



Évaluation d'une Méthode Optimisée de la Préparation d'Échantillons pour l'Analyse Quantitative de Très Bas Niveaux d'Hydrocarbures Polycycliques Aromatiques Aéroportés pour la Protection et le Contrôle de la Santé des Opérateurs

Nicolas Falquet¹, Gilles d'Esperonnat² & Rob Darrington²

1. ITGA, St-Etienne, France.
2. Genevac, Ipswich, UK.

Introduction

Les Hydrocarbures Polycycliques Aromatiques (HPA) constituent une classe importante de composés comprenant deux ou plusieurs cycles aromatiques. Les HPA sont formés naturellement dans les combustibles fossiles et leurs produits dérivés et peuvent être créés lors de la combustion incomplète des combustibles à base de carbone. Ce sont ainsi des produits dérivés de multiples procédés industriels. Les HPA peuvent varier beaucoup dans leur taille, leur nature et leur risque à la santé des êtres-humains. Certains ne sont pas classifiés comme toxiques, bien que d'autres soient des cancérigènes connus. Le CIRC (Centre International de Recherche sur le Cancer – IARC en anglais) en a spécifié 16 d'un intérêt particulier et d'autres ont été ajoutés ultérieurement à cette liste. En tout, plus de 100 HPA ont été décrits.

Étant donné les risques et les risques potentiels pour la santé humaine présentés par les HPA, beaucoup d'organisations telles que les fonderies, les centres de production de bitume et les fumoirs contrôlent régulièrement leur personnel et leur environnement pour les niveaux des HPA. Typiquement, les HPA sont piégés par l'utilisation de filtres (forme particulaire) ou des résines tels que l'XAD2 (forme gazeuse) à travers lesquels l'air environnemental est aspiré. Les filtres peuvent être situés dans un petit appareil attaché aux combinaisons des personnes, ou dans des unités

plus importantes pour contrôler l'air sur une surface plus grande. Des problèmes potentiels existent lors de la récupération des HPA des filtres et pendant la préparation des échantillons avant analyse. Principalement, des pertes dues à la volatilité des HPA sont rapportées pour les HPA bi- et tricycliques (ISO11338-2:2003). L'ITGA a alors fait une étude pour optimiser la récupération des échantillons et ainsi la détermination des HPA en travaillant avec les niveaux bas et très bas des analytes.

La Méthodologie Traditionnelle de la Préparation des Échantillons

Les méthodes pour l'échantillonnage dans les lieux de travail sont bien décrites dans la littérature (NF X 43-294 et méthode Métropol 011 - INRS) avec pour résultat le piégeage des échantillons par des filtres en fibre de verre ou de quartz. Les filtres sont préservés et livrés au laboratoire d'analyse. Tout le filtre est placé dans une fiole à code-barres, 10ml de dichlorométhane (DCM) sont ajoutés et le tube est placé dans un bain à ultrasons à température ambiante pendant 15 minutes pour extraire les analytes. Cette opération est répétée une fois avec 10ml de DCM pour optimiser l'extraction. Suite à l'extraction, l'échantillon est concentré à 1ml en utilisant un système de flux d'azote et ensuite analysé par HPLC couplé à un détecteur de fluorescence. Les tubes de résine XAD2 peuvent être utilisés comme alternative aux filtres en fibres.

L'Évaluation d'une Nouvelle Méthodologie de Préparation des Échantillons

Une solution étalon contenant les 16 HPA de l'US-EPA (comme définies par le CIRC en 1987) a été déposée sur des filtres en fibres de quartz ou des tubes en résine XAD2 et séchée à l'air. Les filtres / tubes furent alors extraits deux fois avec 7ml de DCM et soumis à ultrasons dans le bain à ultrasons pendant 15 minutes à température ambiante. Une aliquote de 100µl a été prélevée de l'échantillon combiné (14ml). Celle-ci a été complétée à 1ml avec de l'acétonitrile et injectée dans le système HPLC-Fluorescence comme référence 100%. Le DCM, après ajout de 100µl de 2-pentanol comme « keeper », est évaporé dans l'EZ2-envi de Genevac. La température et la pression ont été contrôlées pendant l'évaporation afin que le DCM puisse évaporer mais pas le 2-pentanol, comme décrit auparavant par Marsico (2006) et Massat *et al.* (2007).

Ensuite, les échantillons ont été complétés à 1 ml avec de l'acétonitrile et injectés dans le système HPLC-Fluorescence pour analyse. Les niveaux de récupération pour tous les analytes,



Figure 1 – Genevac EZ-2 Envi

même les plus volatils, étaient au-delà de 90% et la conformité de la courbe d'analyse à celle de la référence était très bonne, comme montrée en Figure 2 ci-dessous.

La Validation du Processus

Ayant donné des résultats similaires à la méthode existante, et ►►►

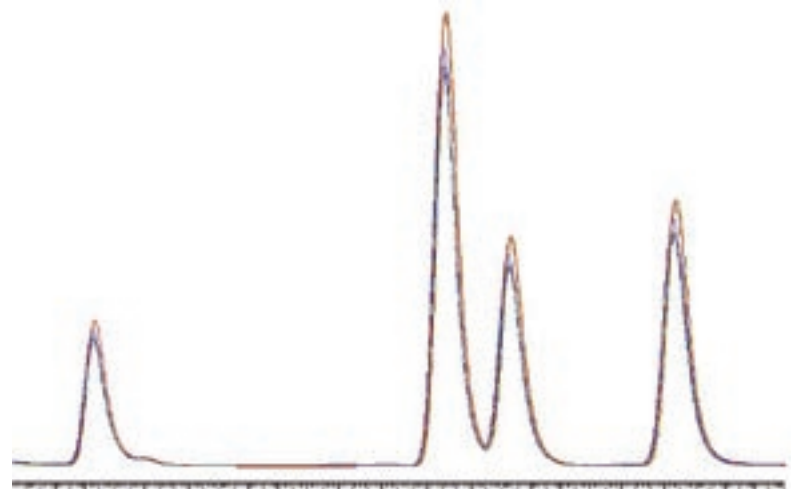


Figure 2 – Chromatogramme de l'Échantillon de Référence HPLC-Fluorescence superposé à celles des Échantillons post-Concentration Rouge – Le point de référence. Bleu - Les autres chromatogrammes font référence aux composés HPA Naphtalène, Acénaphène, Fluorène, Phénanthrène.

Modifiez-vous vos essais pour vous adapter à votre lecteur de microplaque ?



Le nouvel Infinite® M1000 PRO peut être configuré avec 10 modes de détection différents incluant l'AlphaScreen® pour un flexibilité inégalée.



Avec le Lecteur Infinite M1000 PRO ne choisissez pas entre performance et flexibilité

- Certifié et validé pour un grand nombre d'essais
- Entièrement upgradable pour tous les modes de détection
- Équipé d'optiques dédiées pour l'AlphaScreen® et AlphaLISA® et d'un système révolutionnaire de correction de température qui compense les variations de température dans la microplaque.
- Très grand choix de microplaques de 6 à 1536 puits et possibilité de créer simplement vos propres microplaques
- Nouvelle optique optimisée (OR) pour les essais cellulaires
- Nouvelles applications possibles telles que la quantification d'Adn sur 2µl de volume avec la NanoQuant Plate™ (brevet EP2045015) et les scans de luminescence.



Pour toute information complémentaire : tecan.france@tecan.com



étant avantageux au sens de l'automatisation du processus de la concentration, la validation statistique du processus et de l'équipement était nécessaire. Suivant la méthodologie ci-dessus, une solution contenant 14 échantillons HPA a été déposée sur des filtres en fibre de quartz et des tubes en résine XAD2. Les volumes ajoutés étaient de 100ng et de 10ng. Ceux-ci furent séchés, extraits, concentrés et analysés. Le processus a été répété à six occasions distinctes avec de nouveaux échantillons et solutions à chaque occasion. Les résultats sont présentés en Figure 3.

Les résultats indiquent en général d'excellents taux de récupération et de bons chiffres de coefficient de variation. Due à une contamination de la résine XAD2, pour deux composés (naphtalène et acénaphène) les limites de quantification ont été validées à 50ng en place de 10ng.

Conclusions

La nouvelle méthode de préparation des échantillons est apparue comme étant supérieure aux méthodes courantes. Les niveaux de récupération sont légèrement inférieurs pour les essais en 10ng car à ce niveau on approche la limite de détection de la méthode d'analyse. Suite à une validation réussie et un audit externe par le COFRAC, la nouvelle méthode et les systèmes ont été adoptés pour une utilisation en routine journalière.

Les Auteurs

Nicolas Falquet est Responsable d'Essai Organique, ITGA, un laboratoire indépendant leader dans les analyses, basé au Polygone, 46 rue de la Télématique, 42000 St-Etienne, France. ITGA est intégré au Groupe Carso.

Gilles Esperonnat est responsable des ventes et du SAV des évaporateurs Genevac en France, et est basé à Lyon.

Rob Darrington est Responsable Produits, au siège de Genevac, Farthing Road, Ipswich, IP1 5AP, UK.

Références

IARC (CIRC). 1987. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, supplement 7, Overall evaluation of carcinogenicity: an updating of IARC monographs 1-42. Lyon: International Agency for Research on Cancer

Marsico, Anna Maria, 2006. Improving Analysis of Pesticides – a new method development protocol to increase recovery of volatile compounds. First published in Lab Asia, August 2006 & available via <http://www.genevac.org/en/ArticleDetail.asp?S=6&V=1&ProductDownload=81>

Massat, F, Planel, B & Venezia, A, 2007, Evaluation of Evaporative Sample Preparation Techniques. First published in International Environmental Technology, March/April 2008, pp 36, and also available via

<http://www.genevac.org/en/ArticleDetail.asp?S=6&V=1&ProductDownload=134>

NF X 43-294. Juin 1995. Échantillonnage et analyse des hydrocarbures aromatiques polycycliques.

INRS. 2007. Méthode Métropol 011. Hydrocarbures Polycycliques Aromatiques.

NF ISO 11338-2. Mars 2004. Émissions de sources fixes – Détermination des hydrocarbures aromatiques polycycliques sous forme gazeuse et particulaire – Partie 2 préparation des échantillons, purification et détermination

Composés	Dopages à 100ng de filtres quartz			Dopages à 100ng de XAD2		
	Masse (ng)	CV	Récupération	Masse (ng)	CV	Récupération
Naphtalène	99.8	2.5%	99.8%	99.5	1.2%	99.5%
Acénaphène	99.6	2.1%	99.6%	98.6	0.7%	98.6%
Fluorène	100.1	1.9%	100%	100.0	0.9%	100%
Phenanthrène	99.8	2.1%	99.8%	99.1	0.9%	99.1%
Anthracène	99.0	2.0%	99.0%	98.3	1.0%	98.3%
Fluoranthène	99.8	2.1%	99.8%	98.9	0.9%	98.9%
pyrene	99.2	2.0%	99.2%	98.3	0.8%	98.3%
B(a)anthracène	99.6	2.2%	99.6%	98.6	0.6%	98.6%
Chrysène	100.6	2.2%	101%	99.5	0.5%	99.5%
B(b)Fluo	99.9	2.1%	99.9%	98.1	1.0%	98.1%
B(k)Fluo	99.2	0.9%	99.2%	99.2	0.4%	99.2%
B(a)pyrène	100.3	1.1%	100%	97.0	1.0%	97.0%
dibenzo (a,h) anthracene	99.4	2.7%	99.4%	97.0	1.3%	97.0%
benzo(g,h,i)perylène	98.1	2.5%	98.1%	95.8	1.0%	95.8%

Composés	Dopages à 10ng de filtres quartz			Dopages à 10ng de XAD2		
	Masse (ng)	CV	Récupération	Masse (ng)	CV	Récupération
Naphtalène	10.0	2.0%	100.4%	50.1	2.4%	100%
Acénaphène	9.72	1.3%	97.2%	48.4	0.7%	96.9%
Fluorène	9.50	1.9%	95.0%	9.54	1.3%	95.4%
Phenanthrène	9.63	0.6%	96.3%	9.72	1.2%	97.2%
Anthracène	9.65	1.4%	96.5%	9.62	1.5%	96.2%
Fluoranthène	9.13	0.9%	91.3%	9.32	1.7%	93.2%
pyrene	10.1	1.7%	101.2%	10.1	1.6%	101%
B(a)anthracène	9.79	3.2%	97.9%	9.88	5.4%	98.8%
Chrysène	9.71	1.7%	97.1%	9.67	3.0%	96.7%
B(b)Fluo	9.67	1.9%	96.7%	9.70	2.2%	97.0%
B(k)Fluo	9.54	1.0%	95.4%	9.53	1.0%	95.3%
B(a)pyrène	9.14	3.5%	91.4%	9.33	5.0%	93.3%
dibenzo (a,h) anthracene	9.61	2.2%	96.1%	9.39	2.5%	93.9%
benzo(g,h,i)perylène	9.87	3.3%	98.7%	9.68	2.1%	96.8%

Figure 3 – Données des Études de Validation. La Masse Moyenne Récupérée (ng) et la taux de récupération % sont les moyennes de chacun des 6 répétitions exécutées. Le coefficient de variation (CV) est la déviation au cours des répétitions.

Le nouveau sens de la flamme

schuett phoenix II: les bcs Bunsen du futur

Je parle votre langue. Je garantis une sécurité maximale. Je vous rends rapide et flexible.

schuett-biotec.de



schuett-biotec GmbH
Rudolf-Wissell-Straße 13
D-37079 Göttingen, Germany
Fon +49 (0) 551/5 04 10-0
info@schuett-biotec.de

Rendez nous visite
ANALYTICA
17.-20. avril 2012 - Munich
Hall B1, Stand 403
ACHEMA
18.-22. juin 2012 - Francfort
Hall 4.1, Stand D47