

## **S-III-3.1v2 – DOSAGE DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES (HAP) PAR HPLC**

### **1. Objet**

Cette procédure a pour objet de décrire la méthode de dosage de 16 hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) par chromatographie liquide haute performance (HPLC) de tout échantillon de sols (y compris les sédiments), de matières utilisées sur ou dans les sols et de déchets.

### **2. Domaine d'application**

Cette procédure permet le dosage de 16 hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) par HPLC dans les sols (y compris les sédiments), les matières utilisées sur ou dans les sols et les déchets dans des domaines de concentration de 10 µg/kg à 1000 µg/kg. Les concentrations plus élevées sont analysées après dilution.

Ces HAP sont les suivants : naphthalène, acénaphthylène, acénaphthène, fluorène, phénanthrène, anthracène, fluoranthène, pyrène, benzo(a)anthracène, chrysène, benzo(b)fluoranthène, benzo(k)fluoranthène, benzo(a)pyrène, dibenzo(ah)anthracène, benzo(ghi)pérylène et indéno(1,2,3-cd)pyrène.

### **3. Principe**

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont extraits de l'échantillon à analyser par le dichlorométhane. Après concentration, l'extrait est purifié sur colonne d'alumine basique.

Les HAP sont séparés par HPLC et détectés par un détecteur fluorimétrique à longueurs d'onde d'excitation et d'émission variables pour les 15 HAP et par un détecteur à barrette de diodes pour l'acénaphthylène.

La quantification des HAP est réalisée par la méthode de l'étalonnage externe.

### **4. Conditionnement et conservation de l'échantillon**

Les échantillons doivent être prélevés dans des flacons en verre brun d'une contenance de 1/2 litre à 1 litre et remplis à ras bord. Ils sont conservés à 4 °C et à l'obscurité et subissent une phase d'extraction dès que possible (dans la semaine).

Si les échantillons ne peuvent être extraits dans la semaine, ils sont séchés chimiquement avec du Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pour une conservation de 1 mois maximum (à 4 °C).

## **5. Préparation de l'échantillon**

Verser le contenu sur une feuille à revêtement téflonné ou faire un ou plusieurs carottages dans le pot à l'aide d'un évideur de  $\pm 15$  mm de diamètre. Eliminer les pierres et autres matériaux non broyables ayant un diamètre supérieur à 10 mm et prendre  $\pm 50$  g d'échantillon représentatif (peser au trébuchet). Ajouter le même poids de sulfate de sodium anhydre (7.4) si le solide contient de 50 à 100 % de matières sèches, ajouter 2 à 3 fois le poids de l'échantillon pour les boues contenant 10 à 50 % de matières sèches et ajouter 4 fois le poids de l'échantillon pour les matières contenant moins de 10 % de matières sèches (par exemple les digestats de biométhanisation)

Homogénéiser rapidement au pilon de façon à obtenir une poudre fine et sèche.

Dans le cas particulier de déchets de type shredder qui contient des matières plastiques, un séchage à l'étuve à 40 °C suivi d'un broyage cryogénique est nécessaire de façon à obtenir un échantillon représentatif de granulométrie de 4 mm.

## **6. Appareillages et matériels utilisés**

**6.1 En cas d'extraction soxhlet** : appareil Soxhlet, d'une capacité d'environ 100 ml, avec cartouches d'extraction en fibres de verre, un ballon d'une capacité de 250 ml, un condenseur à reflux et un manteau chauffant.

**6.2 En cas d'extraction liquide sous pression** : appareil de type ASE 200 de Dionex avec des cellules d'extraction de 11 ou 22 ml et des flacons de 40 ou 60 ml munis d'une couronne et d'un septum.

**6.3 Chromatographe en phase liquide à haute performance**, équipé d'un détecteur fluorimétrique à longueurs d'onde d'excitation et d'émission variables (capable de programmer au moins 6 paires de longueurs d'onde) et d'un détecteur à barrette de diodes (DAD). Le dégazage de la phase mobile (élimination de l'oxygène résiduel) est nécessaire (ex. : avec l'hélium ou sous vide).

Ce système comprend également :

- des pompes analytiques, permettant de réaliser un gradient d'élution binaire;
- un thermostat de colonne, capable de maintenir une température constante dans un intervalle de  $\pm 0,5$  °C;
- un système de traitement des données.

**6.4 Colonne de séparation avec une colonne de garde, remplie de phase C18** spécifique pour l'analyse des HAP, comme par exemple la colonne Chromspher PAH - 5  $\mu\text{m}$  - 250 x 4,6 mm i.d.

**6.5 Concentrateur à l'azote**, type Turbovap et tubes de 200 ml avec senseur de 0.5 ml ou concentrateur de type Kuderna Danish

**6.6 Trébuchet de précision 0.1 à 1 g**

**6.7 Balance analytique de précision 1 mg**



## 6.8 Micropipettes automatiques de différents volumes ou de volume variable

## 6.9 Matériel et verrerie

- Pipettes Pasteur de 25 et 15cm de long.
- Fiole de 1.5ml de préférence silylée avec septum pré-fendu.
- Filtre pour analyse quantitative en fibre de verre.
- Entonnoir et béchers.
- Laine de verre préalablement lavée au dichlorométhane puis séchée.
- Jaugés de différents volumes.
- Colonne de purification en verre de 30 cm de long et de 1cm de diamètre et robinet en Téflon.

Utilisation exclusive d'un matériel en verre nettoyé au détergent (de nature plutôt minérale), rincé à l'eau courante puis à l'eau désionisée, séché puis rincé avec le solvant d'extraction avant son utilisation ou passé au four à 450 °C (à l'exception de la verrerie volumétrique).

## 7. Réactifs utilisés

Les réactifs et substances chimiques respectant les exigences liées à l'analyse par HPLC, à la détection par fluorescence et DAD et ne contenant pas de HAP conviennent pour la préparation des échantillons.

La vérification de pureté des nouveaux lots est faite par l'intermédiaire des essais à blanc.

- 7.1. **Eau** pour HPLC préparée fraîchement à partir d'une installation d'eau ultrapure
- 7.2. **Cyclohexane ou hexane, dichlorométhane** pour analyse de résidus organiques ou équivalent
- 7.3. **Acétonitrile** pour HPLC de fluorescence aussi faible que possible
- 7.4. **Sulfate de sodium anhydre** pour analyse chauffé à 600°C pendant 6 heures
- 7.5. **Azote** de pureté 4.8 ou plus
- 7.6. **Oxyde d'alumine basique** de granulométrie  $\pm 100 \mu\text{m}$

### Activation et désactivation de l'alumine

Chauffer l'alumine basique pendant huit heures à 150 °C. Laisser refroidir dans un dessiccateur.

Peser 11 g d'eau désionisée pour 89 g d'alumine activée. Agiter jusqu'à dispersion de tous les agrégats en flacon hermétique et laisser reposer l'alumine ainsi désactivée au moins 16 heures avant l'emploi. Utiliser pendant maximum 15 jours.

## 7.7. Mélanges étalons

Il est recommandé d'utiliser des solutions étalons du commerce à moins que le laboratoire ne possède une grande expérience de la manipulation des substances dangereuses.

### 7.7.1. Solution mère

Solution commerciale de concentration de 10 mg/l par constituant dans l'acétonitrile et/ou solution de référence certifiée NIST1647« Priority Pollutant Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Acetonitril » de concentrations variables suivant les constituants (de 20 mg/l à 4 mg/l). Cette solution certifiée peut servir de solution - mère pour réaliser les solutions d'étalonnage ou uniquement pour vérifier la solution commerciale.

Après ouverture de l'ampoule, la solution est stockée dans un flacon hermétique dans le frigo. Avant chaque utilisation, le flacon est pesé pour contrôler les pertes éventuelles de solvant. La dernière pesée du flacon est comparée à la nouvelle pesée avant prélèvement pour la réalisation des solutions filles.

### 7.7.2. Solutions d'étalonnage

Préparer un minimum de 6 solutions étalons par dilution appropriée de la solution mère (7.7.1) dans l'acétonitrile à l'aide de micropipettes et de ballons jaugés (par exemple : 1000, 500, 250, 100, 50 et 25 µg/l).

7.7.3. Solution étalon commerciale de concentration 10 mg/l dans le cyclohexane ou l'hexane pour tester la purification sur alumine.

## 8. Mode opératoire

### 8.1. Extraction

Les HAP étant sensibles à la lumière, il est conseillé d'éviter de travailler à la lumière vive.

#### Extraction Soxhlet

Remplir la cartouche Soxhlet par 20 à 30 g de mélange échantillon/sulfate de Na, placer un tampon de laine de verre au-dessus de l'échantillon et extraire au dichlorométhane pendant 16 heures.

Dans le cas particulier de déchets de type shredder qui contiennent des matières plastiques, extraire l'échantillon à l'hexane et non au dichlorométhane et uniquement en soxhlet pendant 2 heures pour éviter la co-extraction de certains polymères.

#### Extraction liquide sous pression

Si utilisation du système ASE, remplir une cellule de 11 ml ou 22 ml d'échantillon. Peser la prise d'essai (10 g ou 20 g de mélange échantillon/sulfate de Na suivant cellule) au trébuchet. Placer la cellule sur le plateau adéquat de l'ASE.

Extraire au dichlorométhane.

Paramètres d'extraction ASE :   Static : 5 minutes  
  Pression : 2000 psi



Température : 150 °C  
Cycle : 1  
Flush % : 60 % volume  
Purge time : 60 s  
Extraction : 2

Un rinçage est effectué entre chaque cellule.

Filtrer la phase organique sur du sulfate de sodium anhydre et récupérer dans un tube pour concentrer l'échantillon. Rincer les flacons et le sulfate avec quelques millilitres de cyclohexane. (L'échange de solvant est nécessaire pour ne pas perturber la purification).

Évaporer l'extrait obtenu de moitié à l'évaporateur (sous courant d'azote) à 40 °C. Rincer les parois du tube et continuer à évaporer jusqu'à 0,5 ml, puis rincer le col à la pipette Pasteur.

Évaporer jusqu'à  $\pm 1$  ml.

Si l'extrait est fortement contaminé (coloration, aspect irisé,...), il est préférable de jauger à 10 ou 100 ml et prélever 1 ml pour la purification.

**D'autres solvants ou mélange de solvants peuvent être utilisés (hexane/acétone, éther de pétrole/acétone, ...) à condition de prouver qu'ils donnent des résultats équivalents.**

## 8.2. Purification

Faire glisser un petit tampon de laine de verre jusqu'à l'extrémité d'une colonne de purification.

Remplir la colonne de purification avec 5 g d'alumine désactivée en tapotant légèrement puis avec 1 cm de sulfate de sodium anhydre. Rincer la colonne avec environ 10ml de cyclohexane (1 à 2 fois le volume d'alumine).

Lorsque le ménisque du solvant affleure la surface du sulfate de sodium, ajouter l'extrait à la pipette Pasteur.

Rincer le tube ayant contenu l'extrait et transférer sur la colonne. Eluer avec 40 ml de cyclohexane.

Concentrer l'extrait purifié à l'évaporateur sous azote jusqu'à  $\pm 0.5$ ml.

## 8.3. Concentration

Reprendre par environ 25 ml d'acétonitrile (rincer le tube). Continuer à concentrer jusqu'à disparition du cyclohexane et obtention d'un volume de  $\pm 0.5$  ml à 5 ml. Transvaser dans un jaugé de volume adéquat (1 à 25 ml) et rincer le tube avec une petite quantité d'acétonitrile.

Ajuster au trait. Transvaser une petite quantité d'extrait dans la fiole de 1,5 ml.

**Ne pas évaporer les extraits à sec car des pertes de naphthalène, acénaphthylène, acénaphthène et fluorène peuvent se produire.**

#### 8.4. Analyse par chromatographie (HPLC)

Les paramètres suivants se sont révélés satisfaisants pour l'analyse des sols ou boues

Colonne Chromspher PAH, 5 µm, 25 cm x 4,6 mm I.D.

Phase mobile : acétonitrile/eau :

○ 50/50 ----- 100/0 en 20 minutes

○ 100/0 pendant 10 minutes

Volume injecté : 20 µl

Débit : 1,5 ml/min

Température de la colonne : 20 °C ± 0.5

Pour le détecteur à fluorescence, les 2 propositions possibles de programmation de longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont reprises dans le tableau 1 ci-dessous :

Composé		ISSeP		Norme ISO	
		Longueur d'onde (nm)		Longueur d'onde (nm)	
		Excitation	Émission	Excitation	Émission
1	Naphtalène				
2	Acénaphène			275	350
3	Fluorène	260	330		
4	Phénanthrène	250	374		
5	Anthracène	250	400	260	420
6	Fluoranthène			270	440
7	Pyrène	270	400		
8	Benzo(a)anthracène			260	420
9	Chrysène				
10	Benzo(b)fluoranthène				
11	Benzo(k)fluoranthène				
12	Benzo(a)pyrène	290	430	290	430
13	Dibenzo(ah)anthracène				
14	Benzo(ghi)pérylène				
15	Indéno(1,2,3-cd)pyrène	305	500	305	500

Il convient d'éviter toute perturbation de la ligne de base durant la programmation des longueurs d'onde. Les modifications de longueurs d'onde ne peuvent être réalisées que si la résolution entre pics est d'au moins 2.5.

Les chromatogrammes d'une solution étalon (15 HAP) et d'un extrait de sol contaminé sont présentés en annexe 1

Pour le détecteur à barrette de diodes (DAD) placé en série, la quantification de l'acénaphthylène peut être réalisée à 229 nm. La confirmation de l'identité et de la pureté du pic est réalisée par comparaison du spectre UV avec celui des étalons.



Le chromatogramme ainsi que la comparaison avec le spectre de référence sont repris en annexe 2

## 8.5. Étalonnage

L'étalonnage se fait par la méthode des standards externes.

La gamme de travail et la linéarité de la fonction d'étalonnage est déterminée en injectant au moins 6 solutions étalons (7.7.2).

Cet étalonnage sera répété avant chaque série d'échantillons.

## 9. Paramètres qualités

### 9.1 Contrôle

Avant de procéder à l'étalonnage et aux analyses des échantillons, le bon fonctionnement de l'appareil est vérifié en injectant 1 ou 2 fois, si nécessaire, une des solutions étalons (7.7.2).

Un contrôle de la réponse du système chromatographique est réalisé toutes les 10 injections avec la solution étalon de milieu de gamme. Les résultats individuels ne doivent pas s'écarter de plus de 15 % des concentrations théoriques.

### 9.2 Essai à blanc

Effectuer parallèlement à la détermination un essai à blanc dans les mêmes conditions où l'échantillon est remplacé par du sulfate de sodium.

### 9.3 Essai « test alumine »

Effectuer parallèlement à la purification un "test alumine" où l'échantillon est remplacé par 100 µl de la solution 7.7.3 diluée 20 x ( 500 µg/l).

Le pourcentage de récupération de chaque PAH doit se situer entre 85 et 115 %

### 9.4 Essai sur matériaux certifiés

Effectuer tous les 6 mois, 3 mesures sur matériau certifié pour vérifier la stabilité de la procédure.

(Par exemple ERM – CC013a).

## 10. Calcul des résultats

A partir du chromatogramme obtenu, les HAP sont identifiés automatiquement à l'aide des temps de rétention des pics correspondants aux solutions d'étalonnage (tolérance sur le temps de rétention : 0.15 min).

Un contrôle manuel des intégrations est également effectué en finale.

Les concentrations des différents HAP dans l'extrait sont calculées par le logiciel en µg/l sur la

base de la courbe d'étalonnage à 6 points réalisées pour chaque série d'échantillons à analyser.

Si la concentration d'un composé dans un échantillon dépasse la gamme d'étalonnage, diluer l'échantillon pour essai et répéter l'analyse.

Calculer la concentration  $C_i$  en mg/kg sec du composé  $i$  à analyser dans l'échantillon de sol ou de boue à l'aide de l'équation suivante :

$$C_i = (C_e \times V_e) / (m_3 \times 10 \times MS)$$

$C_e$  : concentration du composé  $i$  dans l'extrait ( $\mu\text{g/l}$ )

$V_e$  : volume final de l'extrait (ml)

$m_3$  = masse de l'échantillon brut (en g)

MS = matières sèches (0 à 100)

$$\text{Avec } m_3 = \frac{m_2 \times m_0}{m_1}$$

$m_0$  = masse de l'échantillon brut prise pour le séchage avec le sulfate de sodium anhydre

$m_1$  = masse du mélange échantillon/sulfate de sodium anhydre (en kg)

$m_2$  = prise d'essai du mélange dans la cellule (en kg)

## 11. Rapport d'essai

Le rapport doit contenir au minimum :

- une référence à la présente méthode de la Région wallonne;
- l'identification complète de l'échantillon;
- les détails opératoires non prévus dans la méthode, ainsi que tout facteur ayant pu affecter les résultats.

## 12. Références

**ISO 13877:1998** Qualité du sol- Dosage des hydrocarbures aromatiques polycycliques- Méthode par chromatographie en phase liquide à haute performance.

**ISO 14507:2003** Qualité du sol- Prétraitement des échantillons pour la détermination des contaminants organiques.

**ISO 23809:2008** Qualité du sol- Préparation des échantillons de laboratoire à partir d'échantillons de grande taille.

**ISO 11465 :1993** Qualité du sol - Détermination de la teneur pondérale en matière sèche et en eau Méthode gravimétrique.

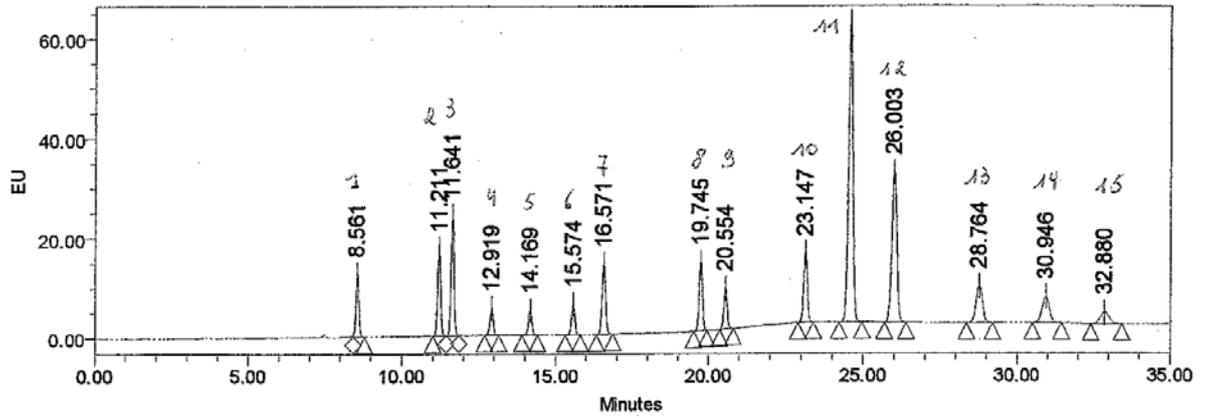
**EN 15527 :2008** Caractérisation des déchets - Dosage des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dans les déchets par chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse (CG/SM)

**NBN EN 14346 :2007** Caractérisation des déchets –Calcul de la teneur en matière sèche par détermination du résidu sec et de la teneur en eau.

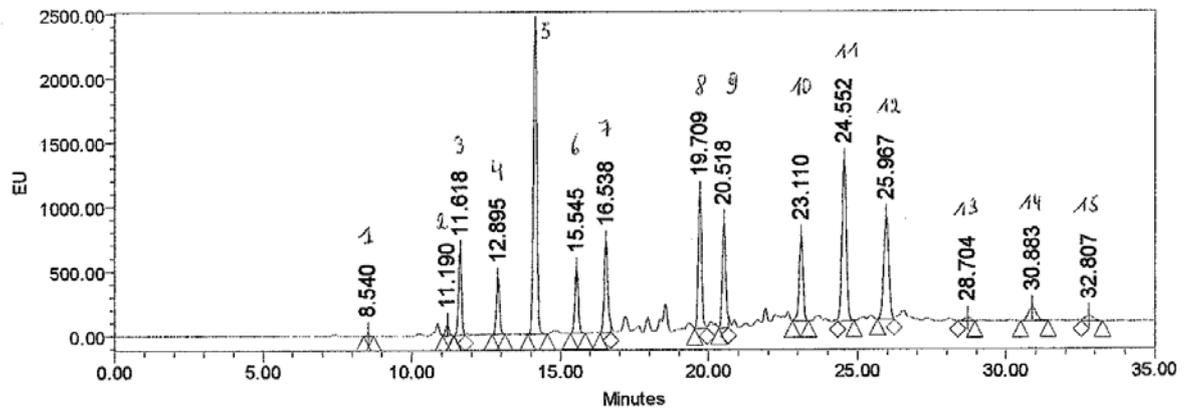


Annexe 1

**Chromatogramme - détection par fluorescence - étalon NIST 1647<sup>e</sup>**



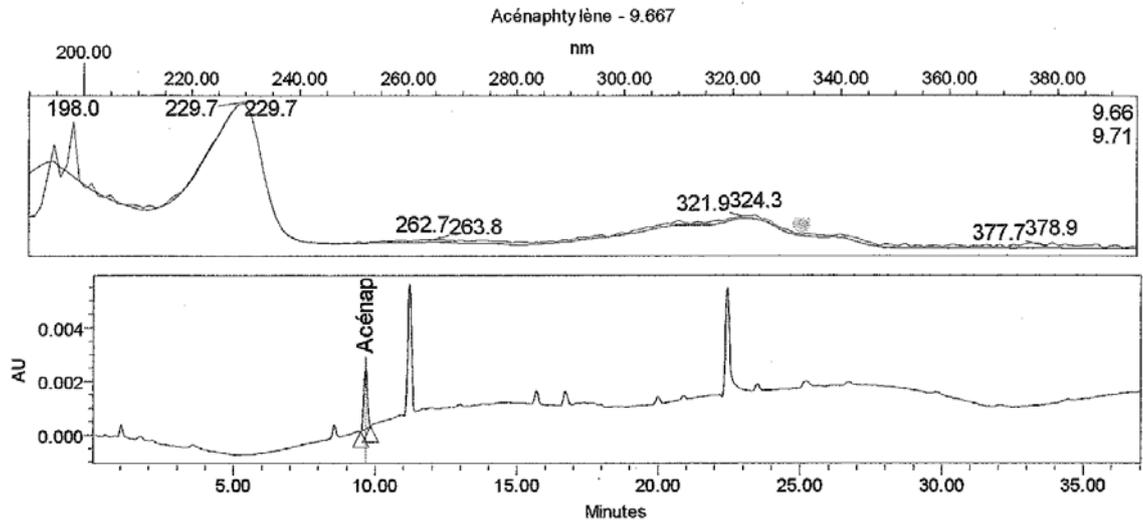
**Chromatogramme - détection par fluorescence - extrait de sol contaminé**



La numérotation des pics et leur intitulé sont repris dans le tableau 1.

Annexe 2

**Chromatogramme - détection DAD - étalon NIST 1647e - acénaphthylène**



ORIGINAL

