

Développement de méthodes d'analyse d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et de leurs dérivés nitrés et oxygénés en vue de leur détermination dans les particules fines atmosphériques

G. MIRIVEL, V. RIFFAULT, J.C. GALLOO

mirivel@ensm-douai.fr

Ecole des Mines de Douai, Département Chimie et Environnement,
941 rue Charles Bourseul, BP 10838, 59508 Douai cedex, France

Mots-clés : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques, Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques nitrés, Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques oxygénés, chromatographie liquide, spectrométrie de masse, ionisation chimique à pression atmosphérique, matière organique particulaire.

1 INTRODUCTION

Les concentrations en particules fines (de diamètre aérodynamique inférieur à 2,5 μm) dans l'atmosphère ont nettement augmenté depuis plus d'un siècle avec l'accroissement démographique, le développement des secteurs industriels et agricoles et des moyens de transport. De plus, en fonction de leur composition et de leur concentration, elles vont être plus ou moins nuisibles pour l'homme *via* la respiration. La fraction organique de l'aérosol, représentant de 10 à 90% de la masse des particules [1,2] reste cependant mal caractérisée. Parmi les composés organiques majoritairement présents sous forme particulaire, les HAP occupent une place importante de par leurs propriétés cancérigènes et mutagènes. Ils sont issus des procédés de combustion, soit naturels (éruptions volcaniques, feux de forêts) soit anthropiques qui sont considérés comme la source majoritaire d'introduction des HAP dans l'atmosphère. Durant leur transport dans l'air ambiant et/ou leur prélèvement par filtration, les HAP associés à la phase particulaire sont susceptibles de réagir avec des entités oxydantes présentes dans l'air (O_3 , NO_2 , ...) et former des dérivés oxygénés ou nitrés. Ces derniers sont encore plus toxiques que les HAP

parents. Peu d'informations sont disponibles sur les concentrations de ces dérivés dans l'atmosphère puisqu'ils sont présents à l'état de traces dans une matrice complexe d'où des difficultés analytiques. Nous proposons dans ce travail le développement de deux méthodes d'analyse respectives pour 16 HAP et 22 dérivés des HAP en vue de leur quantification dans les particules fines de l'atmosphère.

2 INSTRUMENTS ANALYTIQUES

La méthode mise en place pour l'analyse des HAP présents sous forme particulaire dans l'air ambiant fait appel à la chromatographie liquide haute performance en phase inverse couplée à une détection UV et par fluorescence. En effet, l'ensemble des 16 HAP étudiés absorbent le rayonnement UV dans la gamme spectrale allant de 250 à 420 nm. La présence de liaisons π permet aussi d'utiliser la fluorescence pour analyser les HAP. Cette chaîne analytique est équipée d'une pompe Waters 6 voies 2695, d'un détecteur UV à barrette de diodes (Waters 996) et d'un fluorimètre à longueurs d'ondes multiples (Waters 2475). La colonne utilisée est à polarité de phase inverse, type Nucleosil 100-5 C18 HAP (Macherey-Nagel), de granulométrie 5 μm , de longueur 25 cm et de diamètre interne 2 mm.

La méthode mise en place pour l'analyse des dérivés nitrés et oxygénés des HAP dans les particules fines atmosphériques fait quant à elle appel à un système de chromatographie liquide ultra performance (Acquity UPLC Waters) couplée à un spectromètre de masse par temps de vol (LCT Premier XE Waters) utilisant l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) en mode négatif. L'UPLC est équipée d'une colonne Acquity UPLC™ BEH C₁₈ (100 mm x 2,1 mm) remplie de particules de 1,7 μm (Waters) et thermostatée à 30°C. Ce nouvel instrument allie les avantages de la séparation par chromatographie liquide et ceux de la détection par spectrométrie de masse et semble être prometteur pour l'analyse des dérivés polaires des HAP. De plus, la majorité des études portant sur la caractérisation de la matière organique particulaire utilise la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Or cette technique se limite surtout aux composés apolaires et semi-polaires ne donnant accès qu'à une faible fraction de la matière organique particulaire (10 à 20% du carbone organique total selon [3]).

3 RESULTATS

3.1 Optimisation de la séparation chromatographique des HAP

L'optimisation de la méthode passait tout d'abord par l'obtention d'un gradient d'élution adéquat avec des temps de rétention suffisamment espacés pour pouvoir ensuite optimiser les longueurs d'onde d'excitation et d'émission propres à un ou plusieurs HAP. L'élution des composés est donc réalisée par un gradient de solvant binaire {acétonitrile (Merck, grade HPLC), eau (Merck, grade HPLC)}. Le programme d'élution est présenté dans le Tableau 1. Le débit d'élution est constant à $0,25 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Le volume d'injection est de $20 \mu\text{L}$.

Temps (min)	Eau (%)	Acétonitrile (%)
0	60	40
27,5	5	95
37,5	0	100
45	60	40
60	60	40

Tableau 1 : Gradient d'élution pour la séparation par HPLC des 16 HAP

Une fois le gradient d'élution obtenu, il fallait s'assurer d'avoir des mesures reproductibles pour que les composés soient convenablement détectés. Pour cela, nous avons effectué dix injections consécutives d'une solution étalon. Nous avons obtenu une dispersion des résultats (coefficient de variation) inférieure à 0,2% et 3,5% respectivement pour la mesure des temps d'élution et des aires. Ces résultats montrent bien la bonne stabilité dans le temps des aires mesurées et des temps d'élution.

3.2 Optimisation de la détection des HAP

Les méthodes proposées dans la littérature se limitent généralement à l'utilisation d'une longueur d'onde d'absorption en UV ($\lambda_{\text{abs}} = 254 \text{ nm}$) et de quelques couples de longueurs d'onde d'émission et d'excitation en fluorimétrie. Afin d'obtenir un maximum de sensibilité et de sélectivité, nous avons fait le choix de travailler à des longueurs d'onde spécifiques de chacun des 16 HAP étudiés. L'emploi d'une barrette de diodes permet une mesure simultanée sur toute une gamme de longueurs d'onde. De cette façon, nous avons obtenu les spectres d'absorption de chaque HAP et ainsi déduit les longueurs d'ondes d'absorption maximale en UV. Ces données sont

résumées dans le Tableau 2. Ce tableau indique également les valeurs des gains appliquées pour chaque couple de longueur d'onde (λ_{ex} et λ_{em}) en fluorimétrie.

Détecteur	Fluorimétrie				UV
Composés	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Gain	Temps (min)	λ_{abs} (nm)
naphthalène (NAP)	275	328	× 1	t < 16,0	220,4
acénaphthylène (ACY)					229,8
acénaphthène (AC)	289	323	× 1	16,0 < t < 20,3	225,1
fluorène (FL)	289	323	× 1	16,0 < t < 20,3	262,7
phénanthrène (PHE)	252	361	× 1	20,3 < t < 21,7	253,3
anthracène (ANT)	252	401	× 1	21,7 < t < 23,1	253,3
fluoranthène (FLA)	337	453	× 1	23,1 < t < 24,5	234,5
pyrène (PY)	336	382	× 1	24,5 < t < 26,6	239,2
benzo[a]anthracène (BaA)	289	388	× 1	26,6 < t < 29,3	286,4
chrysène (CHR)	269	383	× 1	29,3 < t < 30,6	267,5
benzo[b]fluoranthène (BbF)	302	455	× 1	30,6 < t < 33,4	258,0
benzo[k]fluoranthène (BkF)	300	406	× 1	33,4 < t < 34,8	239,2
benzo[a]pyrène (BaP)	365	405	× 1	34,8 < t < 36,3	295,8
dibenzo[a,h]anthracène (DBahA)	298	397	× 1	36,3 < t < 38,6	295,8
benzo[g,h,i]pérylène (BghiP)	365	422	× 10	38,6 < t < 40,3	300,6
indéno[1,2,3-c,d]pyrène (IP)	365	500	× 10	t > 40,3	248,6

Tableau 2 : programmation des couples de longueurs d'ondes du fluorimètre et de l'UV

Après optimisation, une bonne séparation des 16 HAP étudiés a été obtenue comme le montre la Figure 1.

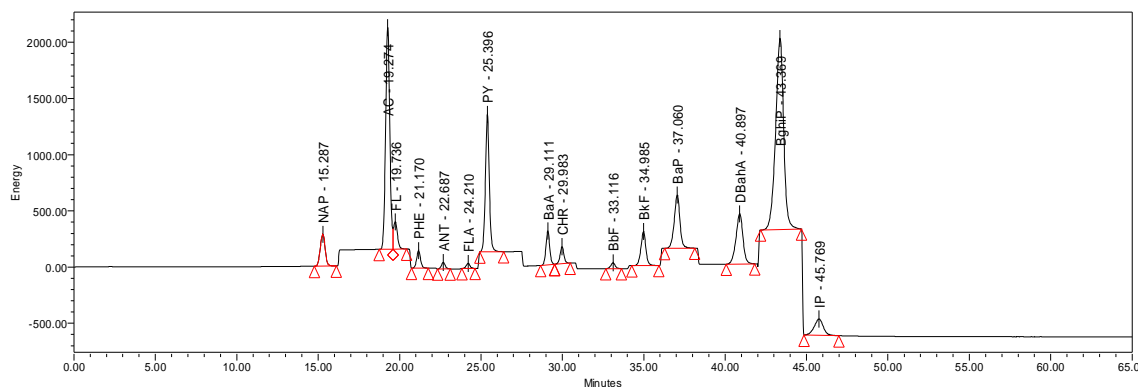


Figure 1 : Exemple d'un chromatogramme d'un mélange de 16 HAP détectés par fluorimétrie
L'acénaphthylène n'est pas présent sur le chromatogramme puisqu'il n'est détecté qu'en UV.

3.3 Quantification des HAP et limites de détection

Les courbes d'étalonnage de chaque composé ont été tracées afin d'analyser quantitativement des solutions étalons de HAP préparées dans l'acétonitrile à des concentrations variant de 0,03 $\mu\text{g.L}^{-1}$ à 4 mg.L^{-1} . Ces courbes étalons permettent en outre de contrôler la linéarité de l'aire des pics en fonction de la concentration. Nous

obtenons des coefficients de détermination R^2 supérieurs à 0,999 sur cette gamme de concentrations (figure 2).

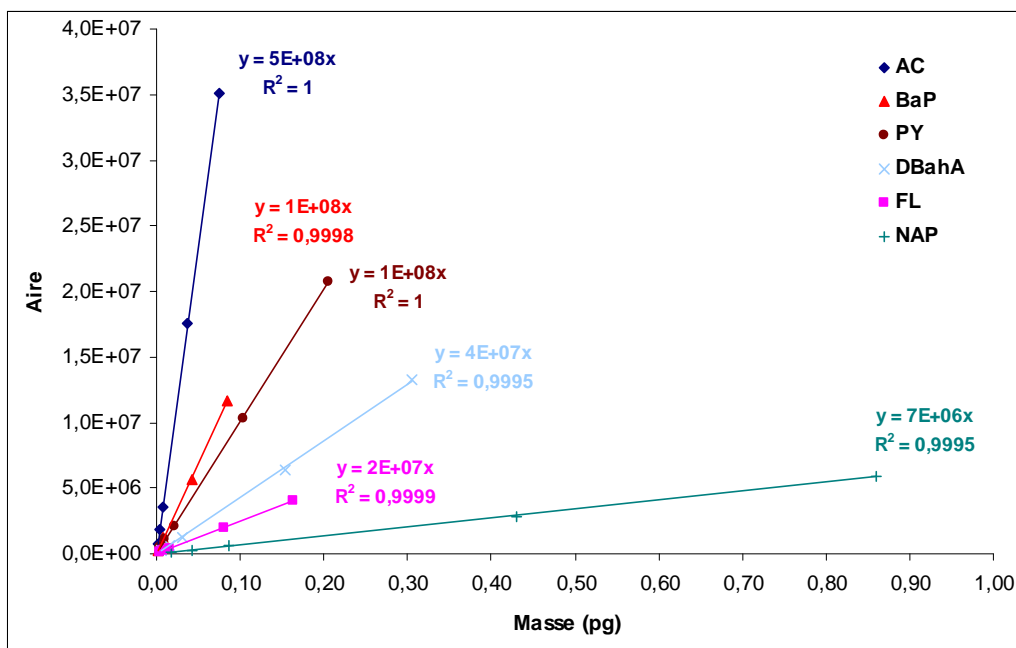


Figure 2 : Droites d'étalonnage de quelques HAP

On observe de plus une très bonne corrélation entre les réponses des deux détecteurs pour tous les HAP mesurés ($R^2 > 0,990$). La détermination des limites de détection a été faite à partir des chromatogrammes obtenus avec les solutions étalons les plus diluées. Le calcul est effectué selon la méthode du bruit de fond. Ces limites de détection obtenues, variant de 0,001 à 3,17 $\mu\text{g.L}^{-1}$ selon le mode de détection, reflètent la sensibilité de la méthode. Si l'on compare la sensibilité de ces modes de détection, le fluorimètre est jusqu'à 2000 fois plus sensible que l'UV.

HAP	Limites de détection ($\mu\text{g.L}^{-1}$)		
	UV	Fluorescence	UV/Fluo
NAP	0,56	0,027	21
ACY	0,95		
AC	1,16	0,006	193
FLU	3,17	0,005	634
PHE	0,90	0,013	69
ANT	0,33	0,005	66
FLA	2,14	0,020	107
PY	0,72	0,001	720
BaA	0,69	0,002	345
CHR	0,31	0,004	78
BbF	1,15	0,008	144
BkF	1,85	0,001	1850
BaP	2,36	0,001	2360
DBahA	0,83	0,006	138
BghiP	2,30	0,005	460
IP	3,00	0,043	70

Tableau 3 : Comparaison de la sensibilité : UV vs fluorescence

3.4 Optimisation de la séparation chromatographique des dérivés des HAP

13 nitro-HAP et 9 oxy-HAP ont été séparés et identifiés. La séparation chromatographique de ces dérivés nitrés et oxygénés dissous dans le méthanol a été effectuée à l'aide d'un gradient d'élution présenté dans le tableau 4 à un débit de $0,2 \text{ mL.min}^{-1}$. Le volume d'injection est de $5 \mu\text{L}$. Les dérivés ont été identifiés par leurs masses et par la comparaison des temps de rétention obtenus avec ceux de solutions standards.

Temps (min)	Eau + 10 mM CH_2O_2 (%)	Méthanol (%)
0	80	20
20	10	90
27	10	90
30	80	20

Tableau 4 : Gradient d'élution pour la séparation par UPLC de quelques dérivés nitrés et oxygénés des HAP

La figure 3 présente les différents chromatogrammes obtenus pour chaque masse extraite. Ces chromatogrammes montrent bien la capacité du spectromètre de masse de type temps de vol à détecter des composés quasiment co-élus. Cela représente un atout majeur pour les futures analyses qui porteront sur des particules atmosphériques possédant une matrice beaucoup plus complexe.

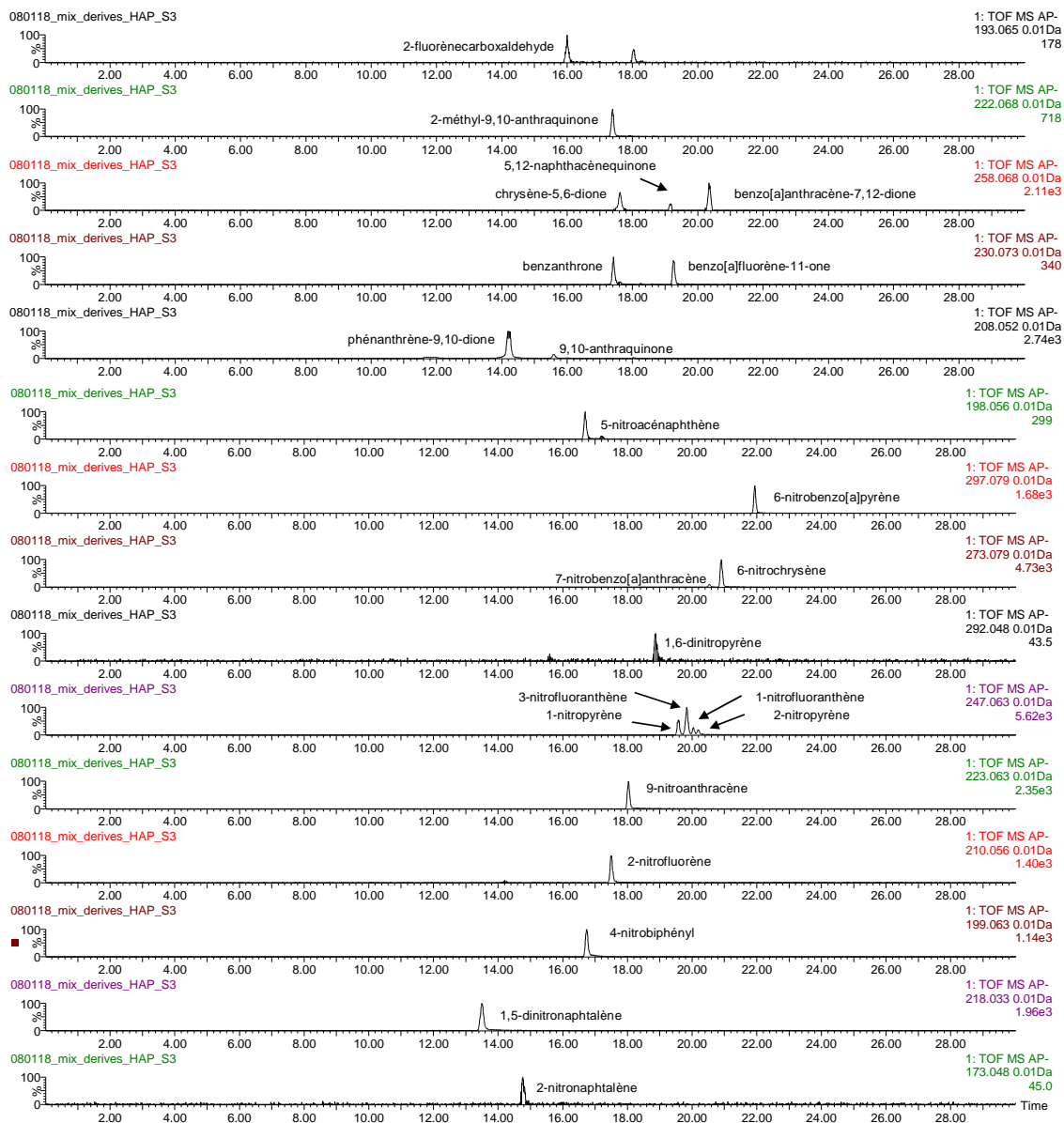


Figure 3 : Exemple de chromatogrammes d'un mélange de dérivés nitrés et oxygénés des HAP par spectrométrie de masse

Comme pour les HAP, la quantification des nitro- et oxy-HAP s'est faite à l'aide de 8 solutions étalons avec des concentrations variant de 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ à 10 mg.L^{-1} ($R^2 > 0,990$).

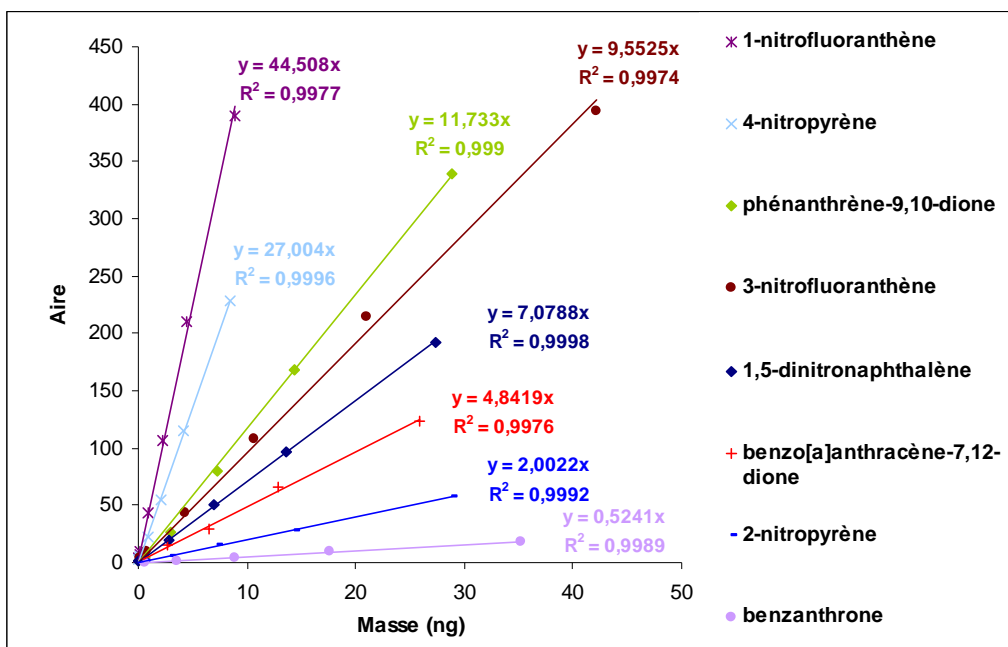


Figure 4 : Droites d'étalonnage de quelques dérivés nitrés et oxygénés des HAP

Les limites de détection obtenues sont regroupées dans le tableau 5 et comparées avec celles obtenues par des techniques similaires.

Composés	Limites de détection (pg)		
	LC-APCI-MS [ce travail]	LC-APCI-MS [4]	LC-APCI-MS-MS [5]
Nitro-HAP			
2-nitronaphthalène	1500		
1,5-dinitronaphthalène	50		
5-nitroacénaphthène	580		
2-nitrofluorène	300		
9-nitroanthracène	60		
1-nitrofluoranthène	35		
3-nitrofluoranthène	45		
1-nitropyrene	52	8	
2-nitropyrene	150		
6-nitrochrysène	25		
6-nitrobenzo[a]pyrène	25	6	
7-nitrobenzo[a]anthracène	35		
4-nitrobiphényl	28		
Oxy-HAP			
9,10-anthraquinone	700		18
benzanthrone	400		37
benzo[a]anthracène-7,12-dione	2500		4
benzo[a]fluorène-11-one	150		
2-méthyl-9,10-anthraquinone	170		5
5,12-naphthacènequinone	8150		
2-fluorèncarboxaldéhyde	925		
phénanthrène-9,10-dione	85		23
chrysène-5,6-dione	2150		

Tableau 5 : Limites de détection de quelques dérivés nitrés et oxygénés des HAP

D'après les résultats obtenus, la méthode analytique développée est plus sensible pour les dérivés nitrés par rapport aux oxygénés. Cela peut être dû à une ionisation en APCI moins efficace pour ces derniers. Si l'on compare nos valeurs de limites de détection avec celles obtenues dans d'autres travaux portant sur un nombre plus restreint de composés ([4], [5]), notre instrument d'analyse semble être moins sensible. Il faut noter dans les travaux [5] l'utilisation d'un spectromètre de masse de type triple quadripôle qui consiste à sélectionner un ion par une première spectrométrie de masse, à le fragmenter, puis à effectuer une deuxième spectrométrie de masse sur les fragments ainsi générés. Ce type d'instrument est donc beaucoup plus sensible puisqu'il est plus sélectif.

4 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les résultats présentés dans ce travail indiquent que la méthode d'analyse développée pour la quantification des 16 HAP est suffisamment sensible et sélective pour être appliquée à des échantillons de particules atmosphériques. Les premières analyses menées à partir de particules certifiées sont encourageantes.

De plus, notre travail montre que la technique UPLC-APCI-TOF-MS semble être une technique alternative intéressante pour la détermination des dérivés nitrés et oxygénés des HAP. D'après les valeurs de limites de détection obtenues, il sera toutefois nécessaire de concentrer nos échantillons sous flux d'azote pour atteindre des limites de détection suffisantes.

L'optimisation de l'étape d'extraction des HAP et de leurs dérivés à partir de particules certifiées est actuellement en cours au laboratoire. Ce développement pourra ensuite se poursuivre sur des particules réelles atmosphériques.

5 REMERCIEMENTS

Ces travaux s'intègrent dans le programme de l'Institut de Recherches en ENvironnement Industriel (IRENI) financé par la Région Nord-Pas-de-Calais, le Ministère de l'éducation nationale, de l'enseignement supérieur et de la recherche et des fonds européens (FEDER).

6 BIBLIOGRAPHIE

- [1] Saxena, P., Hildemann, LM. Water-soluble organics in atmospheric particles: a critical review of the literature and application of thermodynamics to identify candidate compounds. *Journal of Atmospheric Chemistry* 1996; 24 (1): 57-109.
- [2] Kanakidou, M., Seinfeld, JH., Pandis, SN., et al. Organic aerosol and global climate modelling: a review. *Atmospheric Chemistry and Physics* 2005; 5 (4): 1053-1123.
- [3] Rogge, WF., Mazureck, MA., Hildemann, LM., et al. Quantification of urban organic aerosols at a molecular level: identification, abundance and seasonal variation. *Atmospheric Environment* 1993; 27A(8): 1309-1330.
- [4] Schauer, C., Niessner, R., Pöschl, U. Analysis of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons by liquid chromatography with fluorescence and mass spectrometry detection: air particulate matter, soot, and reaction products studies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2004; 378 (3): 725-736.
- [5] Delhomme, O., Millet, M., Herckes, P. Determination of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric aerosol samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta* 2007; 74 (4): 703-710.