

RAPPORT FINAL SUR L'ETUDE DE FAISABILITE DE L'EXTRACTION ET/OU DE LA PURIFICATION PAR « QUECHERS » POUR L'ANALYSE DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES » (HAP) DANS LE BIOTE

**Action D : Amélioration des opérations d'analyses
physico-chimiques**

C. Fallot, J .Cabillic
Décembre 2015

Programme scientifique et technique
Année 2015

Rapport final



Avec le soutien de



et de



Contexte de programmation et de réalisation

Ce rapport a été réalisé dans le cadre du programme d'activité AQUAREF pour l'année 2014.

Auteur (s) :

Julie Cabillic
LNE
julie.cabillic@lne.fr

Carine Fallot
LNE
carine.fallot@lne.fr

Approbateur :
Sophie Vaslin-Reimann
LNE
sophie.vaslin-reimann@lne.fr

Vérification du document :

François LESTREMAU
INERIS
francois.lestremau@ineris.fr

Sébastien BRISTEAU
BRGM
s.bristeau@brgm.fr

Les correspondants

Onema : Pierre-François Staub, Pierre.francois.staub@onema.fr

Etablissement : Sophie Vaslin-Reimann, sophie.vaslin-reimann@lne.fr

Référence du document : J. Cabillic et C. Fallot - Rapport final sur l'étude de faisabilité de l'extraction et/ou de la purification par QuEChERS pour l'analyse des HAP dans le biote - Rapport AQUAREF 2015 - 22 p.

Droits d'usage :	<i>Accès Libre</i>
Couverture géographique :	<i>International</i>
Niveau géographique :	<i>National</i>
Niveau de lecture :	<i>Professionnels, experts</i>
Nature de la ressource :	<i>Document</i>

SOMMAIRE

1. GLOSSAIRE	7
2. INTRODUCTION	8
3. EVALUATION DE LA METHODE QUECHERS POUR L'ANALYSE DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES (HAP) DANS LES BIOTES	9
3.1 Molécules étudiées.....	9
3.2 Conditions analytiques et matériels utilisés	9
3.3 Protocole d'extraction QuEChERS pour le biote	10
4. CONCLUSION	17
5. BIBLIOGRAPHIE.....	18

Liste des annexes :

ANNEXE I	19
ANNEXE II	22
ANNEXE III	23
ANNEXE IV	28

RAPPORT FINAL SUR L'ETUDE DE FAISABILITE DE L'EXTRACTION ET/OU DE LA PURIFICATION PAR « QUECHERS » POUR L'ANALYSE DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES » (HAP) DANS LE BIOTE

CARINE FALLOT ET JULIE CABILLIC

RESUME

Traditionnellement, les extractions de sédiments ou de biote sont réalisées par solvant pressurisé (PLE), Ultrasons, Soxhlet ou Extraction assistée par micro-ondes. Bien que ces méthodes présentent de nombreux avantages, ce sont des méthodes longues, requérant l'utilisation de plusieurs dizaines de millilitres de solvant organique et nécessitent un coût élevé d'investissement et d'entretien. Par ailleurs, comme ces méthodes ont un fort pouvoir d'extraction, elles permettent aussi bien d'extraire les composés d'intérêts que de des interférents de la matrice.

Afin de simplifier et raccourcir l'étape d'extraction des composés recherchés, la méthode QuEChERS (Quick, easy, cheap, effective rugged and safe) a été développée. C'est une méthode économiquement et « environnementalement » très intéressante (faible investissement et peu de consommation de solvant). De plus, ce procédé d'extraction "doux", est plus spécifique ce qui permet de diminuer le nombre d'interférents extraits et simplifier l'étape de purification. En 2014, cette méthode a été évaluée pour l'extraction des HAP dans les sédiments et a été jugée applicable. En 2015, le but a été d'adapter et vérifier l'applicabilité de cette méthode à la préparation d'échantillons « biote ».

Dans un premier temps, le protocole développé pour les sédiments a été appliqué à des moules. Puis, l'étape de purification a été améliorée en sélectionnant le mode de purification (dSPE ou cartouche SPE) et le type de phase, les plus adaptés à des matrices biote.

Le protocole finalisé fourni en annexe comprend une étape d'extraction QuEChERS à l'acétonitrile suivi d'une purification sur cartouche SPE (de type EZ-POP NP, Sigma Aldrich). L'étude de rendement réalisée sur un MRC de moules lyophilisées permet de montrer que ce protocole est applicable à l'extraction des HAP dans le biote.

Mots clés :

QuEChERS, purification, biote, HAP, GC/MS, analyse

*FINAL REPORT OF THE FEASIBILITY STUDY: « EXTRACTION AND/OR PURIFICATION BY
« QUECHERS » FOR THE ANALYSIS OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS (PAH) IN BIOTA »*

CARINE FALLOT ET JULIE CABILLIC

ABSTRACT

Traditionally, extraction of sediment or biota is performed by pressurized solvent (PLE), Ultrasound, or Soxhlet extraction assisted by microwave. Although these methods have many advantages, they are consuming methods, requiring the use of tens of milliliters of organic solvent and require high cost of investment and maintenance. Moreover, as these methods have a high extraction power, they allow both extraction of the target compounds and the matrix interferences.

QuEChERS (Quick, easy, cheap, effective and safe rugged) was developed with the aim to simplify and shorten the extraction step of the target compounds. This method is economically and environmentally very interesting. In addition, this extraction process "sweet", is more specific that can reduce the number of interfering compounds and simplify the purification step. In 2014, this method was evaluated for the extraction of PAHs in sediments and has been considered applicable. In 2015, the goal was to adapt and test the applicability of this method for biota samples. Initially, the protocol developed for sediment was applied to biota. Secondly, the purification step has been improved by selecting the purification method (SPE cartridge or dSPE) and the type of phase, more suitable for biota matrices.

The finalized protocol provided in the appendix includes a QuEChERS extraction step with acetonitrile followed by purification on SPE cartridge (type EZ-POP NP, Sigma Aldrich). The performance study of a freeze dried mussel CRM can show that this protocol is applicable to the extraction of PAHs in biota.

Key words :

QuEChERS, purification, biota, PAH, GC/MS, analysis

1. GLOSSAIRE

Composés

BaP	Benzo(a)Pyrène
BbF	Benzo(b)Fluoranthène
BghiP	Benzo(ghi)Pérylène
BkF	Benzo(k)Fluoranthène
Fluo	Fluoranthène
IndenoP	Indéno(123-cd)Pyrène
HAP	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

Matériels analytiques, autres

ACN	Acétonitrile
C₁₈	Octadécyl
CRM	Matériau de Référence Certifié (Referenced Certified Material)
CV	Coefficient de Variation
DCM	Dichlorométhane
dSPE	Extraction sur phase solide dispersée (dispersive Solid Phase Extraction)
GC/MS	Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (Gas Chromatography - Mass Spectrometry)
GC/MS/MS	Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse en tandem (Gas Chromatography-tandem Mass Spectrometry)
LC/FLD	Chromatographie liquide couplée à un détecteur par fluorescence (Liquid Chromatography – Fluorescence Detector)
LC/MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (Liquid Chromatography - Mass Spectrometry)
LC/MS/MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry)
Log K_{ow}	Coefficient octanol/eau
MgSO₄	Sulfate de magnésium
NaCl	Chlorure de sodium
Na₂SO₄	Sulfate de sodium
NaOAc	Acétate de sodium
PLE	Extraction par solvant pressurisé (Pressurized Liquid Extraction)
PSA	Amines primaires et secondaires (Primary and Secondary Amines)
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Rugged and Safe
SPE	Extraction sur phase solide (Solid Phase Extraction)

2. INTRODUCTION

La publication de la Directive 2013/39/EU du 28/08/2013 [1] entraîne une diminution des NQE pour certains composés dans l'eau. La NQE pour le fluoranthène dans l'eau passe de 0,1 µg/L à 0,0063 µg/L et celle du benzo(a)pyrène de 0,05 µg/L à 0,00017 µg/L. Ces niveaux de concentrations très faibles posent des problèmes de fiabilité des résultats de mesure car ils sont difficiles à atteindre avec les moyens analytiques actuellement disponibles. Pour surmonter ces difficultés, pour les composés hydrophobes ($\log K_{ow} > 5$), les matrices biotes sont utilisées comme des indicateurs quantitatifs de la contamination chimique car ils sont représentatifs de l'état chronique de contamination du milieu aquatique dans lequel ils vivent. Certaines possèdent la propriété d'accumuler les contaminants hydrophobes présents dans ce milieu jusqu'à atteindre un équilibre avec lui. Ce phénomène de bioaccumulation est à l'origine d'un facteur de concentration entre milieu et organisme pouvant atteindre plusieurs ordres de grandeur. Les dosages dans les organismes sont donc facilités par des concentrations plus élevées. C'est pourquoi la Directive 2013/39/EU du 28/08/2013 [1] introduit de nouvelles NQE dans le biote de 30 et 5 µg/kg de poids humide respectivement pour le fluoranthène et le benzo(a)pyrène.

A ce jour, dans le domaine environnemental, il n'existe aucune norme pour l'extraction des HAP dans les matrices biotes. Traditionnellement, l'extraction de matrices solides est réalisée par solvant pressurisé à chaud (ou pressurized liquid extraction, PLE), ultrasons, extraction assistée par micro-ondes ou Soxhlet. Bien que ces méthodes soient actuellement les plus efficaces pour l'extraction des HAP dans les sédiments, elles présentent quelques inconvénients et en particulier un temps de mise en œuvre long et l'utilisation de plusieurs dizaines voire centaines de millilitres de solvants organiques. Par ailleurs, ces méthodes, ayant un fort pouvoir d'extraction, permettent aussi bien d'extraire les composés d'intérêts que des interférents de la matrice. De plus, certaines méthodes comme la PLE et l'extraction micro-ondes nécessitent un coût élevé d'investissement et d'entretien.

En 2014, le LNE a étudié l'applicabilité d'une nouvelle méthode d'extraction et/ou purification pour l'analyse des HAP dans les sédiments [2] : la méthode QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe), développée en 2003 par Anastassiades et al. [3] pour l'analyse des pesticides dans les fruits et les légumes. L'objectif du développement d'une telle méthode est d'obtenir un protocole de préparation d'échantillon qui soit simple, rapide, peu coûteux et peu consommateur de solvant. Cette technique a par la suite été appliquée avec succès sur d'autres types de matrices (poissons, sols et sédiments) et pour d'autres types de composés (PBDE, COV, PCB, pharmaceutiques, HAP) [4-12]. Des travaux ont d'ailleurs été réalisés dans le cadre d'AQUAREF pour l'extraction des pesticides et des polybromodiphényléthers (PBDEs) des sédiments [13] ainsi que pour des analyses multirésidues (HAP, PCB, PBDE, pesticides et phtalates) dans les sédiments [14].

Les résultats de l'étude menée en 2014 ont montré que la méthode QuEChERS était applicable pour l'extraction des HAP dans les sédiments (excepté pour le

naphtalène). En 2015, le but a été d'adapter et vérifier l'applicabilité de cette méthode à la préparation d'échantillons « biotes » pour l'analyse des HAP.

3. EVALUATION DE LA METHODE QUECHERS POUR L'ANALYSE DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES (HAP) DANS LES BIOTES

3.1 MOLECULES ETUDIEES

Les HAP font partie des molécules identifiées dans l'annexe I, partie A de la directive 2013/39/UE [1] pour lesquelles une analyse de l'évolution à long terme des concentrations est demandée dans les matrices sédiments et biote. En effet, ces composés, de nature hydrophobe, ont tendance à s'accumuler dans les matrices solides. Il est demandé aux Etats Membre d'effectuer, dans un premier temps, un état des lieux de la contamination en HAP dans le biote puis de suivre son évolution dans le temps.

Pour cette étude, les six HAP de la liste des polluants prioritaires de la directive cadre eau [1] possédant une NQE dans le biote ont été étudiés :

		SANDRE	CAS	Nombre de cycle	Masse moléculaire g.mol ⁻¹	Solubilité dans l'eau à 25°C (mg/L)	Log Kow
Fluoranthène	Fluo	1191	206-44-0	4	202,26	0,27	4,9
Benzo(b)fluoranthène	BbF	1116	205-99-2	5	252,31	0,001	6,57
Benzo(k)fluoranthène	BkF	1117	207-08-9	5	252,31	0,0008	6,8
Benzo(a)pyrène	BaP	1115	50-32-8	5	252,31	0,0038	6,06
Benzo(ghi)pérylène	BghiP	1118	191-24-2	6	276,33	0,002	6,5
Indéno(123-cd)pyrène	IndenoP	1204	193-39-5	6	276,33	0,0008	6,58

Tableau 1 : caractéristiques des HAP étudiés

3.2 CONDITIONS ANALYTIQUES ET MATERIELS UTILISES

Toutes les conditions expérimentales (réactifs et étalons, échantillons, matériel, conditions analytiques) sont décrites en annexe I.

Le développement de l'extraction par QuEChERS a été réalisé sur des moules fraîches dopées avec une solution synthétique de HAP ainsi que sur des matériaux de référence de moules lyophilisées. Les concentrations de dopage des essais effectués sur les moules fraîches (aux niveaux des NQE biote de la DCE) sont présentées en annexe II.

La technique d'extraction par solvant pressurisé à chaud (mise en place au laboratoire pour l'analyse des sédiments) est également utilisée pour apporter un point de comparaison (annexe I).

La disponibilité des matériaux de référence de HAP dans les moules est limitée : NIST 1974c « Organics in Mussel Tissue (*Mytilus edulis*) » et NIST 2974a « Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue (*Mytilus edulis*) » [15]. Leur coût est très important et la quantité disponible est faible car les prises d'essais

minimales recommandées sont de l'ordre de 1 à 3g. Dans cette étude, l'évaluation de la justesse de la méthode a été évaluée avec le MRC NIST 2974a constitué de moules lyophilisées (annexe II).

Pour toutes les analyses, la dilution isotopique a été mise en œuvre, à savoir un homologue marqué pour chaque HAP étudié. Les composés deutérés et C13 ont été utilisés comme étalon interne mais aucune différence n'a été observée entre les deux types d'étalons utilisés. Les résultats présentés sont obtenus avec un étalonnage interne par des composés C13.

3.3 PROTOCOLE D'EXTRACTION QUECHERS POUR LE BIOTE

3.3.1 TRANSFERT DU PROTOCOLE D'EXTRACTION QUECHERS DES SEDIMENTS AU BIOTE

En 2014, la méthode d'extraction QuEChERS a été évaluée pour l'analyse des HAP dans les sédiments [30]. Un protocole a été optimisée (fig. 1 et annexe IV) sur un sédiment de référence, NIST 1944 « New York/New Jersey Waterway Sediment ».

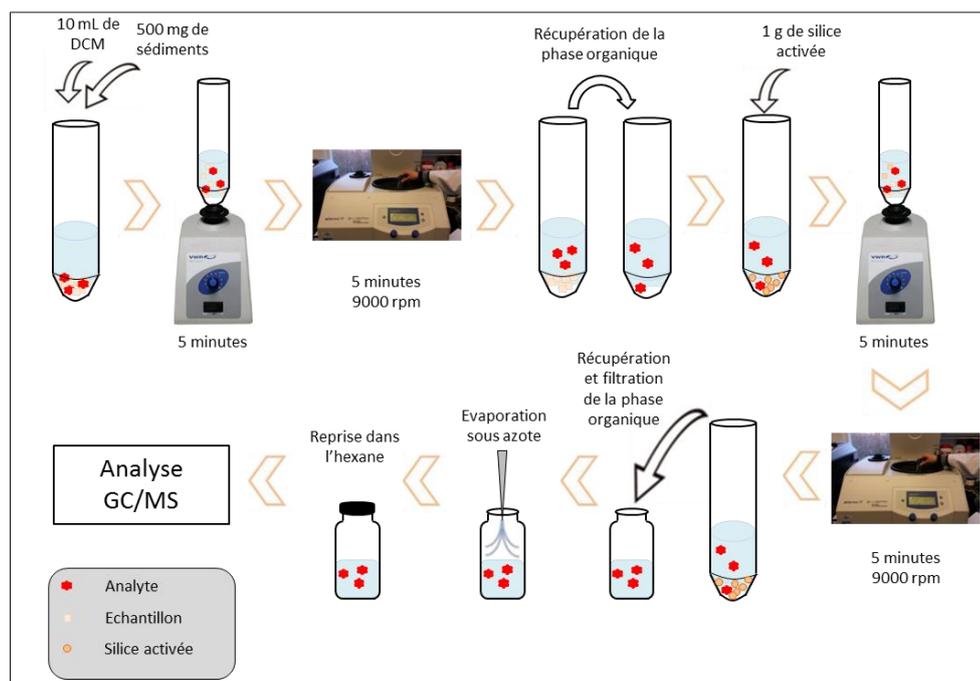


Figure 1 : Protocole d'extraction QuEChERS des HAP dans les sédiments

Les résultats obtenus dans les sédiments (tableau 1) montrent que la méthode est applicable pour les HAP sélectionnés car les rendements ne sont pas statistiquement différents de 100% avec des coefficients de variation de l'ordre de 10%.

	Valeur de référence (µg/g)	Rendement (%) / valeur de référence	Coefficient de variation (%)
Fluoranthène	8,92	98	11
Benzo(b)fluoranthène	3,87	90	7
Benzo(k)fluoranthène	2,3	87	8
Benzo(a)pyrène	4,3	79	8
Indeno(123-cd)pyrène	2,78	100	9
Benzo(ghi)pérylène	2,84	100	8

Tableau 1 : Résultats obtenus pour l'extraction du MRC NIST 1944 (n=3)

En 2015, dans l'action D1c, il a été proposé de transférer cette méthode d'extraction QuEChERS à la matrice biote, afin d'anticiper l'évolution de la surveillance à partir de janvier 2016 suite à la publication de la Directive 2013-39-EU du 28/08/2013. Au moment du lancement de la fiche D, le type de biote à suivre dans le cadre de la Directive Cadre sur l'eau (poisson, gammare, moule...) n'était pas arrêté. Des recommandations avaient été émises au travers du guide de la commission européenne [16]. La moule, étant une matrice relativement complexe du fait de sa forte teneur en lipides, a été choisie afin de se placer dans un cas défavorable avec des problèmes importants d'interférences. Ainsi, les résultats obtenus pour cette matrice seraient valable pour des matrices moins grasses telles que des poissons maigres ou des gammars.

La méthode QuEChERS sédiments (figure 1) a été appliquée à des moules et plus particulièrement un MRC de moules lyophilisées (SRM 2974a). Cependant lors de l'ajout du solvant d'extraction (dichlorométhane), un précipité a été observé entraînant la formation d'une substance visqueuse. La suite de la procédure QuEChERS n'a pas pu être appliquée au matériau. Une optimisation de la méthode pour l'extraction des biotes est donc nécessaire.

Le test a également été réalisé sur des moules fraîches dopées en HAP. Cependant l'extrait final était très sombre (observation d'un précipité) et le chromatogramme obtenu trop interféré pour permettre l'intégration des pics des composés cibles.

L'extraction des moules nécessitent donc une étape de purification plus spécifique que celle appliquée aux sédiments. En effet, cette matrice est plus complexe, notamment par la présence de lipides, et la silice activée utilisée en dSPE n'est pas suffisante pour retenir les impuretés et interférents.

3.3.2 ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

L'extraction QuEChERS des HAP dans le biote tendant à se développer depuis ces dernières années, le tableau 2 résume des exemples d'application de cette méthode sur différents poissons et crustacés. Ces exemples permettent de constater qu'il n'y a pas de variations significatives des pratiques pour l'étape d'extraction. Le solvant le plus utilisé est l'acétonitrile car il permet d'extraire une large gamme de composés en réduisant celle des matières grasses présentes dans les matrices biotes. Les sels d'extraction les plus efficaces sont

le sulfate de magnésium, qui permet une séparation optimale des phases (acétonitrile et eau/biote), associé au chlorure de sodium qui permet de réduire la quantité de matrice co-extraite [27]. Pour toute matrice déshydratée, l'ajout d'eau est recommandé [3] car lors de l'addition des sels MgSO₄ et NaCl il se produit une réaction exothermique qui favorise l'extraction des HAP. Pour les moules non lyophilisées, il n'est pas nécessaire d'ajouter de l'eau ultra pure avant extraction par solvant (acétonitrile).

Echantillons		Extraction		Purification	Analyse	Rendement (%)	Ref.
Type	Prise d'essai (g)	Solvant d'extraction	Sels extraction				
Chinchards	5	8mL ACN	-	-	LC/FLD	SRM 2977 : 63-110% (< 10% pour naphtalène et Acénaphène)	[18]
Crevettes, huîtres, saumon	10	10mL ACN	4 g MgSO ₄ + 1,5 g NaOAc	1mL dans 150mg MgSO ₄ + 50mg PSA + 50mg C18	GC/MS	62-130%	[19]
Tissus de moules	2	15mL ACN (1% acid acetic)	6 g MgSO ₄ + 1,5 g NaOAc	1 g sodium sulfate anhydre + cartouche SPE 1g silice	GC/MS/MS	92-108%	[20]
Huîtres	10	15mL ACN	6g MgSO ₄ + 1,5g NaCl	500µL dans flacon 2mL 50mg PSA + 150 mg MgSO ₄	LC/MS	71-110%	[21]
Palourdes	2	5 mL ACN	2g MgSO ₄ + 0,5g NaCl	50mg PSA + 150 mg MgSO ₄	LC/FLD	90-110%	[22]
Poissons et crevettes	10	10 mL Ethyl Acetate	4g MgSO ₄ + 2g NaCl	Colonnes de silice entre 1 et 5 g	GC/MS	73-120%	[23]
Poissons Chat	10	10mL DCM	4g MgSO ₄ + 1g NaCl	dSPE (50mg Z-Sep (Supelco) + 150mg MgSO ₄)	GC/MS/MS	70-120 %	[24]
Vivaneau	10	10 mL ACN	4g MgSO ₄ + 1g NaCl	dSPE (50mg Z-Sep (Supelco) + 150mg MgSO ₄)	GC/MS/MS	70-120%	[25]
Esturgeon blanc	5	5 mL ACN	2g MgSO ₄ + 0,5g NaCl	150 mg MgSO ₄ + 50 mg PSA + 50mg C18	GC/MS	91-102%	[26]
Fruits de mer	5	10 mL ACN	6g MgSO ₄ + 1,5g NaCl	1200 mg MgSO ₄ + 400 mg PSA + 400mg C18	GC/MS	71-104	[27]
Moules	10	10 mL ACN	4g MgSO ₄ + 1g NaCl	900 mg MgSO ₄ + 150 mg PSA	GC/MS/MS	89-112	[28]
Crevettes	10	10 mL ACN	4g MgSO ₄ + 1g NaCl	150 mg MgSO ₄ + 50 mg PSA	LC/MS/MS	70-120	[29]

Tableau 2 : Exemple d'application de la méthode QuEChERS aux HAP dans la matrice biote

3.3.3 PROTOCOLE D'EXTRACTION QUECHERS DU BIOTE

La méthode retenue pour l'extraction des HAP dans le biote est basée sur les résultats de l'étude bibliographique. Le protocole d'extraction des HAP dans des moules lyophilisées est décrit sur la figure 2. Pour des moules fraîches, l'étape d'ajout d'eau ultra pure n'est pas nécessaire et la prise d'essai est plus importante (de l'ordre de 5 à 10g).

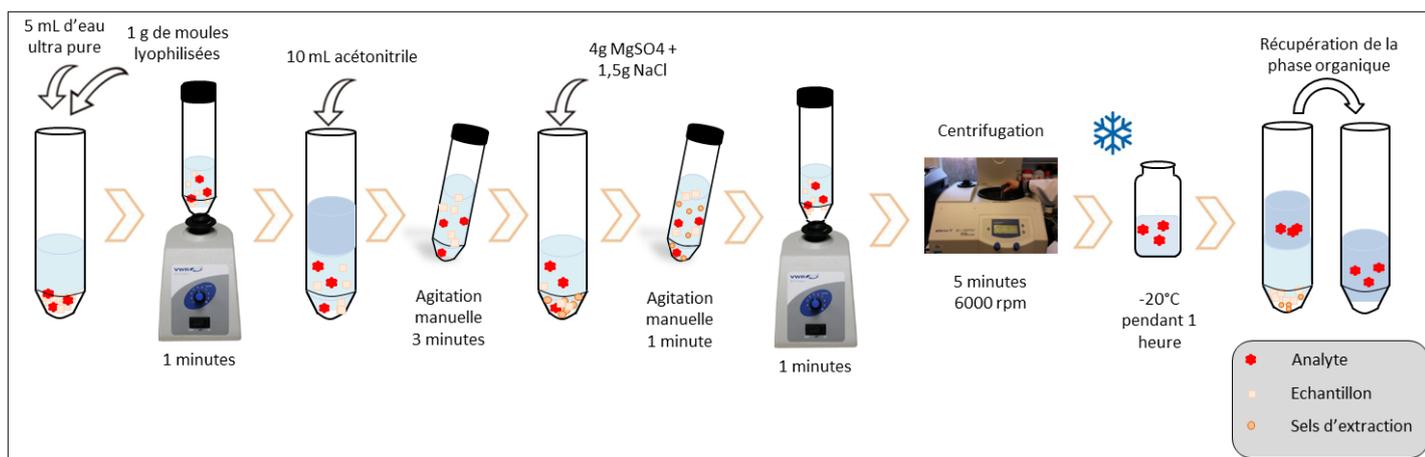


Figure 2 : Protocole d'extraction QuEChERS des HAP dans les moules lyophilisés

3.3.4 OPTIMISATION DE L'ETAPE DE PURIFICATION

L'extrait obtenu à l'issue de l'étape d'extraction est traité par une étape de purification. C'est le point le plus délicat de cette méthode d'extraction QuEChERS. Lors des premiers essais, la purification avec de la silice activée ne s'est pas révélée suffisante. Deux approches, la purification sur phase solide dispersée (dSPE) et la purification sur cartouche SPE, ont été comparées et sont décrites dans la figure 3 :

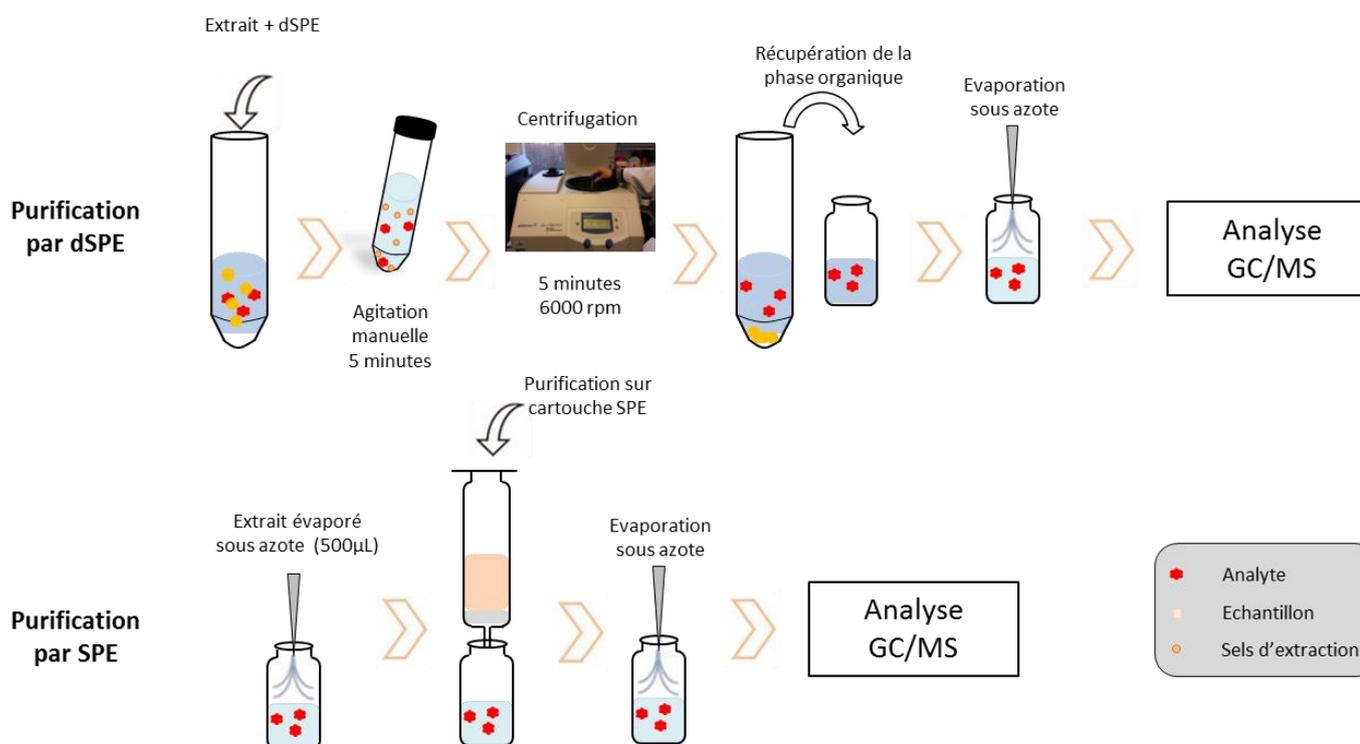


Figure 3 : Protocoles dSPE et SPE de purification des HAP dans les moules

Plusieurs types de phases ont été testés et comparés :

1. Phase composée d'un mélange de $MgSO_4$ (1200mg), de PSA (400mg) et de C18 (400mg) : comparaison en dSPE et cartouche SPE.

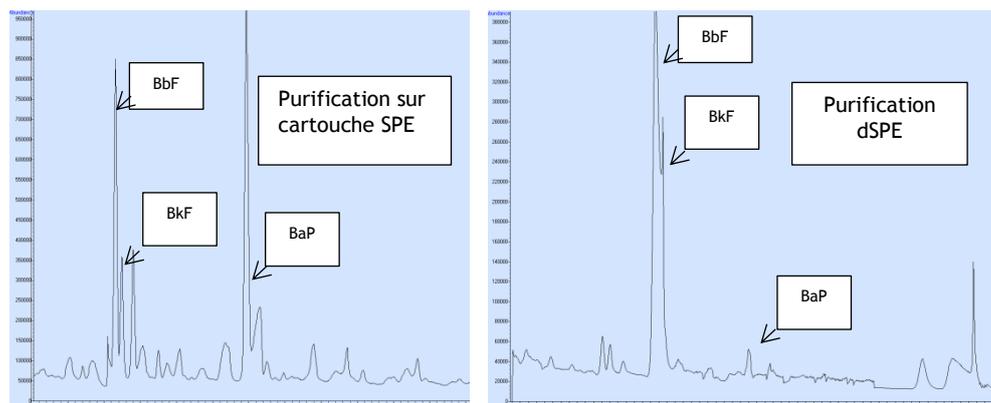


Figure 4 : Comparaison des chromatogrammes du $m/z = 252$ (ions caractéristiques des BbF, BkF et BaP) pour l'extrait de moule fraîches dopées purifié sur cartouche SPE et purifié par dSPE.

La figure 4 présente l'effet de la purification des extraits de moules fraîches dopées sur les benzo(b)-benzo(k) fluoranthène et du benzo(a)pyrène. Elle montre que la phase utilisée n'est pas efficace (que ce soit en dSPE ou en cartouche SPE) puisque les pics des BbF, BkF et BaP ne sont pas intégrables. Les extraits sont toujours très colorés.

2. Phases spécifiques pour la purification de matrice grasses (les phases classiquement utilisées pour l'étape de purification n'ont pas permis d'obtenir des extraits exploitables en analyse GC/MS (PSA, $MgSO_4$, Silice)) : comparaison entre la dSPE et SPE.

- dSPE avec une phase synthétique « Que Z-Sep » (500mg Z-Sep, sigma aldrich) permettant de retenir les graisses et les pigments.

- cartouche SPE « EZ-POP NP » (sigma aldrich) composée de deux phases : le Florisil (1,25 g supelclean LC-Florisil), au-dessus, qui interagit avec les groupements polaires tels que les acides et les alcools, et le Z-Sep/C18 (1,25g), au-dessous, qui retient les matières grasses.

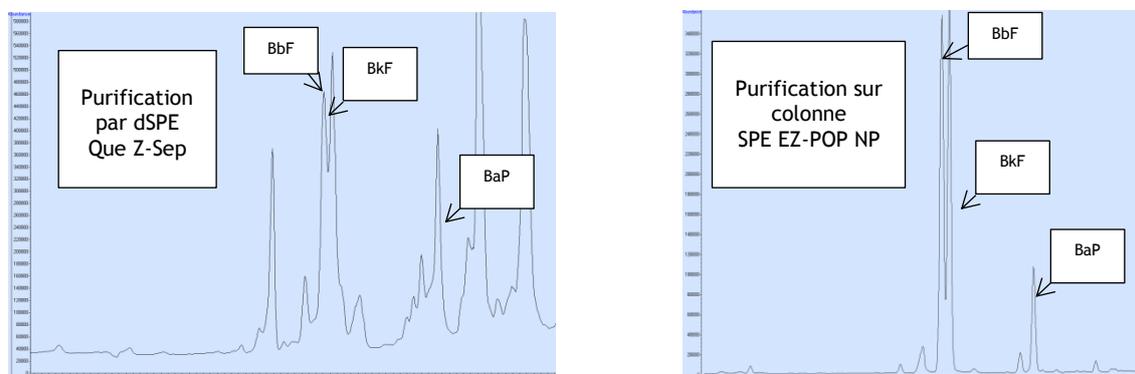


Figure 5 : Comparaison des chromatogrammes du $m/z = 252$ (ions caractéristiques des BbF, BkF et BaP) pour l'extrait purifié sur colonne et l'extrait purifié par dSPE avec la phase Z-Sep.

La figure 5 présente l'effet de la purification des extraits de moules fraîches dopées sur les benzo(b)-benzo(k) fluoranthène et du benzo(a)pyrène. Elle montre que la purification sur cartouche SPE est beaucoup plus efficace que la purification par dSPE. Les pics obtenus pour les BbF, BkF et BaP sont non interférés et peuvent être intégrés. En effet, la purification par dSPE Que Z-Sep n'est pas assez efficace, elle ne permet pas d'éliminer toutes les interférences pour permettre une quantification des HAP dans le biote. De plus, il est à noter que les extraits obtenus avec la purification sur colonne sont beaucoup plus limpides et moins colorés que ceux issus de la purification dSPE.

La méthode d'extraction QuEChERS optimisée et retenue pour la détermination des HAP dans les moules est décrite figure 6.

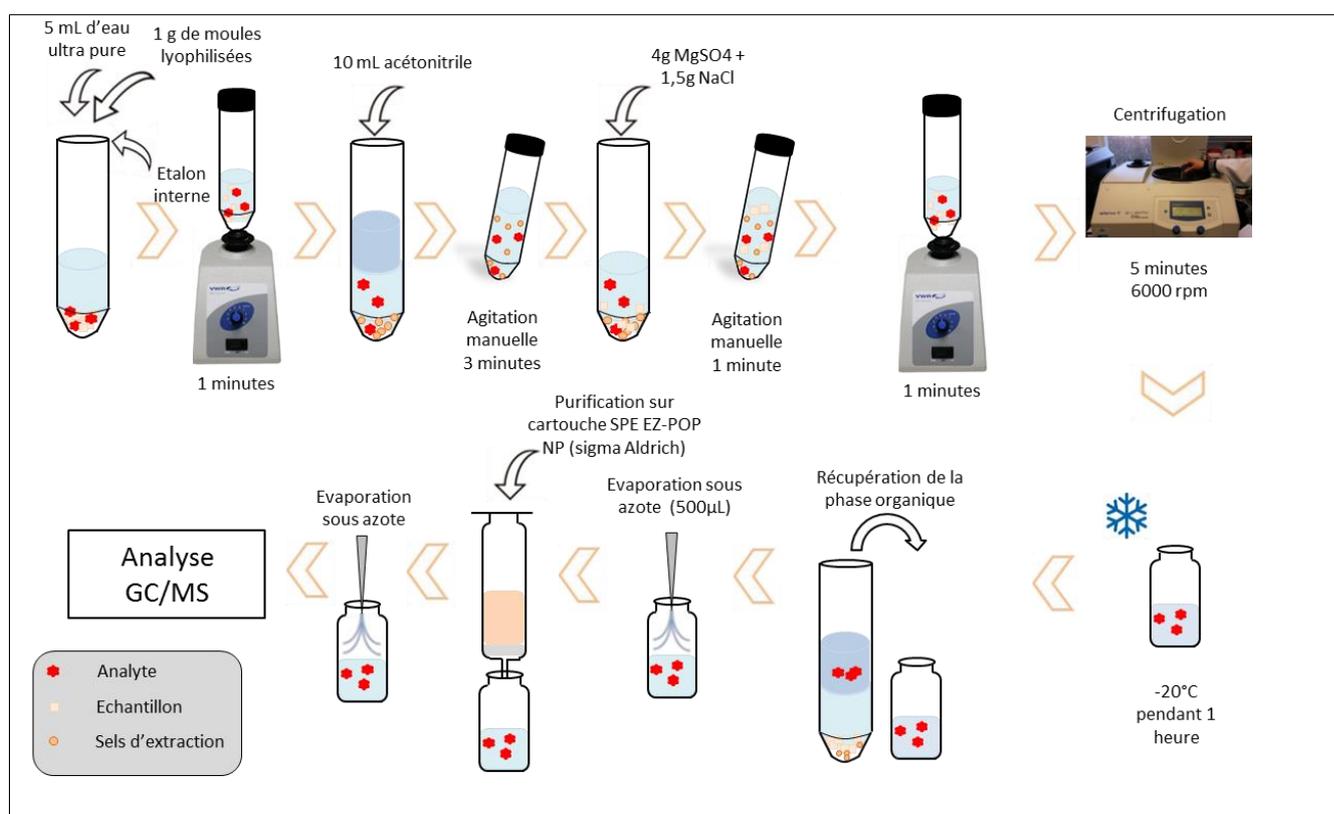


Figure 6 : Protocoles d'extraction et purification des HAP dans les moules lyophilisées

Pour les moules fraîches, l'étape d'ajout d'eau ultra pure n'est pas nécessaire. La prise d'essai recommandée est de l'ordre de 5 à 10 mg.

3.3.5 VERIFICATION DU PROTOCOLE D'EXTRACTION ET DE PURIFICATION

3.3.5.1 Moules fraîches dopées

Les résultats obtenus pour l'extraction d'un échantillon de moules dopées (préparation en annexe I) avec la méthode QuEChERS ont été comparés à ceux obtenus avec la méthode d'extraction PLE (voir annexe I). En effet, cette

méthode est « classiquement » utilisée pour l'extraction des matrices solides. Les rendements ont été déterminés en calculant l'écart relatif entre la valeur de référence du certificat du MRC et la valeur expérimentale. Des blancs méthodes ont été réalisés afin de s'assurer de l'absence de contaminations externes.

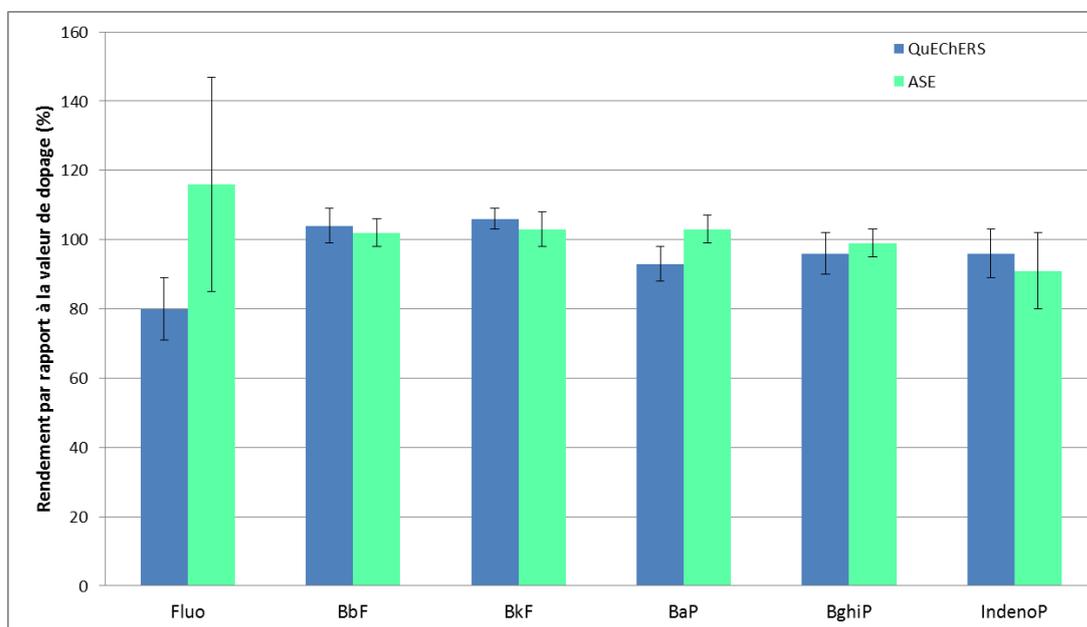


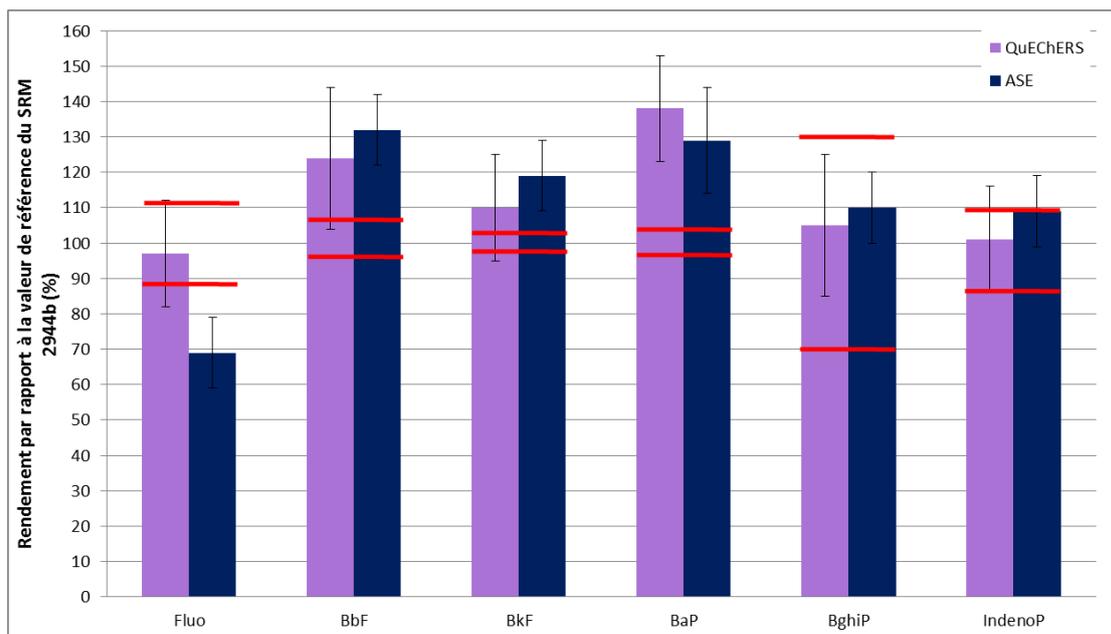
Figure 7 : Comparaison des rendements (%) obtenus avec l'extraction QuEChERS et PLE de moules dopées (n=2)

La figure 7 montre que les résultats obtenus avec l'extraction QuEChERS sur des moules fraîches dopées sont satisfaisants pour la quasi-totalité des composés puisque les rendements sont de l'ordre de 90-110% avec des coefficients de variation de l'ordre de 10%. Les résultats sont comparables à la méthode traditionnelle d'extraction PLE. Le fluoranthène est la seule exception. En effet, même s'il n'y a pas de différence significative entre les deux modes d'extraction, le rendement moyen obtenu avec la méthode QuEChERS est plus faible que pour les autres composés (de l'ordre de 80%) et le rendement obtenu avec la méthode PLE est plus fort (de l'ordre de 115%) avec une dispersion plus élevée que pour les autres composés.

Les niveaux de concentration pour le fluoranthène et le benzo(a)pyrène sont du même ordre de grandeur que les NQE (respectivement 30 et 5 µg/kg). La figure 7 montre que le protocole d'extraction QuEChERS suivi d'une purification sur cartouche SPE pourrait être adapté dans le cadre de la surveillance en respectant les critères de la DCE.

3.3.5.2 Matériau de référence SRM 2974a « moules lyophilisées »

Les résultats obtenus pour l'extraction du matériau de référence SRM 2974a « composés organiques dans des tissus de moules lyophilisés » (annexe II) avec la méthode QuEChERS ont été comparés à ceux obtenus avec la méthode d'extraction PLE (voir annexe I).



— Intervalle de confiance des teneurs certifiées du MRC

Figure 8 : Comparaison de l'extraction QuEChERS et PLE du matériau de référence SRM 2974a (n=2)

La figure 8 permet d'évaluer la justesse de la méthode. Elle montre que pour cinq des six HAP, les résultats obtenus ne sont pas statistiquement différents des valeurs du certificat du MRC pour la méthode QuEChERS. Pour le Benzo(a)pyrène, les valeurs observées sont plus élevées que celles attendues alors que les blancs méthodes ne présentaient aucune trace du composé. Cette observation est valable aussi bien pour la méthode QuEChERS que pour la méthode PLE. Il serait nécessaire de réaliser des essais supplémentaires afin de vérifier si cette surestimation est liée :

- à une différence de comportement entre le Benzo(a)pyrène contenu dans la matrice et son homologue marqué ajouté à la matrice.
- à une sous-estimation des incertitudes et ou de la concentration du MRC NIST 2974a.

Par ailleurs, les résultats obtenus pour le fluoranthène sont corrects avec la méthode QuEChERS mais sont trop faibles pour la méthode PLE. Ce résultat est surprenant dans la mesure où la méthode PLE est reconnue comme une méthode à fort pouvoir d'extraction (solvant chauffé sous pression). Cette valeur peut être due à une volatilisation du composé au cours de l'étape de concentration.

4. CONCLUSION

La méthodologie QuEChERS, appliquée à l'analyse des HAP dans les moules, apparaît comme une bonne alternative aux méthodes utilisées habituellement dans les laboratoires d'échantillons de matrices biotes. D'autant plus, qu'elle permet l'analyse du fluoranthène et du benzo(a)pyrène aux niveaux de concentrations des NQE. La procédure complète est décrite en annexe III. Elle

pourrait être également appliquée à d'autres matrices telles que des poissons maigres ou des gammars présentant moins de difficultés analytiques que les moules, matrice à haute teneur en lipide par exemple.

Cette méthode d'extraction manuelle permet un gain de temps et une réduction des quantités de solvant, tout en étant simple à mettre en œuvre. De plus, les performances du protocole décrit dans ce rapport sont globalement en adéquation avec les méthodes existantes telle que la PLE. Les rendements sont corrects et la dispersion peu importante.

5. BIBLIOGRAPHIE

[1] Directive 2013/39/UE du Parlement européen et du Conseil du 12 août 2013 modifiant les directives 2000/60/CE et 2008/105/CE en ce qui concerne les substances prioritaires pour la politique dans le domaine de l'eau.

[2] J. Cabillic et C. Fallot - rapport d'étape sur l'Etude de faisabilité de l'extraction et/ou de la purification par QuEChERS pour l'analyse des HAP sur sédiments - Rapport AQUAREF 2015 - 20 p.

[3] M. Anastassiades, S. J. Lehotay, D. Stajnbaher, F. J. Schenck, Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce, *Journal of AOAC International* 86 (2003) 412-431.

[4] A. Albinet, S. Thomas, F. Lestremau, A really quick easy cheap effective rugged and safe (QuEChERS) extraction procedure for the analysis of particle-bound PAHs in ambient air and emission samples, *Science of the total env.*, 450-451 (2013) 31-38.

[5] S. H. G. Brondi, A. N. de Macedo, G. H. L. Vicente, A. R. A. Nogueira, Evaluation of the QuEChERS method and gas chromatography-mass spectrometry for the analysis pesticide residues in water and sediment, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 86 (2011) 18-22.

[6] L. Drabova, J. Pulkrabova, K. Kalachova, M. Tomaniova, V. Kocourek, J. Hajslova, Rapid determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in tea using two-dimensional gas chromatography coupled with time of flight mass spectrometry, *Talanta*, 100 (2012) 2017-216.

[7] K. Kalachova, J. Pulkrabova, L. Drabova, T. Cajka, V. Kocourek, J. Hajslova, Simplified and rapid determination of polychlorinated biphenyls, polybrominated diphenyl ethers and polycyclic aromatic hydrocarbons in fish and shrimps integrated into a single method, *analytica chim. Acta*, 707 (2011) 84-91.

[8] M. J. Ramalhosa, P. Paiga, S. Morais, C. Delerue-Matos, M. B. Prior Pinto Oliveira, Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish: evaluation of a quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe extraction method, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 3529-3538.

[9] A. Rashid, S. Nawaz, H. Barker, I. Ahmad, M. Ashraf, Development of a simple extraction and clean up procedure for the determination of

organochloride pesticides in soil using gas chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chrom. A*, 1217 (2010) 2933-2939.

[10] F. Rouvière, A. Buleté, C. Cren-Olivé, C. Arnaudguilhem, Multiresidue analysis of aromatic organochlorines in soil by gas chromatography-mass spectrometry and QuEChERS extraction based on water/dichloromethane partitioning. Comparison with accelerated solvent extraction, *Talanta* 93 (2012) 336-344.

[11] A. Sadowska-Rociek, M. Surma, E. Cieslik, Comparison of different modifications on QuEChERS sample preparation method for PAHs determination in black, green, red and white tea, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21 (2014) 1326-1338.

[12] S.S Cai, J. Stevens, J. A. Syage, Ultra high performance liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry for high-sensitivity analysis of US Environmental Protection Agency sixteen priority pollutants polynuclear aromatic hydrocarbons in oysters, *Journal of Chrom. A* 1227 (2012) 138-144.

[13] J. Beaumont, S. Godin, N. Riem, F. LESTREMAU - Application de la méthodologie Quechers sur l'extraction des pesticides et des polybromodiphényléthers (PBDE) dans les sédiments - Evaluation préliminaire - Rapport AQUAREF 2012 - 69 p.

[14] N. RIEM, J. BEAUMONT, F. LESTREMAU - Evaluation de la méthodologie QuEChERS pour les analyses multirésidus - Rapport AQUAREF 2014 - 77p.

[15] J. Cabillic, G. Labarraque - Inventaire des MRC disponibles pour les substances prioritaires de la DCE - Liste actualisation 2011- Rapport AQUAREF 2011 - 11 p.

[16] M.A. Gonzalez-Curbelo, B. Socas-Rodriguez, A.V. Herrera-Herrera, J. Gonzalez-Salamo, J. Hernandez-Borges, M.A. Rodriguez-Delgado, Evolution and applications of the QuEChERS method, *Tr. Ana. Chem.* 71 (2015) 169-185.

[17] WFD-CIS Guidance document No. 25 on chemical monitoring of sediment and biota under the Water Framework Directive, technical report (2010) http://dx.doi.org/10.2779/43586_041.

[18] M. J. Ramalhosa, P. Paiga, S. Morais, C. Delerue-Matos, M. B. Prior Pinto Oliveira, Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish: evaluation of a quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe extraction method, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 3529-3538.

[19] Note d'application Bruker # CA-274101, Evaluation of rapid extraction and analysis techniques for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in seafood by GC/MS/MS, https://www.bruker.com/fileadmin/user_upload/8-PDF-Docs/Separations_MassSpectrometry/Literature/literature/ApplicationNotes/CA-274101-eBook_24.03.pdf.

[20] Note d'application Agilent, food safety, Determination of Chemical contaminants in marine shellfish using the Agilent 7000 Triple Quadrupole GC/MS system, <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5990-7714EN.pdf>.

[21] S.-S. Caia, J. Stevensb, J. A. Syagea, Ultra high performance liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry for

high-sensitivity analysis of US Environmental Protection Agency sixteen priority pollutant polynuclear aromatic hydrocarbons in oysters, *Journ. of chrom. A*, 1227 (2012) 138-144.

[22] M. Yoo, S. Lee, S. Kim, S.-J. Kim, H.-Y. Seo, D. Shin, A comparative study of the analytical methods for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in seafood by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *Int. Journ. of Food Sc. and Techn.*, 49 (2014) 1480-1489.

[23] K. Kalachova, J. Pulkrabova, L. Drabova, T. Cajka, V. Kocourek, J. Hajslova, Simplified and rapid determination of polychlorinated biphenyls, polybrominated diphenyl ethers, and polycyclic aromatic hydrocarbons in fish and shrimps integrated into a single method, *Anal. Chem. Acta*, 707 (2011) 84- 91.

[24] Y. Sapozhnikova, S. J. Lehotay, Multi-class, multi-residue analysis of pesticides, polychlorinated biphenyls, polycyclic aromatic hydrocarbons, polybrominated diphenyl ethers and novel flame retardants in fish using fast, low-pressure gas chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Chem. Acta*, 758(2013) 80-92.

[25] C. Baduel, J. F. Muellera, H. Tsaib, M. J. Gomez Ramosa, Development of sample extraction and clean-up strategies for target and non-target analysis of environmental contaminants in biological matrices, *Journ. of Chrom. A*, 1426 (2015) 33-47

[26] S. A. Morrison, K. K. Sieve, R. E. Ratajczak, R. B. Bringolf, J. B. Belden, Simultaneous extraction and clean-up of high-lipid organs from white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) for multiple legacy and emerging organic contaminants using QuEChERS sample preparation, *Talanta*, 146 (2012) 16-22.

[27] T.H. Kao, S. Chen, C.W. Huang, C.J. Chen, B.H. Chen, Occurrence and exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in kindling-free-charcoal grilled meat products in Taiwan, *Food Chem. Toxicol.* 71 (2014) 149-158.

[28] T.V. Madureira, S. Velhote, C. Santos, C. Cruzeiro, E. Rocha, M.J. Rocha, A step forward using QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) based extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry - levels of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in wild and commercial mussels, *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 21 (2014) 6089-6098.

[29] M. Smoker, K. Tran, R.E. Smith, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in shrimp, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 12101-12104.

[30] J. Cabillic et C. Fallo - rapport d'étape sur l'Etude de faisabilité de l'extraction et/ou de la purification par QuEChERS pour l'analyse des HAP sur sédiments - Rapport AQUAREF 2015 - 20 p.

ANNEXE I

Réactifs et standards:

Les solvants utilisés : dichlorométhane, acétone et hexane de qualité HPLC de chez Sigma-Aldrich, acétonitrile de qualité HPLC de chez Merck et toluène de qualité HPLC de chez Baker, et, sont de qualité HPLC.

La silice activée 3 heures à 450 °C provient de chez Merck.

Les HAP (naphtalène, anthracène, fluoranthène, benzi(b)fluoranthène, benzo(k)fluoranthène, benzo(a)pyrène, indeno(1,2,3-cd)pyrène et benzo(ghi)pérylène) sont des composés en poudre de chez Cluzeau Info Labo de pureté >99%.

Les HAP marqués (naphtalène ¹³C6, anthracène ¹³C6, fluoranthène ¹³C6, benzo(b)fluoranthène ¹³C6, benzo(k)fluoranthène ¹³C6, benzo(a)pyrène ¹³C4, indeno(1,2,3-cd)pyrène ¹³C6 et benzo(ghi)pérylène ¹³C12) sont des solutions indépendantes à 100µg/mL dans le nonane obtenue chez LGC standard.

Echantillons :

Les extraits et les solutions étalons sont préparés dans des flacons en verre ambré afin de les protéger des UV. Ils sont stockés au réfrigérateur (+4 °C).

Préparation des moules fraîches :

Certaines analyses menées au cours de cette étude ont été réalisées sur des moules fraîches dopées. Les moules ont été décortiquées et broyées au mixeur. Pour chaque essai, 5g d'échantillons humides ont été prélevés puis dopés avec 1mL d'une solution contenant les HAP étudiés dans l'acétonitrile, à des niveaux de concentration proches de ceux du MRC 2974a (Annexe II).

Pour favoriser l'imprégnation et l'homogénéisation des HAP dans la moule, le mélange a été agité puis laisser 30 minutes avant extraction.

Des blancs de ces moules fraîches ont été réalisées et pris en compte dans le calcul des rendements.

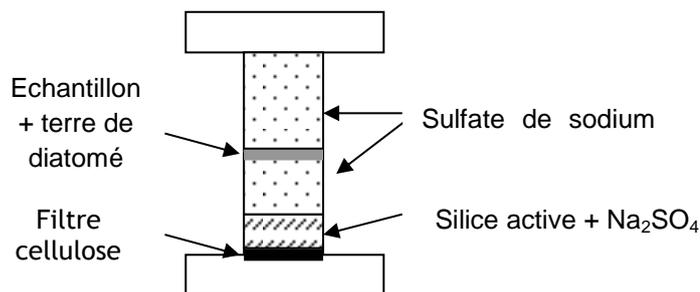
SRM 2974a « Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue (Mytilus edulis) »

Pour chaque test la prise d'essai a été de 1g d'échantillon.

Extraction par PLE :

Les extractions ont été réalisées sur un système ASE 200 (Dionex) couplé à un contrôleur de solvant. L'échantillon est mélangé à de la terre de diatomé avant

son introduction dans la cellule. La cellule est remplie comme indiquée sur le schéma ci-dessous :



L'extraction est réalisée en suivant le programme suivant :

Solvant	Dichlorométhane
Température	100°C
Pression	140 bar
Temps static	10 minutes
Temps de chauffage	5 minutes
Flush	70%
Temps de purge	100 secondes
Nombre de cycle	2

Une première purification est réalisée directement dans la cellule avec la silice activée.

Une deuxième purification de l'extrait est réalisée sur cartouche SPE EZ-POP NP (sigma aldrich) de la même manière que pour l'extraction QuEChERS (voir annexe III pour protocole).

Analyse par GC/MS :

Les extraits ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse (Agilent 7890B) couplée à la spectrométrie de masse (Agilent 5977A). La colonne utilisée est une colonne DB-EUPAH de chez Agilent, 60m x 0,25 mm ID x 0,25 µm film.

Conditions GC:

- *Gas* : Helium
- *Injection*: 5µL en mode solvant vent (100 ml/min jusqu'à 1 min), à 280°C
- *Débit gaz vecteur*: 1 mL/min d'hélium
- *Température du four* : 60°C pendant 2,2 min, 45°C/min jusqu'à 200°C, 15°C/min jusqu'à 250°C et 30°C/min jusqu'à 320°C (pendant 26,5 min)
- *Température injecteur* : 60°C pendant 1 min, 200°C/min jusqu'à 300°C

Conditions MS :

- Température de la ligne de transfert: 300°C
- Température de la source: 230°C

- Température du quadripôle : 150 °C
- Mode EI (70eV).

	m / z lon de quantification	m / z lon de qualification
Fluoranthène 13C6	208	206
Fluoranthène	202	200
Benzo(b)fluoranthène 13C6	258	129
Benzo(b)fluoranthène	252	250
Benzo(k)fluoranthène 13C6	258	129
Benzo(k)fluoranthène	252	250
Benzo(a)pyrène 13C4	256	128
Benzo(a)pyrène	252	250
Indéno(1,2,3-cd)pyrène 13C6	282	141
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	276	138
Benzo(ghi)pérylène 13C12	288	143
Benzo(ghi)pérylène	276	138

Masses sélectionnées pour chaque composé

ANNEXE II

SRM NIST 2974a "Organics in Freeze-Dried Mussel Tissue (Mytilus edulis)"

	Fraction massique (µg/kg) (masse sèche)		U (k=2) (%)
	Concentration	U (k=2)	
Fluoranthène	287	34	11,8
Benzo(b)fluoranthène	41,5	2,6	6,3
Benzo(k)fluoranthène	18,95	0,54	2,8
Benzo(a)pyrène	9,73	0,43	4,4
Indéno(123-cd)pyrène*	14,9	4,5	30,2
Benzo(ghi)pérylène	23,7	2,2	9,3

* valeur de référence

Valeurs de dopage des moules (masse humide)

	Valeur de dopage (ng/g)
Fluoranthène	30,15
Benzo(b)fluoranthène	30,02
Benzo(k)fluoranthène	30,17
Benzo(a)pyrène	9,86
Indéno(123-cd)pyrène	10,02
Benzo(ghi)pérylène	18,97

ANNEXE III

PROCEDURE POUR LA DETERMINATION DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES DANS LE BIOTE

Extraction QuEChERS suivi de la Dilution Isotopique / Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse

1. OBJET

Cette procédure a pour objet de décrire le principe de dosage des Hydrocarbures aromatiques Polycycliques (HAP) dans le biote, par extraction QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Rugged and Safe) suivie d'une analyse par Dilution Isotopique / Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (DI/CG-SM).

2. DOMAINE D'APPLICATION

Cette méthode est applicable à la matrice biote pour la liste des HAP du tableau suivant :

		SANDRE	CAS	Nombre de cycle	Masse moléculaire g.mol ⁻¹	Solubilité dans l'eau à 25°C (mg/L)	Log Kow
Fluoranthène	Fluo	1191	206-44-0	4	202,26	0,27	4,9
Benzo(b)fluoranthène	BbF	1116	205-99-2	5	252,31	0,001	6,57
Benzo(k)fluoranthène	BkF	1117	207-08-9	5	252,31	0,0008	6,8
Benzo(a)pyrène	BaP	1115	50-32-8	5	252,31	0,0038	6,06
Benzo(ghi)pérylène	BghiP	1118	191-24-2	6	276,33	0,002	6,5
Indéno(123-cd)pyrène	IndenoP	1204	193-39-5	6	276,33	0,0008	6,58

3. PRODUITS ET MATERIELS REQUIS

3.1 PRODUITS CHIMIQUES

- Composés HAP en poudre,
- Composés HAP marqués,
- Acétonitrile (pureté min 99%, qualité RP Normapur par exemple),
- Sulfate de magnésium (MgSO₄),
- Chlorure de sodium (NaCl),
- Eau Ultra pure.

3.2 APPAREILLAGE

- Pour la préparation des solutions :
- Balance de portée 200 g et de résolution 0,001g,
- Balance de portée 20 g et de résolution 0,01g,

- Tube à centrifuger en PE de 50mL,
- Flacons ambrés de 16mL,
- Vortex,
- Centrifugeuse.

➤ Pour l'extraction de l'échantillon :

Cartouche Supelclean EZ-POP NP en PE de 12mL de sigma aldrich contenant un adsorbant constitué de 1,25g de Supelclean LC-Florisil puis de 1,25g de Z-SEP/C18 (Supelclean EZ-POP NP).

➤ Pour l'analyse :

Chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse (GC/MS).
Colonne chromatographique : *phase* : phase de type DB-EUPAH de chez Agilent, *épaisseur de phase* : 0,25 μm , *diamètre interne* : 0,25 mm, *longueur* : 60 m.

4. SOLUTIONS DE REFERENCE ET ETALONS INTERNES

4.1 PREPARATION DES SOLUTIONS ETALONS ET ETALONS INTERNES

Une solution individuelle à une concentration d'environ 200 $\mu\text{g/g}$ est préparée pour chaque HAP (SI_{HAP}), par dissolution de composé pur dans environ 20 mL d'acétonitrile. Une solution fille (SM_{HAP}), utilisée pour la préparation des étalons, est obtenue par dilution des six solutions individuelles SI_{HAP} .

Parallèlement, une solution fille contenant les composés marqués ($SM_{\text{marquée}}$) est réalisée dans l'acétonitrile.

Toutes ces solutions sont stockées à $4 \pm 3^\circ\text{C}$ et à l'abri de la lumière dans des flacons ambrés.

4.2 ESTIMATION DE LA FRACTION MASSIQUE

Une estimation (E_{HAP}) de la fraction massique dans l'échantillon est réalisée soit par étalonnage externe, soit par étalonnage interne.

Il est nécessaire de contrôler les blancs pour s'affranchir d'une éventuelle pollution.

4.3 PREPARATION DE L'ÉCHANTILLON ET DES ETALONS

- Au minimum cinq solutions étalons sont préparées de manière à encadrer la valeur E_{HAP} sur une gamme serrée de fractions massiques. Ces solutions étalons sont composées d'une quantité variable de SM_{HAP} et d'une quantité fixe de $SM_{\text{marqué}}$.
- Parallèlement, avant extraction QuEChERS, une quantité de $SM_{\text{marquée}}$ est ajoutée à une masse connue d'échantillon de telle sorte que le rapport R_{aires} soit compris dans le domaine d'étalonnage.
- Un blanc est préparé de la même manière qu'un échantillon et suit le même processus d'extraction et d'analyse pour chaque séquence.

5 PROCEDURE D'EXTRACTION QUECHERS

5.1 EXTRACTION

- Si l'échantillon est lyophilisé, ajouter 5 mL d'eau Ultrapure et agiter 1 minute au vortex.
- Pour extraire les HAP, ajouter 10mL d'acétonitrile dans le flacon et agiter manuellement pendant 3 minutes.
- Ajouter les sels d'extraction (4g de $MgSO_4$ + 1,5g de NaCl) afin de faciliter les transferts des HAP vers l'acétonitrile.
- Agiter manuellement pendant 1 minute puis au vortex pendant 1 minute.
- Centrifuger l'échantillon pendant 5 minutes à 6000rpm.
- Placer le flacon 1 heure au congélateur (-20°C) pour figer l'eau et faciliter la récupération de l'extrait.
- Récupérer la phase organique.
- Evaporer l'extrait sous flux d'azote jusqu'à un volume de 500 μ L.

5.2 PURIFICATION

- Conditionnement de la cartouche : 10mL d'acétone
- Déposer l'extrait en tête de la cartouche SPE « EZ-POP NP » (rincer au solvant le flacon dans lequel se trouvait l'extrait et ajouter le solvant de rinçage en tête de colonne).
- Eluer les HAP avec 15mL d'acétonitrile.
- Evaporer sous azote d'extrait jusqu'à environ 100 μ L.
- Injecter l'extrait sur le GC/MS.

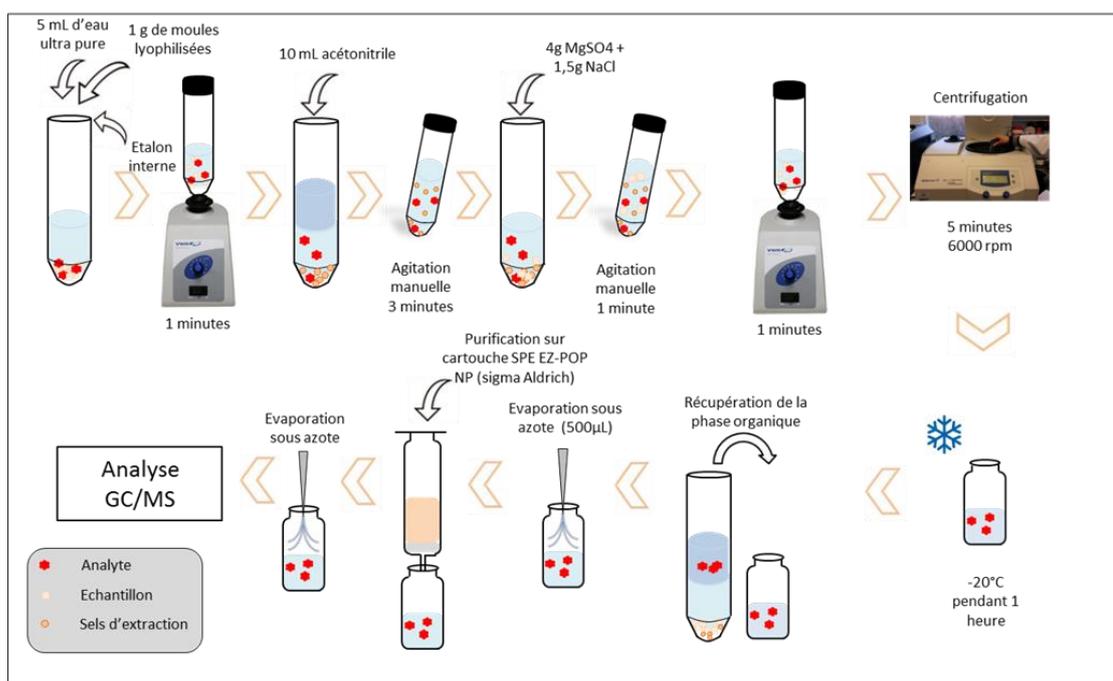


Schéma récapitulatif des différentes étapes de l'analyse des HAP dans le biote

6 CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES ET DU SPECTROMETRE DE MASSE

6.1. CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES

Passeur automatique :

- Seringue de 5 µL,
- Volume d'injection : 5 µL,
- Vitesse d'injection : normale,
- Pompage de l'échantillon : 3,
- Délai de viscosité : 4,
- Flacon de rinçage/poubelle : 1,
- Rinçage solvant avant injection : 2,
- Rinçage échantillon avant injection : 2,
- Rinçage solvant après injection : 4.

Paramètres injection en mode « solvant vent »:

- Température :
60 °C pendant 1 minute
200 °C/minute jusqu'à 300 °C maintenu jusqu'à la fin de l'analyse
- Liner dimpled (PTV).

Paramètres du four avec colonne :

- Température :
60 °C pendant 2,2 min
45 °C / minute jusqu'à 200 °C
15 °C / minute jusqu'à 250 °C
30 °C / minute jusqu'à 320 °C pendant 26,5 minutes
- Gaz vecteur : Hélium
- Débit gaz vecteur : 1 mL/min

- Température ligne de transfert : 300 °C,
- Température source : 230 °C,
- Température du quadripôle : 150 °C.

6.2. Conditions du spectromètre de masse

Méthode Sir :

- Délai entre chaque masse : 0,02 s,
- Temps passé sur chaque masse est variable selon le composé étudié et pourra être réajusté en fonction de la largeur du pic et du nombre de masses étudiées par SIR. Un minimum de 15 points par pic est nécessaire.
- Les temps de départ et de fin de chaque fonction SIR sont variables selon le composé étudié et pourront être réajustés en fonction des temps de rétention des composés (variables selon l'état de la colonne) et du nombre de composés étudiés.
- Les fragments des HAP marqués et non marqués ont été choisis de telle sorte que l'on ne retrouve pas de fragments de HAP marqué dans la fragmentation du HAP non marqué et vice et versa.
Les masses sélectionnées pour chaque composé sont donnés dans le tableau ci-après :

Composés	HAP		HAP ¹³ C	
	ions dosage	ions confirmation	ions dosage	ions confirmation
Fluoranthène et Fluoranthène ¹³ C	202	200	208	206
Benzo(b)fluoranthène et Benzo(b)fluoranthène ¹³ C	252	250	258	129
Benzo(k)fluoranthène et Benzo(k)fluoranthène ¹³ C	252	250	258	129
Benzo(a)pyrène et Benzo(a)pyrène ¹³ C	252	250	256	128
Indeno(1,2,3-cd)pyrène et Indéno(1,2,3-cd)pyrène ¹³ C	276	137	282	141
Benzo(ghi)perylène et Benzo(ghi)perylène ¹³ C	276	138	288	143

ANNEXE IV

PROCEDURE POUR LA DETERMINATION DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES DANS LES SEDIMENTS

Extraction QuEChERS suivi de la Dilution Isotopique / Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse

1. OBJET

Cette procédure a pour objet de décrire le principe de dosage des Hydrocarbures aromatiques Polycycliques (HAP) dans les sédiments, par extraction QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Rugged and Safe) suivie d'une analyse par Dilution Isotopique / Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse (DI/CG-SM).

2. DOMAINE D'APPLICATION

Cette méthode est applicable à la matrice sédiments pour la liste des HAP du tableau suivant :

		SANDRE	CAS	Nombre de cycle	Masse moléculaire g.mol ⁻¹	Solubilité dans l'eau à 25°C (mg/L)	Log Kow
Naphtalène	Naph	1517	91-20-3	2	128,16	32	3,3
Anthracène	Anth	1458	120-12-7	3	178,23	0,07	4,45
Fluoranthène	Fluo	1191	206-44-0	4	202,26	0,27	4,9
Benzo(b)fluoranthène	BbF	1116	205-99-2	5	252,31	0,001	6,57
Benzo(k)fluoranthène	BkF	1117	207-08-9	5	252,31	0,0008	6,8
Benzo(a)pyrène	BaP	1115	50-32-8	5	252,31	0,0038	6,06
Benzo(ghi)pérylène	BghiP	1118	191-24-2	6	276,33	0,002	6,5
Indéno(123-cd)pyrène	IndenoP	1204	193-39-5	6	276,33	0,0008	6,58

3. PRODUITS ET MATERIELS REQUIS

3.1 PRODUITS CHIMIQUES

- Composés HAP en poudre,
- Composés HAP marqués,
- Dichlorométhane (pureté min 99%, qualité RP Normapur par exemple),
- Silice (activée pendant 3heures à 450°C)

3.2 APPAREILLAGE

➤ Pour la préparation des solutions :
Balance de portée 200 g et de résolution 0,001g,
Balance de portée 20 g et de résolution 0,01g.

➤ Pour l'extraction de l'échantillon :
Tube à centrifuger en PE de 50mL,
Flacons ambrés de 16mL,
Vortex,
Centrifugeuse.

➤ Pour l'analyse :
Chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse (GC/MS).
Colonne chromatographique : *phase* : phase de type DB-EUPAH de chez Agilent,
épaisseur de phase : 0,25 μm , *diamètre interne* : 0,25 mm, *longueur* : 60 m.

4. SOLUTIONS DE REFERENCE ET ETALONS INTERNES

4.1 PREPARATION DES SOLUTIONS ETALONS ET ETALONS INTERNES

Une solution individuelle à une concentration d'environ 200 $\mu\text{g/g}$ est préparée pour chaque HAP (SI_{HAP}), par dissolution de composé pur dans environ 20 mL d'acétonitrile. Une solution fille (SM_{HAP}), utilisée pour la préparation des étalons, est obtenue par dilution des six solutions individuelles SI_{HAP} . Parallèlement, une solution fille contenant les composés marqués ($SM_{\text{marquée}}$) est réalisée dans l'acétonitrile.

Toutes ces solutions sont stockées à $4 \pm 3^\circ\text{C}$ et à l'abri de la lumière dans des flacons ambrés.

4.2 ESTIMATION DE LA FRACTION MASSIQUE

Une estimation (E_{HAP}) de la fraction massique dans l'échantillon est réalisée soit par étalonnage externe, soit par étalonnage interne. Il est nécessaire de contrôler les blancs pour s'affranchir d'une éventuelle pollution.

4.3 PREPARATION DE L'ECHANTILLON ET DES ETALONS

- Au minimum cinq solutions étalons sont préparées de manière à encadrer la valeur E_{HAP} sur une gamme serrée de fractions massiques. Ces solutions étalons sont composées d'une quantité variable de SM_{HAP} et d'une quantité fixe de $SM_{\text{marqué}}$.
- Parallèlement, avant extraction QuEChERS, une quantité de $SM_{\text{marquée}}$ est ajoutée à une masse connue d'échantillon de telle sorte que le rapport R_{aires} soit compris dans le domaine d'étalonnage.

- Un blanc est préparé de la même manière qu'un échantillon et suit le même processus d'extraction et d'analyse pour chaque séquence.

5 PROCEDURE D'EXTRACTION QUECHERS

5.1 EXTRACTION

- Pour extraire les HAP, ajouter 10mL de dichlorométhane dans le flacon et agiter au vortex pendant 5 minutes.
- Centrifuger l'échantillon pendant 5 minutes à 9000rpm.
- Récupérer la phase organique.

5.2 PURIFICATION

- Ajouter 1g de silice activée pour purifier l'extrait.
- Agiter au vortex pendant 5 minutes.
- Centrifuger pendant 5 minutes à 9000 rpm.
- Récupérer et filtration de la phase organique.
- Evaporer sous azote d'extrait.
- Injecter l'extrait sur le GC/MS.

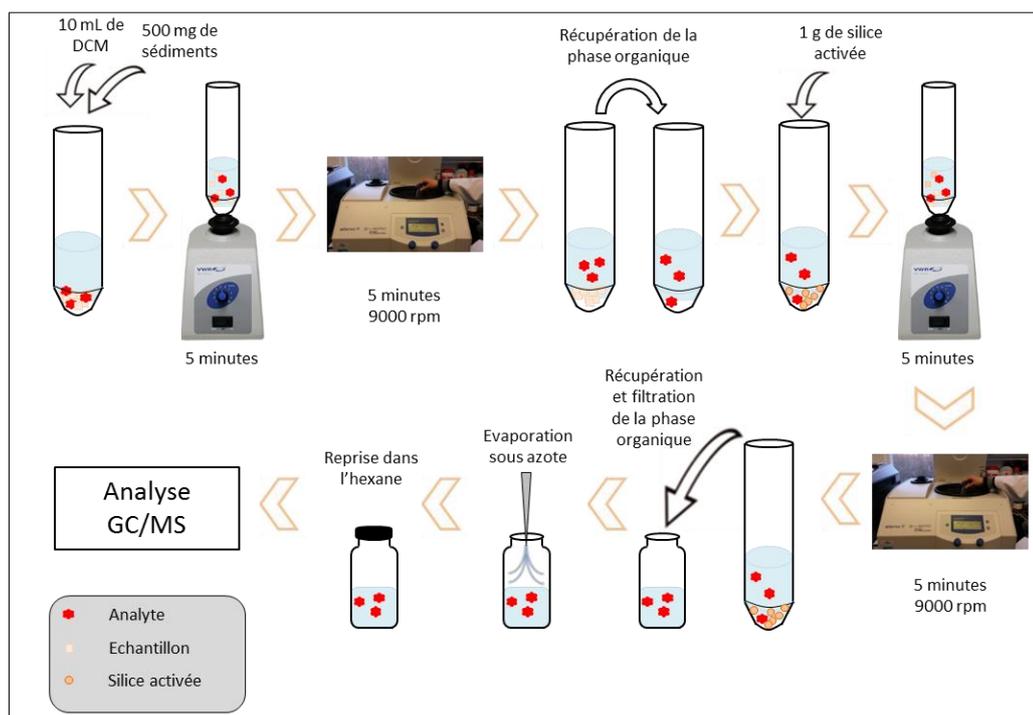


Schéma récapitulatif des différentes étapes de l'analyse des HAP dans les sédiments

6 CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES ET DU SPECTROMETRE DE MASSE

6.1. CONDITIONS CHROMATOGRAPHIQUES

Passeur automatique :

- Seringue de 5 μ L,
- Volume d'injection : 5 μ L,
- Vitesse d'injection : normale,
- Pompage de l'échantillon : 3,
- Délai de viscosité : 4,
- Flacon de rinçage/poubelle : 1,
- Rinçage solvant avant injection : 2,
- Rinçage échantillon avant injection : 2,
- Rinçage solvant après injection : 4.

Paramètres injection en mode « solvant vent »:

- Température :
60 °C pendant 1 minute,
200 °C/minute jusqu'à 300 °C maintenu jusqu'à la fin de l'analyse.
- Liner dimpled (PTV).

Paramètres du four avec colonne :

- Température :
60 °C pendant 2,2 min,
45 °C / minute jusqu'à 200 °C,
15 °C / minute jusqu'à 250 °C,
30 °C / minute jusqu'à 320 °C pendant 26,5 minutes,
- Gaz vecteur : Hélium,
- Débit gaz vecteur : 1 mL/min.

Température ligne de transfert : 300 °C,
Température source : 230 °C,
Température du quadripôle : 150 °C.

6.2. CONDITIONS DU SPECTROMETRE DE MASSE

Méthode Sir :

- Délai entre chaque masse : 0,02 s,
- Temps passé sur chaque masse est variable selon le composé étudié et pourra être réajusté en fonction de la largeur du pic et du nombre de masses étudiées par SIR. Un minimum de 15 points par pic est nécessaire.
- Les temps de départ et de fin de chaque fonction SIR sont variables selon le composé étudié et pourront être réajustés en fonction des temps de rétention des composés (variables selon l'état de la colonne) et du nombre de composés étudiés.
- Les fragments des HAP marqués et non marqués ont été choisis de telle sorte que l'on ne retrouve pas de fragments de HAP marqué dans la fragmentation du HAP non marqué et vice et versa.

Les masses sélectionnées pour chaque composé sont donnés dans le tableau ci-après :

Composés	HAP		HAP ¹³ C	
	lons dosage	lons confirmation	lons dosage	lons confirmation
Naphtalène et Naphtalène ¹³ C	128	129	134	135
Anthracène et Anthracène ¹³ C	178	176	184	182
Fluoranthène et Fluoranthène ¹³ C	202	200	208	206
Benzo(b)fluoranthène et Benzo(b)fluoranthène ¹³ C	252	250	258	129
Benzo(k)fluoranthène et Benzo(k)fluoranthène ¹³ C	252	250	258	129
Benzo(a)pyrène et Benzo(a)pyrène ¹³ C	252	250	256	128
Indeno(1,2,3-cd)pyrène et Indéno(1,2,3-cd)pyrène ¹³ C	276	137	282	141
Benzo(ghi)perylène et Benzo(ghi)perylène ¹³ C	276	138	288	143