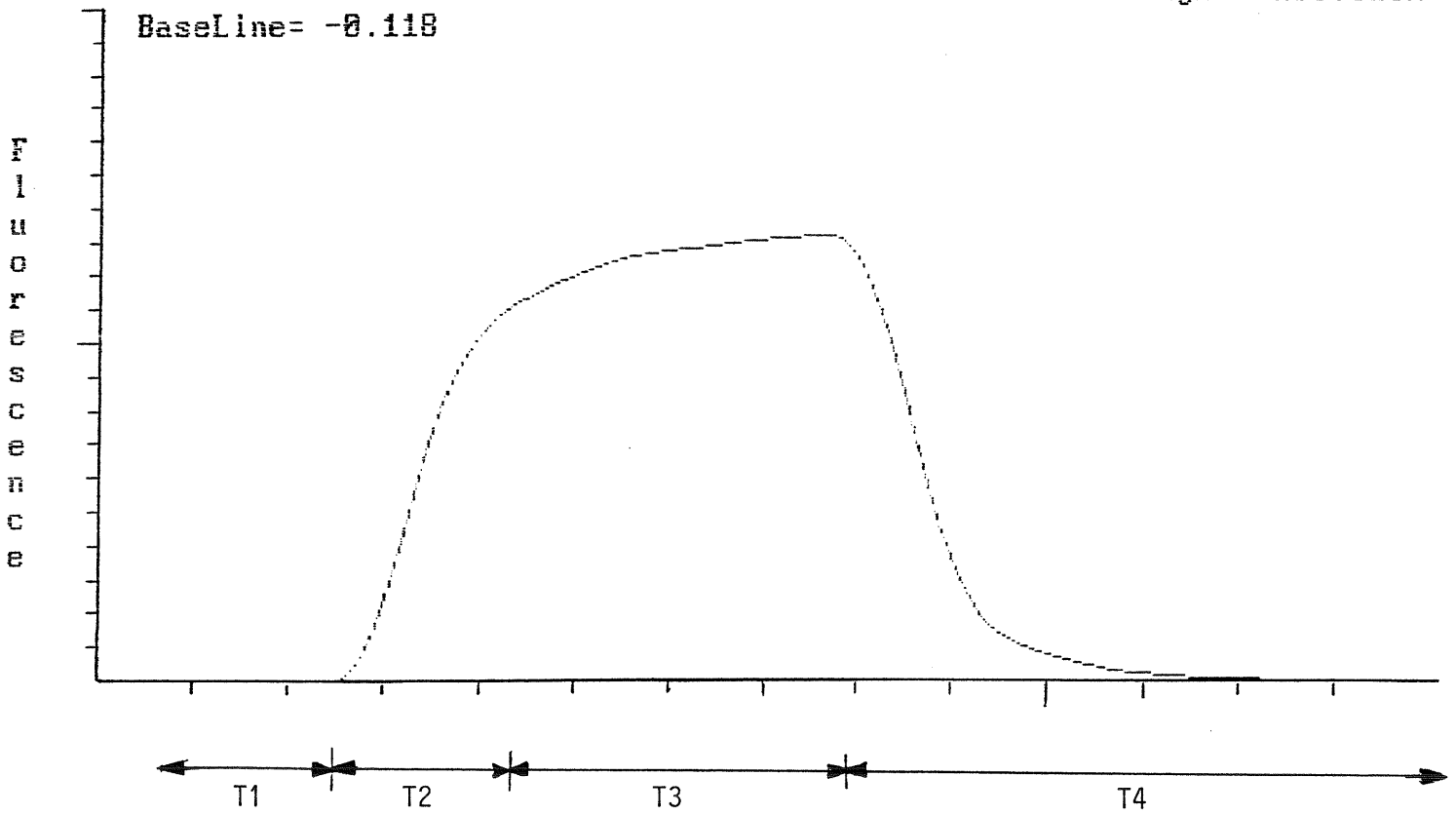
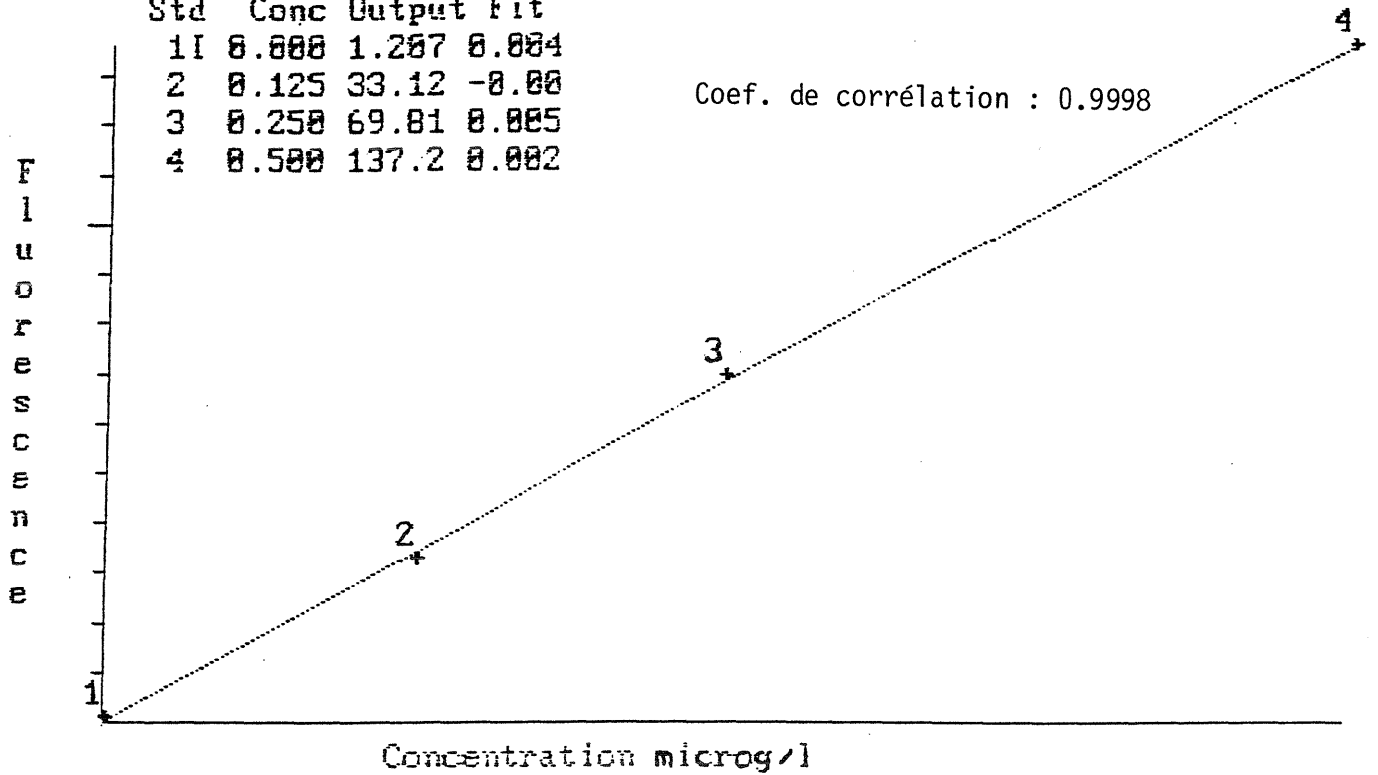


Figure 3.- Courbe de réponse pour 0,5 ng/ml de mercure.

MERCURE dans les COQUILLAGES2 Fit by Equal Weight Slope Average
 Slope=272.93818 Term2=0.00000 Term3=0.00000 No Reslope

Std	Conc	Output	Fit
1	0.000	1.207	0.004
2	0.125	33.12	-0.00
3	0.250	69.81	0.005
4	0.500	137.2	0.002

Coef. de corrélation : 0.9998



Printed from TouchStone

Reading Std 1 Run	1 Peak Height=	2.1	Peak Area=	68.0
Std 1 MERCUR	2.1	0.000microg/l	1	0.000 0/P15:19
Reading Std 2 Run	1 Peak Height=	24.2	Peak Area=	1654.0
Std 2 MERCUR	24.2	0.125microg/l	1	0.000 0/P15:20
Reading Std 3 Run	1 Peak Height=	48.1	Peak Area=	2190.0
Std 3 MERCUR	48.1	0.250microg/l	1	0.000 0/P15:23
Reading Std 4 Run	1 Peak Height=	81.7	Peak Area=	3732.3
Std 4 MERCUR	81.7	0.500microg/l	1	0.000 0/P15:25

Figure 4.- Courbe de calibration.