

# HAP dans le biote

## Influence de la prise d'essai sur le résultat d'analyse

J. Cabillic, C. Fallot

Janvier 2017

Document final

## Contexte de programmation et de réalisation

---

Ce rapport a été réalisé dans le cadre du programme scientifique et technique AQUAREF pour l'année 2017, au titre de l'action D « Amélioration des opérations d'analyse physico-chimiques ».

Auteurs :

*Julie Cabillic*  
LNE  
[julie.cabillic@lne.fr](mailto:julie.cabillic@lne.fr)

*Carine Fallot*  
LNE  
[carine.fallot@lne.fr](mailto:carine.fallot@lne.fr)

Approbateur :

*Sophie Vaslin-Reimann*  
[sophie.vaslin-reimann@lne.fr](mailto:sophie.vaslin-reimann@lne.fr)

---

Vérification du document :

*François LESTREMAU*  
INERIS  
[francois.lestremau@ineris.fr](mailto:francois.lestremau@ineris.fr)

## Les correspondants

---

AFB : Pierre-François Staub, [pierre-francois.staub@afbiodiversite.fr](mailto:pierre-francois.staub@afbiodiversite.fr)

LNE : Sophie Vaslin-Reimann, [sophie.vaslin-reimann@lne.fr](mailto:sophie.vaslin-reimann@lne.fr)

Référence du document : J. Cabillic, C. Fallot - HAP dans le biote - Influence de la prise d'essai sur le résultat d'analyse - Rapport AQUAREF 2017 - 19 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

---

<b>1. GLOSSAIRE</b> .....	<b>7</b>
<b>2. INTRODUCTION</b> .....	<b>7</b>
<b>3. EVALUATION DE L'INFLUENCE DE LA PRISE D'ESSAI SUR L'ANALYSE DES HAP DANS DES MATRICES BIOLOGIQUES</b> .....	<b>9</b>
3.1 Conditions analytiques .....	9
3.2 Echantillons.....	9
3.3 Blancs.....	10
<b>4. RÉSULTATS</b> .....	<b>11</b>
4.1 Crevettes grises .....	11
4.2 Gammars.....	13
<b>5. CONCLUSION</b> .....	<b>14</b>

Liste des annexes :

---

ANNEXE I : Description des méthodes analytiques mises en œuvre au cours de l'essai

*HAP dans le biote - Influence de la prise d'essai*  
J. Cabillic, C. Fallot

## RÉSUMÉ

Les HAP (Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques) font partie de la liste des substances prioritaires depuis la première version de la DCE et les NQE étaient établies uniquement dans l'eau (0,0002 à 2,4 µg/L). Leur caractère lipophile leur permet d'être facilement transférés dans les différents compartiments de la chaîne alimentaire. C'est pourquoi, suite à la révision de la DCE en 2013, leur surveillance a également été recommandée dans le biote avec une NQE fixée à 5 µg/kg.

Dans la bibliographie, l'analyse des HAP dans le biote est généralement réalisée avec des prises d'essais conséquentes (de 5 à 50 g) afin d'atteindre des niveaux bas de quantification. L'utilisation de prises d'essai importantes n'est pas sans conséquence sur la méthode analytique puisqu'elle peut engendrer des problèmes d'interférences liés à l'extraction de la matrice (matières grasses par exemple) mais aussi des limitations dans les techniques disponibles (limitation dans la taille des cellules pour l'extraction par solvant pressurisé à chaud (PLE) par exemple).

Le LNE a testé l'influence de cette prise d'essai sur les performances de la méthode analytique. Pour cela, il est proposé de tester, pour différents niveaux de prises d'essais, deux méthodes d'extraction classiquement utilisées pour l'analyse des HAP dans le biote : l'extraction par solvant pressurisé à chaud et l'extraction QuEChERS. Les composés ciblés par l'étude sont le benzo(a)pyrène, le fluoranthène et l'indéno(123-cd)pyrène, qui sont représentatifs de l'ensemble de la famille des HAP. Les matrices testées lors de cette étude sont les crevettes grises et les gammars.

**Mots clés** (thématique et géographique) :

Prise d'essai, NQE biote, HAP, PLE, QuEChERS

*PAH in biota - Influence of the amount of sample*  
J. Cabillic, C. Fallot

ABSTRACTS

PAHs (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) have been on the list of priority substances since the first version of the WFD and the EQS were established only in water (0.0002 to 2.4 µg / L). Their lipophilic nature allows them to be easily transferred to different compartments of the food chain. Therefore, following the review of the WFD in 2013, their monitoring was also recommended in biota with an EQS of 5 µg / kg.

In the bibliography, the analysis of PAHs in biota is generally carried out with substantial amount of sample (from 5 to 50 g) in order to reach low levels of quantification. The use of large test samples is not without consequences on the analytical method since it can cause problems of interference related to the extraction of the matrix (fat for example) but also the limitations in the techniques available (limitation in cell sizes for PLE for example).

LNE has tested the influence of the amount of sample on the performance of the analytical method. For this, it is proposed to test, for different amount of sample, two extraction methods conventionally used for the analysis of PAHs in biota: PLE and QuEChERS extraction. The compounds targeted by the study are benzo (a) pyrene, fluoranthene and indeno (123-cd) pyrene, which are representative of the entire family of PAHs. The matrices tested in this study are shrimps and gammarus.

**Key words** (thematic and geographical area):

Amount of sample, EQS biota, PAH, PLE, QuEChERS

## 1. GLOSSAIRE

### Composés

<b>BaP</b>	Benzo(a)Pyrène
<b>Fluo</b>	Fluoranthène
<b>IndenoP</b>	Indéno(123-cd)Pyrène
<b>HAP</b>	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

### Matériels analytiques, autres

<b>DCE</b>	Directive Cadre Eau
<b>GC/MS</b>	Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (Gas Chromatography - Mass Spectrometry)
<b>NQE</b>	Normes de Qualité Environnementales
<b>PLE</b>	Extraction par solvant pressurisé (Pressurized Liquid Extraction)
<b>QuEChERS</b>	Quick, Easy, Cheap, Rugged and Safe
<b>SPE</b>	Extraction sur phase solide (Solid Phase Extraction)

## 2. INTRODUCTION

Les HAP (Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques) font partie de la liste des substances prioritaires depuis la première version de la DCE [1] en 2000 car leur surveillance est particulièrement importante dans les écosystèmes aquatiques soumis aux pressions urbaines. La publication de la Directive 2013/39/EU du 28/08/2013 [2] a entraîné une diminution de leur NQE dans l'eau : pour le fluoranthène de 0,1 µg/L à 0,0063 µg/L et pour le benzo(a)pyrène de 0,05 µg/L à 0,00017 µg/L. Ces niveaux de concentrations sont très faibles et posent de réels problèmes de fiabilité des résultats de mesure car difficilement atteignables avec les moyens analytiques actuellement disponibles. De plus, l'analyse ponctuelle d'échantillons d'eau n'est pas représentative de la contamination réelle dans le milieu car elle ne prend pas en compte la variabilité temporelle et ne donne pas d'informations sur l'impact biologique potentiel des contaminants car leur biodisponibilité n'est pas prise en compte.

La surveillance des HAP dans le biote a été introduite dans la révision de la DCE en 2013 avec une NQE fixée à 5 µg/kg. Elle indique qu'elle doit être réalisée dans les crustacés et mollusques car les HAP étant métabolisés dans les chairs de poisson, leur suivi dans cette matrice n'est pas pertinent.

Dans le Guide européen [3] destiné aux Etats membres afin de leur donner des indications quant à l'implémentation des nouveaux aspects de la DCE, des indications sont données sur les quantités de matériel biologique nécessaire pour atteindre les minimums de performances (Tableau 1).

**Tableau 1** : prise d'essai spécifiée dans des programmes de surveillances européens utilisant le biote pour surveiller la pollution environnementale [3]

Programme	Tissue/organes	Weight (g, on a wet weight basis)
Irish national programme for the monitoring of contaminants in fish and fisheries products under the WFD	Whole soft body of blue mussels	5
Flanders (Belgium) pilot study on monitoring in biota (2013-2014)	Whole soft body of mollusc bivalves	50
Spanish national monitoring programme in marine biota	Whole soft body of blue mussels	10
Norwegian monitoring programme MILKYS "Contaminants in coastal waters of Norway"	Whole soft body of blue mussels	> 50
Austrian biota monitoring programme in running waters	Whole fish	20
UK national Clean Seas Environment Monitoring Programme	Whole soft body of blue mussels	20
Dutch contaminant monitoring programme in marine biota	Whole soft body of blue mussels	20 - 40
Italian National programme on coastal water	Whole soft body of mussel <i>Mytilus galloprovincialis</i>	> 50
CIPAIS International Commission for the protection of Italian-Swiss waters International / regional	Fish muscle tissue	> 50
	Mussel whole soft body	> 20

Dans la littérature, ces prises d'essai importantes sont du même ordre de grandeur [4-10]. La mise en œuvre de telles prises d'essai pose deux problèmes. Tout d'abord d'un point de vue pratique, l'échantillon risque de remplir la totalité de la cellule d'extraction, laissant peu d'espace au solvant pour réaliser efficacement l'extraction des composés d'intérêt. Deuxièmement, lors d'une extraction PLE, les composés d'intérêt sont extraits ainsi que d'autres substances comme par exemple des matières grasses. Ces dernières peuvent interférer sur l'analyse et nécessite donc une étape de purification appropriée. Plus la méthode d'analyse contient d'étapes, plus le risque de perdre ou dégrader les composés d'intérêt augmente. Il est donc nécessaire de trouver un compromis.

L'influence de cette prise d'essai sur les performances de la méthode analytique mais également sur les variations de la mesure fait donc l'objet de ce livrable. Pour cela, l'analyse de HAP a été réalisée sur des prises d'essais différentes au niveau de concentration de la NQE. Deux méthodes d'extraction classiquement utilisées pour l'analyse des HAP dans le biote et développées dans le cadre des travaux d'AQUAREF ont été mises en œuvre. L'analyse a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

Trois composés, représentatifs de l'ensemble de la famille des HAP de la liste des substances prioritaires de la DCE, ont été sélectionnés pour cette étude : le benzo(a)pyrène (traceur des HAP à 5 et 6 anneaux), le fluoranthène et l'indéno(123-cd)pyrène.

### **3. EVALUATION DE L'INFLUENCE DE LA PRISE D'ESSAI SUR L'ANALYSE DES HAP DANS DES MATRICES BIOLOGIQUES**

#### **3.1 CONDITIONS ANALYTIQUES**

Les deux méthodes d'extraction, qui ont été comparées dans cette étude sont :

- PLE : méthode traditionnellement utilisée pour l'extraction de HAP dans les matrices environnementales.
- QuEChERS : méthode très utilisée dans le domaine de l'agroalimentaire<sup>1</sup> mais émergente pour l'extraction des HAP dans des matrices environnementales.

Les protocoles de ces méthodes ont fait l'objet d'un livrable AQUAREF dans le cadre de l'amélioration des opérations d'analyses physico-chimiques en 2015 [11]. Toutes les conditions expérimentales (réactifs et étalons, matériel et conditions analytiques) sont décrites en annexe I.

Les quantifications ont été réalisées par dilution isotopique : ajout avant l'extraction de molécules marquées analogues à celles étudiées.

#### **3.2 ECHANTILLONS**

##### **Choix de la matrice**

La surveillance des HAP dans les crustacés et mollusques a été préférée dans le cadre de la DCE à celle des poissons car ces derniers métabolisent ces composés. Cette méthode étant également plus écologique, l'AFB recommande l'analyse de gammars encagés déployés dans le milieu pour la mise en place de sa stratégie de surveillance. Les quantités requises pour réaliser les analyses sont plus faibles pour des matrices telles que les gammars que pour des poissons et crustacés. C'est pourquoi l'étude a été réalisée sur des prises d'essai allant de 1,5 à 5 g (poids humide) de biote.

Pour cette étude, deux types de matrices ont été utilisées :

- des crevettes grises fraîches :

Les crevettes grises font parties des crustacés qui se rapprochent le plus des gammars. Elles ont été congelées à -20°C et lyophilisées pendant 48h. Comme étant de gros calibres (2-2,5 cm), elles ont été broyées et homogénéisées dans un flacon en verre ambré après lyophilisation.

Trois prises d'essais ont été testées (Tableau 2) :

**Tableau 2 : prises d'essai des crevettes grises**

Crevettes lyophilisées (poids sec) g	Equivalent poids humide * g
0,3	1,5
0,6	3
1	5

\* taux humidité des crevettes ≈ 80%

---

<sup>1</sup> NF EN 15662 « Aliments d'origine végétale - Méthode polyvalente de détermination des résidus des pesticides par CG-Sm et SL/SM/SM avec extraction/partition avec de l'acétonitrile et nettoyage par SPE dispersés - Méthode QuEChERS »



La prise d'essai étant limitée par la taille des plus grandes cellules PLE disponible de 33 mL, elle n'a pas pu excéder 1 g de poids sec.

- des gammares (fournis par BIOMAE<sup>2</sup>) :  
Les gammares ont été congelés à -20°C et lyophilisés pendant 48h. La quantité de matériau disponible étant plus faible que les crevettes grises, seules deux prises d'essai ont pu être évaluées (Tableau 3).

**Tableau 3 : prises d'essai des gammares**

Gammares lyophilisées (g/poids sec)	Equivalent (g/poids humide *)
0,3	1,5
1	5

\* taux humidité des gammares ≈ 80%

### Dopage des échantillons

Chaque matériau lyophilisé a été dopé artificiellement par une solution synthétique de HAP dans l'acétonitrile à des concentrations connues (au niveau des NQE) : le matériel lyophilisé (crevette ou gammare) a été pesé dans la cellule PLE ou dans le tube de 50 mL pour les QuEChERS. Les solutions mères de composés marqués et non marqués dans l'acétonitrile ont été ajoutées à la prise d'essai. Les concentrations cibles de l'étude sont résumées dans le Tableau 4. La solution synthétique de dopage a été analysée pour servir de référence lors de l'exploitation des résultats.

**Tableau 4 : concentration cibles de l'étude**

	NQE biote µg/kg	Concentrations cibles de l'étude µg/kg
Fluoranthène	30	30
Benzo(a)pyrene	5	5
Indeno(123-cd)pyrène	-	5

### 3.3 BLANCS

Afin de vérifier le niveau de contamination des matrices naturelles utilisées, des « blancs matrices » ont été réalisées pour les crevettes et les gammares (Figure 1). Chaque matériau a été analysé avant dopage avec les deux méthodes pour vérifier les niveaux de contamination naturelle. Parallèlement, des « blancs méthodes » (solvants ayant suivis tout le processus analytique) ont également été réalisés.

---

<sup>2</sup> BIOMAE utilise des gammares issus d'une population de référence préalablement acclimatés dans des aquariums en conditions contrôlées de laboratoire (température, photopériode, alimentation, etc.)

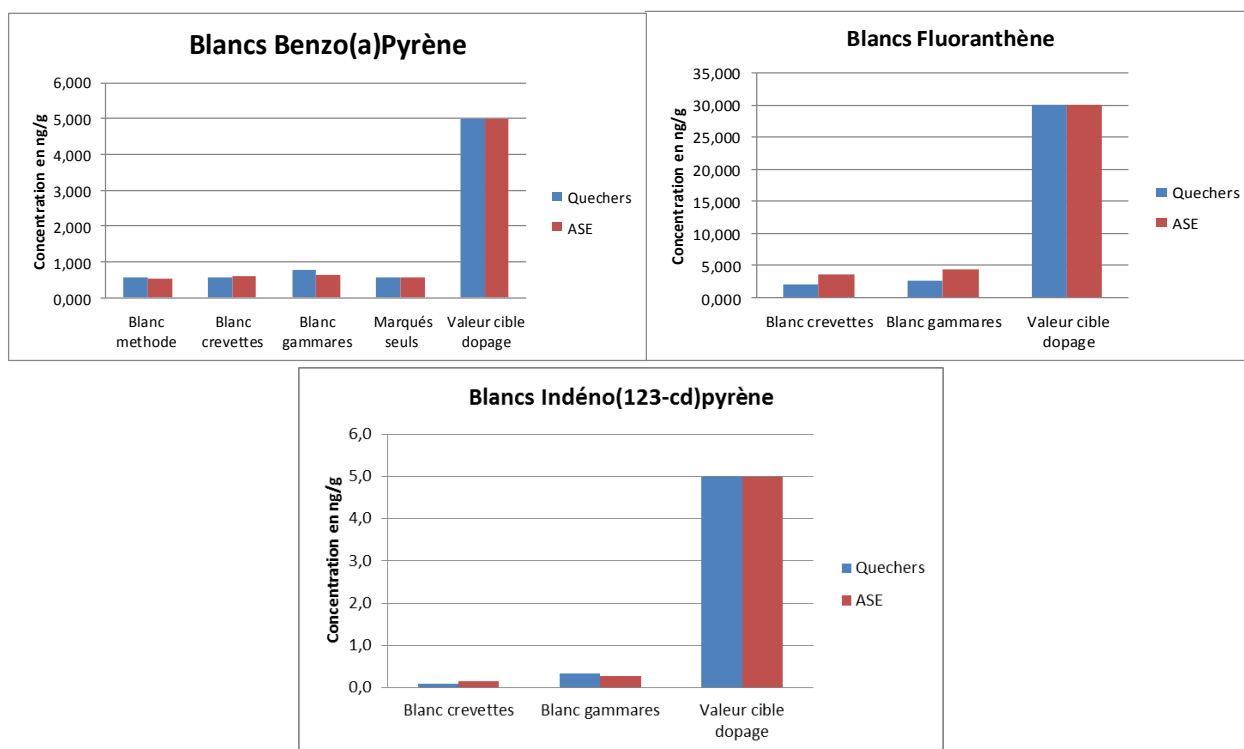


Figure 1 : Blancs gammares et blancs crevettes pour le Benzo(a)pyrène, Fluoranthène et Indéno(123-cd)pyrène

- Pour le benzo(a)pyrène : les blancs crevettes et gammares représentent environ 10% de la valeur cible de dopage. Il est également du même ordre de grandeur dans le blanc méthode ce qui signifie que la pollution est apportée par la méthode et non par la matrice. Les différentes étapes de la méthode ont donc été isolées afin d'identifier l'origine de cette pollution mais sans succès. L'injection de la solution marquée seule (ayant servi comme étalons pour la quantification du benzo(a)pyrène) a permis de montrer qu'elle était à l'origine de la pollution comme le montre la figure 1. Cependant, les niveaux de contaminations sont négligeables par rapport à la concentration visée.
- Pour le fluoranthène : la pollution des crevettes et gammares en fluoranthène représente environ 10% de la valeur de dopage. La concentration de fluoranthène retrouvée dans les blancs méthodes est négligeable.
- Pour l'indéno(123-cd)pyrène : la pollution des crevettes et gammares en indéno(123-cd)pyrène représente environ 5% de la valeur de dopage. La concentration en indéno(123-cd)pyrène retrouvée dans les blancs méthodes est négligeable.

## 4. RÉSULTATS

### 4.1 CREVETTES GRISES

L'influence de la prise d'essai a été évaluée en analysant trois échantillons de masses différentes : 300 mg, 600 mg et 1 g poids sec (ce qui correspond à 1,5 ; 3 et 5 g de poids humide) au niveau de concentration de la NQE. Les essais ont été réalisés en triplicat.

La

Figure 2 montre que les dispersions observées pour chaque condition sont comparables entre les deux méthodes d'extraction. Il est également à noter que les concentrations retrouvées (niveau NQE biote) après analyse d'échantillons dopés sont comparables à celles retrouvées dans la référence (solution synthétique de dopage). La prise d'essai de crevettes grises n'a pas d'influence sur l'analyse du benzo(a)pyrène, du fluoranthène et de l'indéno(123-cd)pyrène dans les crevettes et ce quelle que soit la méthode d'extraction et les conditions opératoires définies dans ces travaux : PLE ou QuEChERS.

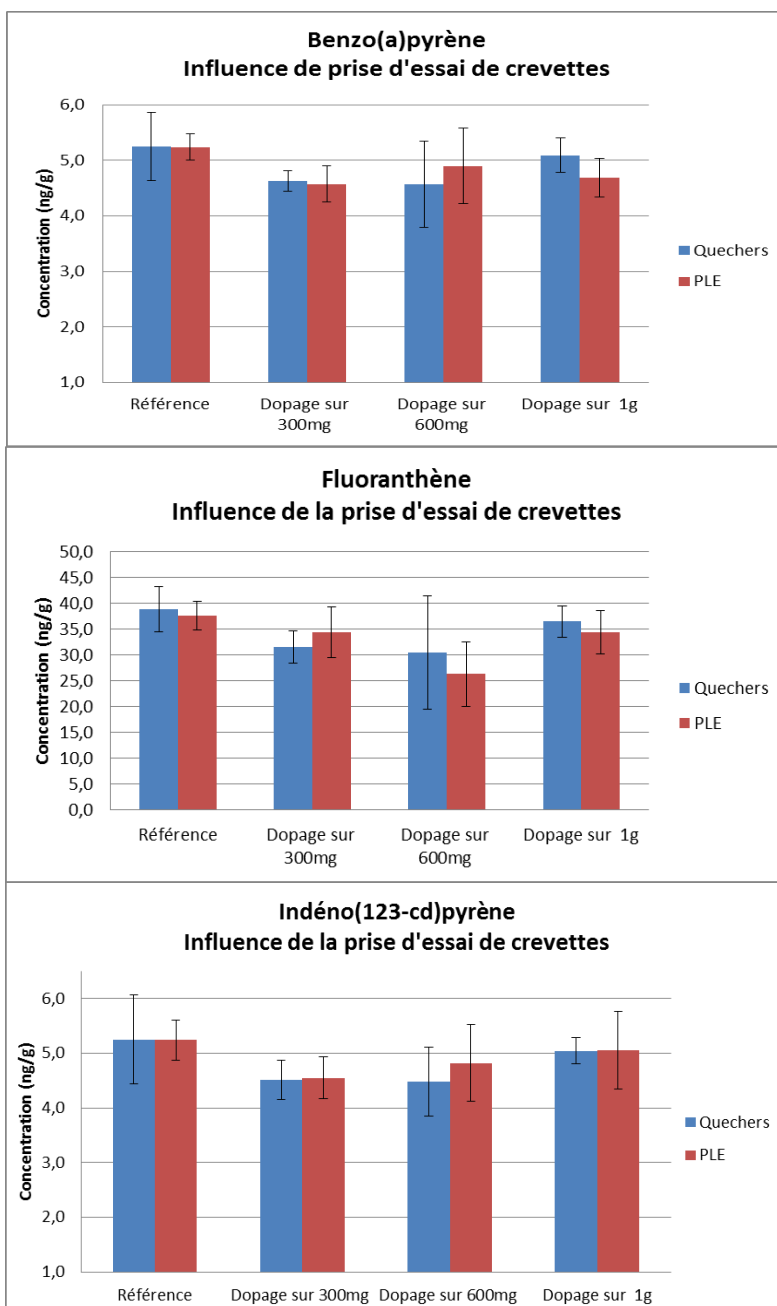


Figure 2 : influence de la prise d'essai sur l'analyse des HAP dans les crevettes au niveau de la NQE biote (n=3). La prise d'essai est exprimée en masse sèche : 300mg, 600mg et 1 g de poids sec équivaut respectivement à 1,5g, 3g et 5 g de poids humide. La référence est la solution synthétique de dopage.

## 4.2 GAMMARES

La quantité de gammares disponibles étant plus faibles que celle des crevettes grises, deux prises d'essais ont été testées : 300 mg et 1 g poids sec (ce qui correspond respectivement à 1,5 et 5 g poids humide) dopés au niveau de la NQE. Chaque prise d'essai a été répétée trois fois.

La Figure 3 montre que les dispersions observées pour chaque condition sont comparables entre les deux méthodes d'extraction. Il est également à noter que les concentrations retrouvées (niveau NQE biote) après analyse d'échantillons dopés sont comparables à celles retrouvées dans la référence. Une exception à cette observation concerne l'extraction du fluoranthène par QuEChERS dans 1g de gammares. En effet, pour cet essai le résultat obtenu est statistiquement différent de la référence et de la valeur obtenue avec l'extraction PLE. Cependant, contrairement aux autres essais, pour ces conditions, la dispersion des résultats est beaucoup plus faible (deux à trois fois plus faibles). Il serait nécessaire de répéter la mesure pour valider ces valeurs.

Les résultats obtenus pour les gammares sont donc comparables à ceux obtenus pour les crevettes grises, c'est-à-dire que la prise d'essai n'a pas d'influence sur l'analyse des HAP ciblés par l'étude au niveau des NQE biote dans les conditions testées.

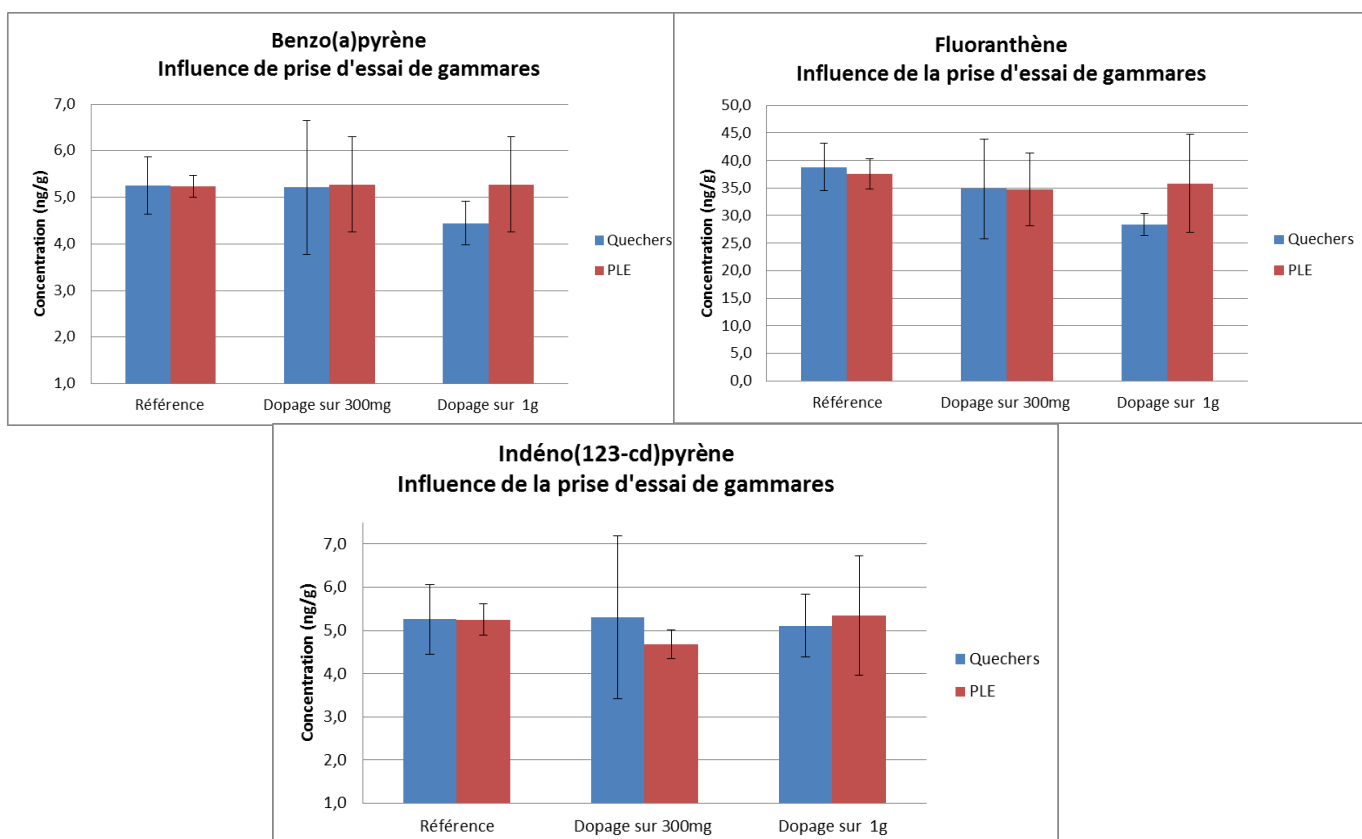


Figure 3 : influence de la prise d'essai sur l'analyse des HAP dans les gammares au niveau de la NQE biote (n=3, les barres d'erreur correspondent à deux fois l'écart type des trois valeurs). La prise d'essai est exprimée en masse sèche : 300mg et 1 g de poids sec équivaut respectivement à 1,5g et 5 g de poids humide. La référence est la solution synthétique de dopage.

## **5. CONCLUSION**

La publication de la Directive 2013/39/EU du 28/08/2013 et notamment la définition de NQE dans le biote pour les HAP nécessite la mise en place de nouvelles méthodologies analytiques adaptées à l'analyse des composés dans cette nouvelle matrice. Le guide européen [3] recommande des prises d'essais importantes de l'ordre de la dizaine de g. Cette étude montre qu'il est possible de faire varier la prise d'essai sans incidence sur le résultat et ce aux niveaux de concentration de la NQE. En effet, pour les deux matrices testées, crevettes grises et gammares, aucune influence liée à la prise d'essai (1,5 g à 5 g de poids humide) n'a été observée au niveau des NQE. Il est donc possible d'analyser les HAP dans le biote avec des prises d'essais plus faibles que celles citées dans le guide européen ou dans la bibliographie.

## Bibliographie

[1] Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy

[2] 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.

[3] Common implementation strategy for the water framework directive (2000/60/EC), guidance document n°32, on biota monitoring (the implementation of EQS biota) under the water framework directive, European Commission, Technical report, 2014

[4] 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](https://www.bruker.com/fileadmin/user_upload/8-PDF-Docs/Separations_MassSpectrometry/Literature/literature/ApplicationNotes/CA-274101-eBook_24.03.pdf)

[5] 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

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

[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, Anal. Chem. Acta, 707 (2011) 84- 91

[8] J-P. Besse, M. Coquery, C. Lopes, A. Chaumot, H. Budzinski, P. Labadie, O.Geffard, Caged Gammarus fossarum (Crustacea) as a robust tool for the characterization of bioavailable contamination levels in continental waters: Towards the determination of threshold values, Water Research, 47 (2013) 650-660

[9] H. Zhang, S. Bayen, B. C. Kelly, Co-extraction and simultaneous determination of multi-class hydro- phobic organic contaminants in marine sediments and biota using GC-EI-MS/MS and LC-ESI-MS/MS, *Talanta* 143(2015) 7-18

[10] P-L. Cloutier, F. Fortin, P. E. Groleau, P. Brousseau, M. Fournier, M. Desrosiers, QuEChERS extraction for multi-residue analysis of PCBs, PAHs, PBDEs and PCDD/Fs in biological samples, *Talanta* 165 (2017) 332-338

[11] 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

## ANNEXE I

Description des méthodes analytiques mises en œuvre au cours de l'essai

### Réactifs et étalons :

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

La silice activée 3 heures à 450°C provient de chez Merck. Le Florisil 60-100 mesh de chez Fluka.

Les HAP (fluoranthène, benzo(a)pyrène et indeno(1,2,3-cd)pyrène) sont des composés en poudre de chez Cluzeau Info Labo de pureté >99%. Des solutions mères ont été préparées dans le toluène à des concentrations de l'ordre de 200 µg/g.

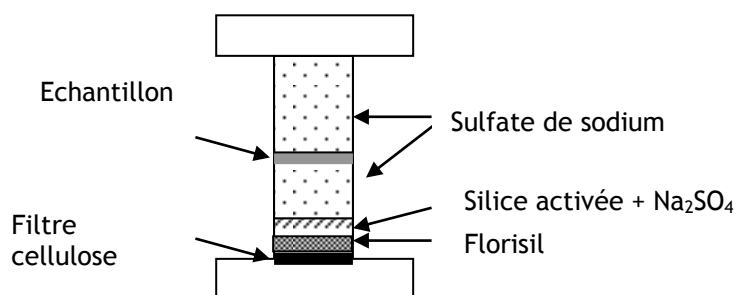
Les HAP marqués (fluoranthène D10, benzo(a)pyrène D12, indeno(1,2,3-cd)pyrène D12) sont des poudres de chez Cluzeau Info Labo. Des solutions mères ont été préparées dans le toluène à des concentrations de l'ordre de 50 µg/g pour le fluoranthène D et le benzo(a)pyrène D et de 183 µg/g pour l'indeno(123-cd)pyrène D.

### 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).

### Extraction par PLE :

Les extractions ont été réalisées sur un système ASE 200 (Dionex) couplé à un contrôleur de solvant. La cellule est remplie comme indiquée sur le schéma ci-dessous :





L'extraction est réalisée en suivant le programme suivant :

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

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

Une deuxième purification de l'extrait est réalisée sur colonne SPE EZ-POP NP (Sigma Aldrich) de la même manière que pour l'extraction QuEChERS.

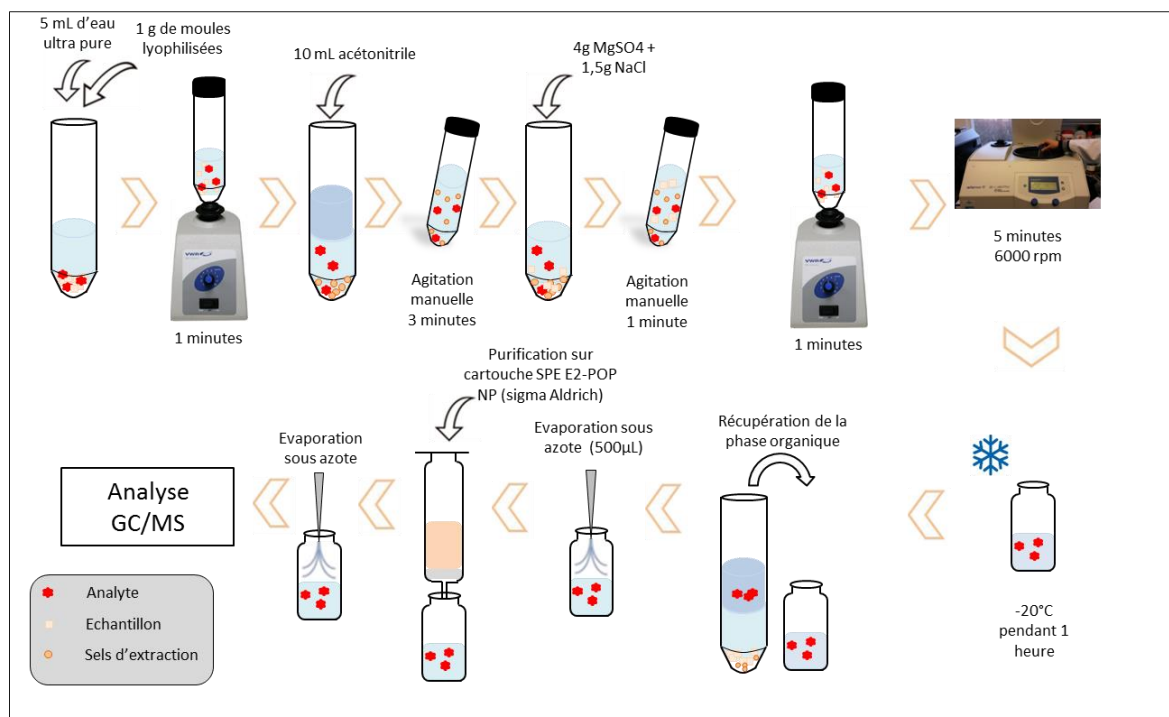
### Extraction QuEChERS

- Si l'échantillon est lyophilisé, ajouter 5 mL d'eau Ultrapure et agiter 1 minute au vortex.
- Pour extraire les HAP, ajouter 10 mL d'acétonitrile dans le flacon et agiter manuellement pendant 3 minutes.
- Ajouter les sels d'extraction (4 g de MgSO<sub>4</sub> + 1,5 g 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 6000 rpm.
- 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 500µL.

Pour la purification sur SPE EZ-POP NP :

- Les cartouches sont préalablement conditionnées avec 10 mL d'acétone, sécher 10 minutes sous vide après élution de l'acétone.
- Déposer l'extrait en tête de la colonne 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 2 x 7,5 mL d'acétonitrile.
- Evaporer sous azote d'extrait.
- Injecter l'extrait sur le GC/MS.

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



**Conditions chromatographiques et du spectromètre de masse**

Les composés ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse (Agilent 7890B) couplée à la spectrométrie de masse (Quattro microGC).

La colonne utilisée est une colonne DB-5MS de chez Agilent, 30m x 0,25 mm ID x 0,25 µm film.

**Conditions GC:**

- Gas : Helium
- Injection : 5µL en mode solvant vent (80 ml/min jusqu'à 1 min), à 280° C
- Débit gaz vecteur : 1,2 mL/min d'hélium
- Température du four : 50° C pendant 2 min, 25° C/min jusqu'à 300° C (pendant 10 min)
- Température injecteur : 60° C pendant 1 min, 720° C/min jusqu'à 310° C
- Température ligne de transfert : 300° C,
- Température source : 230° C,
- Température du quadripôle : 150° 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 D10	212	106
Fluoranthène	202	200
Benzo(a)pyrène D12	264	132
Benzo(a)pyrène	252	250
Indéno(1,2,3-cd)pyrène D12	288	144
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	276	138

*Masses sélectionnées pour chaque composé*