

NORME
INTERNATIONALE

ISO
6439

Deuxième édition
1990-05-15

**Qualité de l'eau — Détermination de l'indice
phénol — Méthode spectrométrique à l' amino-4
antipyrine après distillation**

iTeh STANDARD PREVIEW

*Water quality — Determination of phenol index — 4-Aminoantipyrine spectrometric
methods after distillation*

[ISO 6439:1990](https://standards.iso.org/iso/6439-1990)

[https://standards.itih.ai/catalog/standards/sist/3c26423b-dc4e-41a0-8777-
f43ec92c305/iso-6439-1990](https://standards.itih.ai/catalog/standards/sist/3c26423b-dc4e-41a0-8777-f43ec92c305/iso-6439-1990)



Numéro de référence
ISO 6439 : 1990 (F)

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

La Norme internationale ISO 6439 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*.

[ISO 6439:1990](#)

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 6439 : 1984), dont elle constitue une révision mineure.

L'annexe A fait partie intégrante de la présente Norme internationale.

© ISO 1990

Droits de reproduction réservés. Aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie et les microfilms, sans l'accord écrit de l'éditeur.

Organisation internationale de normalisation
Case postale 56 • CH-1211 Genève 20 • Suisse

Imprimé en Suisse

Introduction

Le terme «indice-phénol» utilisé dans la présente Norme internationale ne comprend que les phénols qui réagissent avec l' amino-4 antipyrine en formant des composants colorés.

Dans une eau contenant du phénol, il existe généralement d'autres composés phénoliques associés au phénol, dont la sensibilité aux réactifs utilisés dans les méthodes ci-dessous n'est pas nécessairement la même.

La composition en différents composés phénoliques (3.1) présents dans un échantillon donné est imprévisible. Il est évident, cependant, que l'utilisation d'un étalon composé d'un mélange de phénols ne peut pas être applicable à tous les échantillons. C'est pourquoi le phénol lui-même a été choisi comme étalon, et toute coloration produite par réaction des autres composés phénoliques est mesurée comme étant produite par le phénol et exprimée en tant qu'indice phénol (3.2).

Il n'est pas possible d'utiliser le mode opératoire spécifié dans la présente Norme Internationale pour différencier les différentes formes de phénols. Certains composés phénoliques ayant un groupe substituant alkyle, aryle, ou nitro en position *para* ne donnent pas de coloration avec l' amino-4 antipyrine.

Par contre, des composés ayant comme substituant en position *para* des groupes carboxyle, halogène, hydroxyle, méthoxyle ou sulfonyle produisent une coloration en présence d' amino-4 antipyrine.

Page blanche

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 6439:1990

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/3c26423b-dc4e-41a0-8777-f43ec92cf305/iso-6439-1990>

Qualité de l'eau — Détermination de l'indice phénol — Méthode spectrométrique à l' amino-4 antipyrine après distillation

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale prescrit une méthode de détermination de «l'indice-phénol» (3.2) dans les eaux de boisson, les eaux de surface et dans les eaux résiduaires.

Après une distillation préliminaire, le mode opératoire présente deux méthodes d'application spécifique, à savoir :

méthode A (méthode colorimétrique directe) : cette méthode permet de déterminer un indice phénol supérieur à 0,10 mg/l dans la phase aqueuse (sans extraction au chloroforme) en utilisant le phénol comme étalon.

méthode B (méthode par extraction au chloroforme) : cette méthode permet de déterminer sans dilution des indices phénol de 0,002 mg/l à environ 0,10 mg/l lorsque le complexe final coloré est extrait et concentré dans une phase chloroformique en utilisant le phénol comme étalon.

NOTES

1 Les limites de détection pouvant être obtenues avec les deux méthodes sont insuffisantes pour vérifier la conformité avec la directive 80/778/EEC pour les eaux de boisson.

2 Suivant les résultats d'un essai interlaboratoire, en Allemagne, avec une méthode presque identique à la méthode B, la limite inférieure de détection est de 0,01 mg/l.

2 Références normatives

Les normes suivantes contiennent des dispositions qui, par suite de la référence qui en est faite, constituent des dispositions valables pour la présente Norme internationale. Au moment de la publication, les éditions indiquées étaient en vigueur. Toute norme est sujette à révision et les parties prenantes des accords fondés sur la présente Norme internationale sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer les éditions les plus récentes des normes indiquées ci-après. Les membres de la CEI et de l'ISO possèdent le registre des Normes internationales en vigueur à un moment donné.

ISO 5667-1 : 1980, *Qualité de l'eau — Échantillonnage — Partie 1: Guide général pour l'établissement des programmes d'échantillonnage.*

ISO 5667-2 : 1982, *Qualité de l'eau — Échantillonnage — Partie 2: Guide général sur les techniques d'échantillonnage.*

ISO 5667-3 : 1985, *Qualité de l'eau — Échantillonnage — Partie 3: Guide général sur la manipulation et la conservation des échantillons.*

3 Définitions

Pour les besoins de la présente Norme internationale, les définitions suivantes s'appliquent :

3.1 composés phénoliques : Dérivés hydroxy du benzène et de ses analogues.

3.2 indice phénol : Nombre donnant la concentration, en milligrammes de phénol par litre, déduit de la mesure de la coloration produite par les différents composés phénoliques en suivant le mode opératoire décrit dans la présente Norme internationale.

4 Méthode A — Méthode colorimétrique directe

4.1 Principe

Les phénols sont séparés des impuretés et des agents de conservation par distillation. Le taux de volatilisation des phénols étant graduel, le volume de distillat doit être égal au volume d'échantillon à distiller.

Les phénols distillables à la vapeur réagissent avec l' amino-4 antipyrine à un pH de $10,0 \pm 0,2$ en présence d'hexacyanoferrate(III) de potassium en formant un complexe coloré avec l' amino-4 antipyrine.

Ce complexe est conservé dans une solution aqueuse et l'absorbance est mesurée à 510 nm. L'indice phénol est exprimé en milligrammes par litre de phénol (C_6H_5OH).

La quantité minimale de phénol décelable est de 0,01 mg pour une cuve de 50 mm lors de la mesure spectrométrique et pour un volume de distillat utilisé lors du dosage de 100 ml.

4.2 Réactifs

Au cours de l'analyse, utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue, et de l'eau distillée ou de l'eau de pureté équivalente.

4.2.1 Amino-4 antipyrine, solution à 20 g/l.

Dissoudre 2,0 g d' amino-4 antipyrine $C_{11}H_{13}N_3O$ dans l'eau et diluer à 100 ml. Préparer ce réactif extemporanément.

La solution ne peut être réutilisée si les particules rouges subsistent après mise en solution.

4.2.2 Chlorure d'ammonium, solution à 20 g/l.

Dissoudre 20 g de chlorure d'ammonium (NH₄Cl) dans l'eau et diluer 1 000 ml.

4.2.3 Hydroxyde d'ammonium ρ = 0,90 g/ml.

4.2.4 Tartrate double de potassium et de sodium,¹⁾ solution tampon, pH = 10.

Dissoudre 34 g de chlorure d'ammonium (NH₄Cl), 200 g de tartrate double de potassium et de sodium (NaKC₄H₄O₆), dans 700 ml d'eau. Ajouter 150 ml d'hydroxyde d'ammonium (4.2.3) et diluer avec de l'eau à 1 000 ml.

4.2.5 Sulfate de cuivre(II), pentahydraté (CuSO₄·5H₂O).

4.2.6 Sulfate de cuivre(II), solution à 100 g/l.

Dissoudre 190 g de sulfate de cuivre(II) pentahydraté (4.2.5) dans de l'eau et diluer à 1 000 ml.

4.2.7 Acide chlorhydrique, ρ = 1,19 g/ml.

4.2.8 Méthylorange, indicateur.

Dissoudre 0,5 g de méthylorange dans l'eau et diluer à 1 000 ml.

4.2.9 Phénol, solution mère, 1,00 g/l.

ATTENTION — Le phénol ne doit pas venir en contact avec la peau.

Dissoudre 1,00 g de phénol dans de l'eau récemment bouillie et refroidie, dans une fiole jaugée de 1 000 ml et compléter au trait de jauge avec cette même eau.

Cette solution est stable pendant environ 1 semaine.

IMPORTANT — Le phénol ne doit pas être liquide ou décoloré. Un contrôle de la concentration en phénol par titrage selon le mode opératoire décrit dans l'annexe A peut être nécessaire.

4.2.10 Phénol, solution étalon correspondant à 0,01 g de C₆H₅OH par litre.

Diluer 10,0 ml de la solution mère de phénol (4.2.9) à 1 000 ml avec de l'eau récemment bouillie et refroidie, dans une fiole jaugée de 1 000 ml.

1 ml de cette solution étalon contient 0,01 mg de C₆H₅OH.

Préparer cette solution le jour de l'emploi.

4.2.11 Phénol, solution étalon correspondant à 0,001 g de C₆H₅OH par litre.

Diluer 50 ml de la solution étalon de phénol (4.2.10) à 500 ml avec de l'eau récemment bouillie et refroidie, dans une fiole jaugée de 500 ml.

1 ml de cette solution étalon contient 0,001 mg de C₆H₅OH.

Préparer cette solution dans les 2 h précédant l'utilisation.

4.2.12 Acide phosphorique, ρ = 1,70 g/ml.

4.2.13 Acide phosphorique, solution 1 + 9.

Mélanger 1 volume d'acide phosphorique (4.2.12) avec 9 volumes d'eau.

4.2.14 Hexacyanoferrate(III) de potassium,²⁾ solution à 80 g/l.

Dissoudre 8,0 g d'hexacyanoferrate(III) de potassium {K₃[Fe(CN)₆]} dans de l'eau et diluer à 100 ml. Filtrer si nécessaire.

Préparer cette solution dans la semaine précédant l'emploi.

4.2.15 Sulfate de sodium, Na₂SO₄, anhydre et en grain.

4.2.16 Réactifs spéciaux pour les distillats turbides.

4.2.16.1 Acide sulfurique, solution à 0,5 mol/l.

4.2.16.2 Chlorure de sodium.

4.2.16.3 Hydroxyde de sodium, solution à 2,5 mol/l.

Dissoudre 10 g de NaOH dans 100 ml d'eau.

4.2.16.4 Chloroforme.

ATTENTION — Le chloroforme est toxique et est suspecté d'être cancérigène. Ne pas respirer les vapeurs. Éviter tout contact avec la peau et les yeux.

4.3 Appareillage

4.3.1 Appareil de distillation, en verre, constitué d'un ballon à distiller de 1 litre en verre borosilicaté avec un réfrigérant Graham ou l'équivalent.

4.3.2 pH-mètre, avec des électrodes appropriées.

1) Nomenclature systématique : 2,3-dihydroxybutanedioate de potassium et de sodium.

2) Nom habituel : ferricyanure de potassium.

4.3.3 Spectromètre, à sélecteurs à variation continue ou discontinue, permettant de travailler à 510 nm et muni d'une cuve de parcours optique de 1,0 à 10 cm. La taille de la cuve utilisée dépend de l'absorbance des solutions colorées devant être mesurées et des caractéristiques du spectromètre. En général, si les absorbances sont supérieures à 1,0 avec une grande cuve, la taille inférieure doit être utilisée.

4.4 Échantillonnage et échantillons

L'échantillonnage des différentes sortes d'eau doit être effectué conformément à l'ISO 5667-1, l'ISO 5667-2 et l'ISO 5667-3 en tenant compte des précautions complémentaires suivantes. Les échantillons doivent être prélevés dans des bouteilles en verre.

Les composés phénoliques dans l'eau sont susceptibles de subir des oxydations chimiques et biochimiques. C'est pourquoi, à moins que les échantillons ne soient analysés dans les 4 h après leur prélèvement, ils doivent être conservés dès qu'ils sont prélevés, en utilisant le mode opératoire ci-après :

- acidifier les échantillons à un pH d'environ 4,0 avec l'acide phosphorique (4.2.13) et en utilisant le méthylorange (4.2.8) ou un pH-mètre (4.3.2) pour contrôler le pH;
- inhiber l'oxydation biochimique des composés phénoliques dans l'échantillon en ajoutant 1,0 g de sulfate de cuivre(II) (4.2.5) par litre d'échantillon;
- conserver ensuite l'échantillon au froid (5 °C à 10 °C). Analyser les échantillons ainsi conservés dans les 24 h qui suivent le prélèvement.

4.5 Étape préliminaire de distillation

L'utilisation de sulfate de cuivre(II) comme décrit en 4.5.1 pendant la distillation d'un échantillon acide permet la formation de sulfure de cuivre(II) sans décomposition en sulfure d'hydrogène. La solution acide empêche également la précipitation d'hydroxyde de cuivre(II), qui agit comme un agent oxydant sur les composés phénoliques.

4.5.1 Introduire 500 ml d'échantillon dans un bécher. Si l'échantillon n'a pas été conservé avec du sulfate de cuivre(II) [4.4.2 b)], ajouter 5 ml de solution de sulfate de cuivre (II) (4.2.6), ajuster le pH de l'échantillon entre 1 et 2 avec une solution d'acide phosphorique (4.2.13). Utiliser une éprouvette graduée de 500 ml comme récepteur.

Distiller 400 ml d'échantillon. Arrêter la distillation et, quand l'ébullition cesse, ajouter 100 ml d'eau dans le ballon à distiller. Poursuivre la distillation, jusqu'à ce que le volume total recueilli soit de 500 ml.

NOTE — Il est également possible de distiller de plus petites quantités.

4.5.2 Si le distillat est trouble, une seconde distillation peut s'avérer nécessaire. Acidifier le distillat avec une solution d'acide phosphorique (4.2.13), ajouter 5 ml de la solution de sulfate de cuivre(II) (4.2.7), puis répéter la distillation comme décrit en 4.5.1. En général, la seconde distillation supprime le trouble. Toutefois, si le second distillat est encore trouble, extraire un autre échantillon comme décrit en 4.5.3.

4.5.3 Extraire aussi rapidement que possible une partie aliquote des 500 ml de l'échantillon pour laboratoire comme suit.

Ajouter 4 gouttes d'indicateur au méthylorange (4.2.8) et une quantité suffisante d'acide sulfurique (4.2.16.1) pour acidifier la solution. Transférer dans une ampoule à décanter et ajouter 150 g de chlorure de sodium (4.2.16.2). Mélanger en agitant après avoir ajouté cinq fois du chloroforme, le premier ajout étant de 40 ml, les quatre suivants étant de 25 ml chacun. Séparer les phases chloroformiques après chaque extraction et les verser dans une deuxième ampoule à décanter. Mélanger en ajoutant trois fois une solution d'hydroxyde de sodium (4.2.16.3), le premier ajout étant de 4,0 ml, les deux autres de 3,0 ml chacun. Séparer la solution d'hydroxyde de sodium après chaque extraction. Mélanger les extraits alcalins, chauffer sur un bain d'eau jusqu'à ce que le chloroforme ait été éliminé, puis refroidir et diluer à 500 ml avec de l'eau. Procéder à la distillation comme décrit en 4.5.1.

NOTE — Dans certains cas, dans des eaux résiduaires ayant une forte concentration en composés phénoliques, une élévation de température apparaît pendant l'extraction.

4.6 Mode opératoire

4.6.1 Prise d'essai

Introduire 100 ml du distillat, ou une aliquote convenable ne contenant pas plus de 0,5 mg de phénol dans 100 ml, dans un bécher de 250 ml. Si l'échantillon est supposé contenir plus de 0,5 mg de phénol, une aliquote plus petite peut être utilisée. Des essais préalables peuvent être nécessaires pour déterminer le volume d'aliquote approprié. En pratique, la plus petite aliquote doit être de 10 ml et ne pas contenir plus de 0,5 mg de phénol. Le distillat et toutes les autres solutions utilisées doivent être à température ambiante.

4.6.2 Essai à blanc

Effectuer un essai à blanc parallèlement au dosage, en remplaçant la prise d'essai par 100 ml d'eau.

4.6.3 Établissement de la courbe d'étalonnage

4.6.3.1 Préparation d'une série de solutions étalons

Préparer une série de solutions étalons dans sept fioles jaugées de 500 ml contenant 0 ml; 25 ml; 50 ml; 100 ml; 200 ml et 250 ml de la solution étalon de phénol (voir 4.2.10). Compléter au trait de jauge avec de l'eau. Toutes les solutions utilisées doivent être à la température ambiante. Les solutions étalons doivent être traitées de la même façon qu'en 4.5.1.

4.6.3.2 Formation du composé d'absorption

Laisser se développer la coloration dans la série des solutions étalons, conformément au mode opératoire décrit en 4.6.4.

4.6.3.3 Mesurages spectrométriques.

Après 15 min, transférer les solutions dans les cellules d'absorption et mesurer l'absorbance de chaque solution étalon à 510 nm en utilisant l'eau dans la cuve de référence.

4.6.3.4 Tracé de la courbe d'étalonnage

Sur un graphe, porter les absorbances en fonction des masses de phénol correspondantes, en milligrammes.

4.6.4 Dosage

Ajouter 5 ml de solution tampon (4.2.4) à chaque prise d'essai (4.6.1), ou 5 ml de solution de chlorure d'ammonium (4.2.2) à chaque prise d'essai. Ajuster le pH à $10 \pm 0,2$ avec de l'hydroxyde d'ammonium (4.2.3). Ajouter 2,0 ml de solution d'amino-4 antipyrine. Mélanger immédiatement, puis ajouter 2,0 ml de solution d'hexacyanoferrate(III) de potassium (4.2.14) et mélanger à nouveau immédiatement.

Après 15 min, mesurer l'absorbance de chaque solution dans une cuve (voir 4.3.3) à la longueur d'onde du maximum d'absorbance (environ 510 nm) avec de l'eau dans la cuve de référence. Par référence à la courbe d'étalonnage (4.6.3.4), calculer la masse, en milligrammes, de phénol équivalent aux composés phénoliques dans la prise d'essai, après avoir fait la correction pour l'essai à blanc (4.6.2).

Estimer l'indice phénol de la prise d'essai par référence à la courbe d'étalonnage et à l'absorbance obtenue avec la solution d'échantillon.

4.7 Expression des résultats

L'indice phénol, exprimé en milligrammes, par litre, est donné par la formule suivante :

$$\frac{m}{V_0} \times 1\,000$$

où

m est la masse, en milligrammes, de phénol équivalent aux composés phénoliques dans la prise d'essai;

V_0 est le volume du distillat, exprimé en millilitres, de la prise d'essai.

4.8 Interférences

Les interférences courantes qui peuvent apparaître dans les eaux sont dues à des bactéries décomposant le phénol, des substances oxydantes ou réductrices et des conditions de forte alcalinité de l'échantillon. La dégradation biologique est inhibée par addition du sulfate de cuivre(II) [4.4 b)] à l'échantillon. L'acidification par l'acide phosphorique [4.4 a)] permet de se prémunir de la présence de l'ion cuivre et élimine toutes les modifications chimiques dues à des conditions de forte alcalinité. Le traitement préalablement nécessaire pour supprimer les composés interférants avant l'analyse peut entraîner de façon inévitable l'élimination ou la perte de certains types de composés phénoliques.

En conséquence, certaines eaux résiduaires fortement contaminées peuvent nécessiter la mise en œuvre de techniques particulières pour éliminer les interférences et récupérer quantitativement des composés phénoliques.

Quelques méthodes d'élimination de certaines interférences sont proposées :

4.8.1 Agents oxydants

Si l'échantillon sent le chlore, ou si de l'iode se dégage de l'iodure de potassium par acidification de l'échantillon, les agents oxydants ainsi découverts doivent être immédiatement supprimés après le prélèvement.

Une solution d'acide ascorbique doit être ajoutée, immédiatement après l'échantillonnage, pour détruire toutes les substances oxydantes. Un excès d'acide ascorbique n'interfère pas puisqu'il est supprimé au cours de la distillation.

4.8.2 Huiles et goudrons

Si l'échantillon contient de l'huile ou du goudron, certains composés phénoliques peuvent être dissous dans ces composés. Une extraction alcaline, en l'absence de sulfate de cuivre(II) peut être mise en œuvre pour éliminer l'huile ou le goudron. Ajuster le pH de l'échantillon entre 12 et 12,5 avec de l'hydroxyde de sodium (4.2.16.3) afin d'éviter l'extraction des composés phénoliques. Extraire le mélange avec du tétrachlorure de carbone aussi rapidement que possible. Rejeter la phase de tétrachlorure de carbone. Éliminer immédiatement tout le tétrachlorure de carbone demeuré dans la phase aqueuse de l'échantillon par un chauffage modéré et ajuster le pH à 4,0 (voir 4.4).

4.8.3 Composés sulfureux

Des composés qui libèrent du sulfure d'hydrogène lors de l'acidification peuvent interférer durant le dosage du phénol. Le traitement de l'échantillon acidifié avec du sulfate de cuivre (II) supprime généralement de telles interférences. Ajouter une quantité suffisante de sulfate de cuivre(II) (4.2.6) à l'échantillon pour obtenir une couleur bleu clair ou jusqu'à ce qu'il n'apparaisse plus de précipité de sulfure de cuivre(II), puis acidifier l'échantillon avec de l'acide phosphorique (4.2.12) jusqu'au virage du méthylorange (4.2.8).

4.8.4 Agents réducteurs

En présence d'agents réducteurs, ajouter un excès d'hexacyanoferrate(III) de potassium.

4.8.5 Amines

Dans ces conditions spécifiées, quelques amines seront déterminées comme phénols, ce qui se traduira par des valeurs trop élevées. Cette interférence peut être réduite au minimum par distillation à un pH inférieur à 0,5.

5 Méthode B — Méthode par extraction au chloroforme

5.1 Principe

Les composés phénoliques sont séparés des impuretés et des agents de conservation par distillation. Le taux de volatilisation des phénols étant graduel, le volume de distillat doit être égal au volume d'échantillon à distiller.

Les phénols distillables à la vapeur réagissent avec l' amino-4 antipyrine à un pH de $10,0 \pm 0,2$ en présence d'hexacyanoferrate(III) de potassium en formant un complexe coloré avec l' amino-4 antipyrine.

Ce complexe coloré est extrait de la phase aqueuse avec du chloroforme et l'absorbance est mesurée à 460 nm. L'indice phénol est exprimé en milligrammes de phénol par litre.

Pour le mesurage spectrométrique, la quantité minimale décelable est de 0,05 mg de phénol pour une cuve de 5 cm et une extraction avec 25 ml de chloroforme ou pour une cuve de 10 cm et une extraction avec 50 ml de chloroforme. La concentration minimale décelable est de 0,002 mg/l de phénol pour un volume de distillat de 500 ml.¹⁾

5.2 Réactifs

Voir 4.2.

5.3 Appareillage

Identique à celui spécifié en 4.3, mais avec les modifications et additions suivantes :

5.3.1 Spectromètre, comme en 4.3.3, mais convenant pour l'emploi à 460 nm.

5.3.2 Entonnoir Büchner, muni d'un disque en verre fritté grossier ou d'un filtre séparateur de phase.

5.4 Échantillonnage et échantillons

Voir 4.4.

5.5 Mode opératoire

5.5.1 Prise d'essai

Placer 500 ml du distillat, ou une partie aliquote convenable ne contenant pas plus de 0,05 mg de phénol dilué à 500 ml, dans un bécher de 1 litre. Des essais préalables peuvent être nécessaires pour déterminer le volume de l'aliquote convenable. En pratique, la plus petite aliquote doit être de 50 ml, ne contenant pas plus de 0,05 mg de phénols. Le distillat et toutes les solutions utilisées doivent être à la température ambiante.

5.5.2 Essai à blanc

Effectuer un essai à blanc parallèlement au dosage, en remplaçant la prise d'essai par 500 ml d'eau.

5.5.3 Établissement de la courbe d'étalonnage

5.5.3.1 Préparation d'une série de solutions étalons

Préparer une série de solutions étalons, dans neuf fioles jaugées de 500 ml contenant 0 ml; 1 ml; 2 ml; 5 ml; 10 ml; 20 ml; 30 ml; 40 ml et 50 ml de la solution étalon de phénol (4.2.11). Compléter au trait de jauge avec de l'eau. Toutes les solutions utilisées doivent être à la température ambiante. Les solutions étalons doivent être traitées selon 4.5.1.

5.5.3.2 Formation du composé d'absorption

Laisser se développer la coloration dans la série des solutions étalons, conformément au mode opératoire décrit en 5.6.4.

5.5.3.3 Mesurages spectrométriques

Mesurer l'absorbance de chaque solution étalon à 460 nm, en utilisant le chloroforme dans la cuve de référence.

5.5.3.4 Tracé de la courbe d'étalonnage

Sur un graphe, porter les absorbances en fonction des masses de phénol correspondantes, en milligrammes.

5.5.4 Dosage

Ajouter 20 ml de solution tampon (4.2.4) à chaque prise d'essai (5.6.1) et ajuster le pH à $10 \pm 0,2$ avec de l'hydroxyde d'ammonium (4.2.3), si nécessaire. Transférer chaque mélange dans une ampoule à décanter de 1 litre. Ajouter 3,0 ml de solution d' amino-4 antipyrine (4.2.1), mélanger immédiatement, puis ajouter 3,0 ml de solution d'hexacyanoferrate(III) de potassium (4.2.14). Laisser la coloration se développer pendant 15 min.

Ajouter exactement 25 ml de chloroforme (4.2.16.4) dans chaque ampoule à décanter, si on utilise une cuve de 10 à 50 mm dans le spectromètre. Ajouter 50 ml de chloroforme si la cuve est de 100 mm. Agiter vigoureusement l'ampoule à décanter pendant 1 min, et laisser les phases se séparer.

Filtrer chaque extrait au chloroforme à travers des entonnoirs Büchner (5.3.2) contenant 5 g de sulfate de sodium (4.2.15) ou à travers un filtre de séparation de phase ou tout autre système approprié et les recueillir directement dans des fioles jaugées de 25 ml. Amener au volume avec du chloroforme. Utiliser des fioles jaugées de 50 ml si l'on utilise des cuves de 10 mm.

Régler le zéro d'absorbance de l'appareil à 460 nm à partir du chloroforme. Mesurer l'absorbance de l'essai à blanc et des extraits de l'échantillon, à la même longueur d'onde. Par référence à la courbe d'étalonnage (5.5.3.4), calculer la masse, en milligrammes, de phénol équivalant aux composés phénoliques dans la prise d'essai, après avoir fait la correction pour l'essai à blanc (5.6.2).

1) Voir la note à l'article 1.