

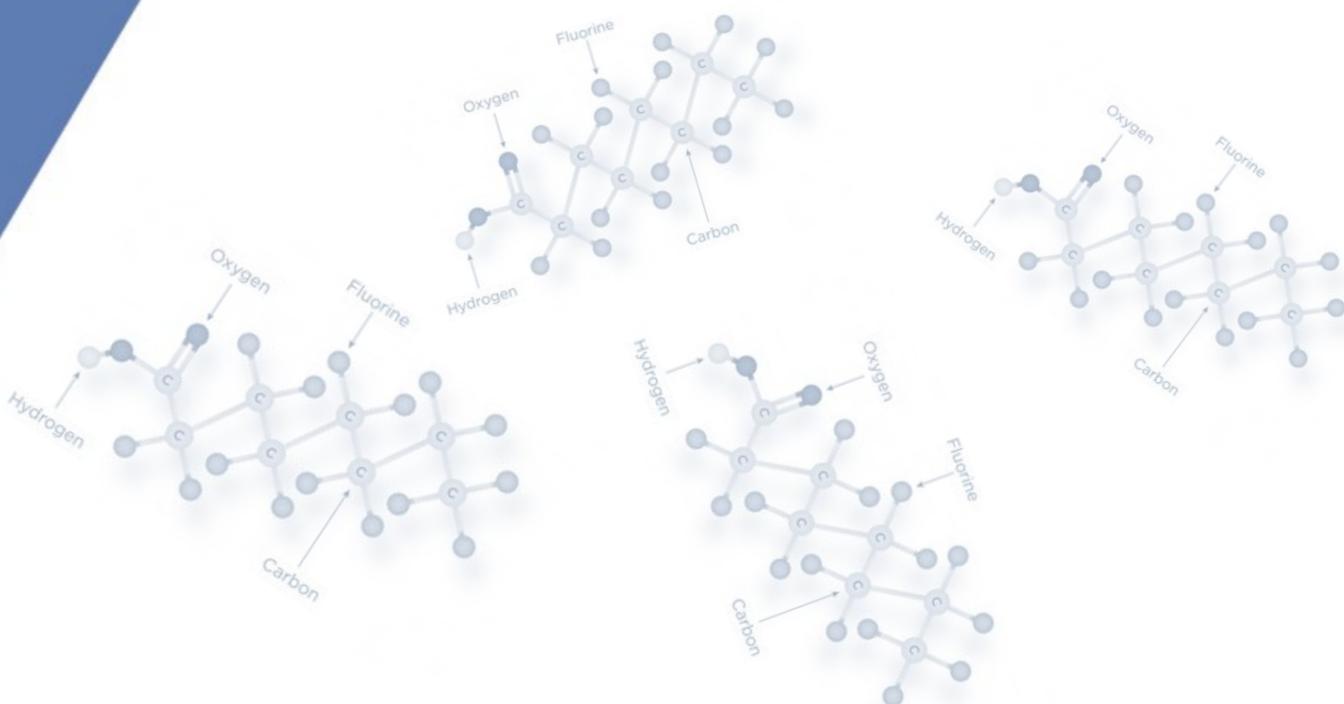


## Plan mondial de surveillance des polluants organiques persistants

### Protocole 5

**Protocole d'Analyse des polychlorodibenzo-para-dioxines, des polychlorodibenzofurannes (PCDD/PCDF) et des polychlorobiphényles (PCB) de type dioxine (dl-PCB) dans l'air ambiant et les tissus humains**

**Juin 2015**



**Procédure d'analyse des polluants organiques persistants  
(POP) dans des matrices environnementales et humaines afin  
de mettre en œuvre le Plan mondial de suivi de la Convention  
de Stockholm**

**Protocole 5:  
Protocole d'analyse des  
polychlorodibenzo-para-dioxines, des polychlorodibenzofurannes,  
(PCDD/PCDF) et des polychlorobiphényles (PCB) de type dioxine (dl-  
PCB) dans l'air ambiant et les tissus humains**

Branche Chimie  
Programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNUE)  
Economie Division

Genève

Juin 2015

Le présent document a été élaboré par:

Centre de Recherche MTM  
École des sciences et de la technologie  
Université Örebro  
SE-701 82 Örebro  
Suède

Pour:

Branche Chimie  
Economie Division  
Programme des Nations Unies pour l'Environnement

Dans le cadre du projet "Mise en place des outils et méthodes pour inclure les neuf nouveaux POP dans le Plan mondial de suivi"; Projet ID GFL 2328-2760-4B97, avec l'assistance financière du Fonds pour l'environnement mondial.

## 1 PORTEE

Le Plan mondial de suivi de la Convention de Stockholm fournit un cadre d'analyse des polluants organiques persistants (POP); les congénères dont l'analyse est recommandée dans les matrices de base y sont répertoriés (cf. chapitre 2 du “Document d'orientation sur le Plan mondial de suivi sur les polluants organiques persistants”, PNUE 2013). Il convient mettre en place un protocole pour assurer que ces composés soient toujours analysés correctement, et de la même manière, dans les divers laboratoires. Afin d'assister les laboratoires des POP à effectuer l'analyse des POP, la Branche Chimie de la Division de la technologie, de l'industrie et de l'économie (DTIE) du Programme des Nations Unies pour l'Environnement a entrepris la définition de procédures générales d'analyse POP initiaux et des nouveaux POP.

Le Plan mondial de suivi (PMS), établi en application de l'article 16 de la Convention de Stockholm (<http://chm.pops.int/Convention/ConferenceofthePartiesCOP/Meetings/COP5/COP5Documents/tabid/1268/Default.aspx>) exige l'analyse des polluants organiques persistants (POP) dans des matrices appropriées. Il faut mettre en place un protocole afin d'assurer que ces composés soient toujours analysés correctement, et de la même manière.

Cette procédure comprend les polychlorodibenzo-para-dioxines, les polychlorodibenzofurannes (PCDD/PCDF) et les polychlorobiphényles (PCB). Le présent protocole décrit la méthode de préparation, d'extraction, de purification et d'analyse des échantillons de dix-sept PCDD/PCDF et de douze dl-PCB dont l'analyse est recommandée (voir Tableau 1) dans le lait maternel, le sérum humain et l'air.

Tableau 1: Congénères PCDD/PCDF et dl-PCB à analyser conformément au protocole de base

Structure	Matrice de base appropriée
2,3,7,8-TCDD	Air, lait maternel/tissus
1,2,3,7,8-PnCDD	Air, lait maternel/tissus
1,2,3,4,7,8-HxCDD	Air, lait maternel/tissus
1,2,3,6,7,8-HxCDD	Air, lait maternel/tissus
1,2,3,7,8,9-HxCDD	Air, lait maternel/tissus
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	Air, lait maternel/tissus
OCDD	Air, lait maternel/tissus
2,3,7,8-TCDF	Air, lait maternel/tissus
1,2,3,7,8-PnCDF	Air, lait maternel/tissus
2,3,4,7,8-HxCDF	Air, lait maternel/tissus
1,2,3,4,7,8-HxCDF	Air, lait maternel/tissus
1,2,3,6,7,8-HxCDF	Air, lait maternel/tissus
2,3,4,6,7,8-HxCDF	Air, lait maternel/tissus
1,2,3,7,8,9-HxCDF	Air, lait maternel/tissus
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	Air, lait maternel/tissus
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	Air, lait maternel/tissus
OCDF	Air, lait maternel/tissus

Tableau 2: Congénères PCB de type dioxine à analyser conformément au protocole de base

Numéro du congénère PCB	Structure	Matrice de base appropriée
Polychlorobiphényles <i>non-ortho</i> -substitués		
77	3,3',4,4'-tetraCB	Air, lait maternel/tissus
81	3,4,4',5-tetraCB	Air, lait maternel/tissus
126	3,3',4,4',5-pentaCB	Air, lait maternel/tissus
169	3,3',4,4',5,5'-hexaCB	Air, lait maternel/tissus
Polychlorobiphényles <i>mono-ortho</i> -substitués		
105	2,3,3',4,4'-pentaCB	Air, lait maternel/tissus
114	2,3,4,4',5-pentaCB	Air, lait maternel/tissus
118	2,3',4,4',5-pentaCB	Air, lait maternel/tissus
123	2',3,4,4',5-pentaCB	Air, lait maternel/tissus
156	2,3,3',4,4',5-hexaCB	Air, lait maternel/tissus
157	2,3,3',4,4',5'-hexaCB	Air, lait maternel/tissus
167	2,3',4,4',5,5'-hexaCB	Air, lait maternel/tissus
189	2,3,3',4,4',5,5'-heptaCB	Air, lait maternel/tissus

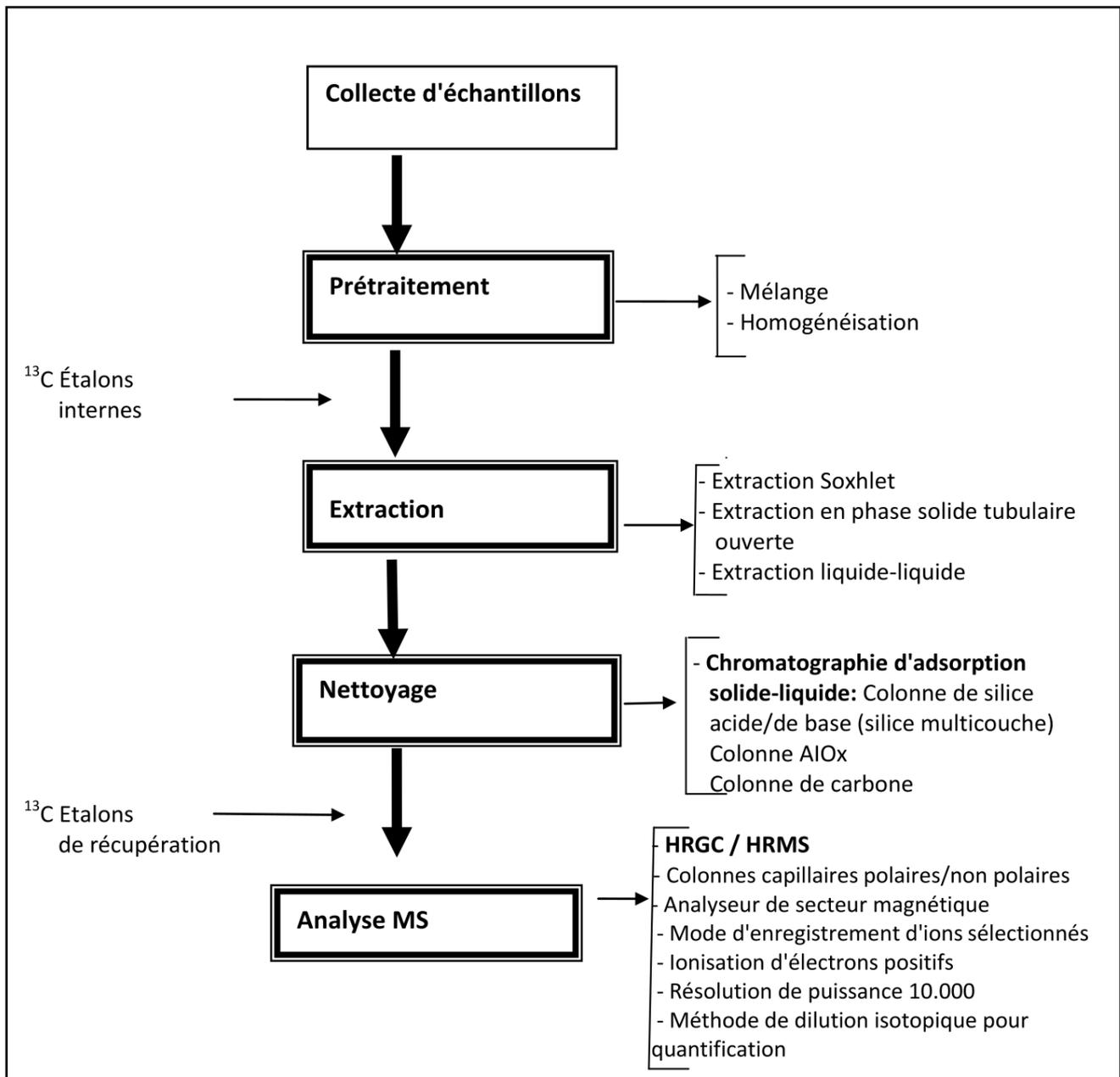
## 2 PRINCIPE

Cette méthode est utilisée pour déterminer les PCDD/PCDF et dl-PCB dans le lait maternel, dans d'autres échantillons biologiques, dans les sédiments, les gaz de combustion, la suie et d'autres matrices abiotiques.

Description de la méthode: l'échantillon une fois homogénéisé et extrait conformément à la méthode appropriée, est soumis à une stratégie de chromatographie sur colonne en trois étapes.

Si l'échantillon contient du soufre, le soufre doit être éliminé au cours du nettoyage. L'élimination du soufre au cuivre métallique est la méthode de choix dans cette application.

Les échantillons sont homogénéisés et extraits par un solvant organique. L'extrait est nettoyé pour éliminer les graisses et autres contaminants. L'identification et la quantification sont effectuées par chromatographie en phase gazeuse, spectrométrie de masse [haute résolution (HRMS) ou triple quadripôle (MS/MS)]. La méthode repose sur la dilution isotopique, de sorte que les étalons internes marquées au  $^{13}\text{C}$  sont ajoutés à l'échantillon et compensent les pertes lors de l'extraction de l'échantillon, du nettoyage et de l'analyse.



### 3 PRECAUTIONS

Avant l'analyse et la préparation des matériaux nécessaires, il est essentiel de prendre deux mesures de précaution.

1. Les solvants et matériaux utilisés lors de l'analyse doivent être testés pour vérifier qu'ils ne soient pas contaminés et qu'ils ne contiennent pas de PCDD / PCDF ou de PCB dignes d'intérêt.
2. Le présent protocole décrit l'analyse des PCDD/PCDF et des PCB. Il est pourtant possible de changer certains paramètres et les conditions d'analyse décrits dans ce protocole, et d'obtenir malgré tout les mêmes résultats. S'agissant de ces changements, l'ensemble de la méthode doit être optimisée et validée afin d'assurer la comparabilité des données.

### 4 MESURES DE SECURITE

Il faut être attentif, car les POP sont potentiellement cancérigènes et peuvent porter atteinte au système immunitaire. Le gel de silice sec est dangereux en cas d'inhalation. Des solvants tels que l'acétate d'éthyle, le toluène, le dichlorométhane et le *n*-hexane posent des risques d'incendie, irritent la peau et représentent un risque environnemental. L'acide sulfurique concentré et l'acide chlorhydrique sont extrêmement corrosifs pour la peau. Il faut utiliser des gants en nitrile et travailler sous une hotte pour manipuler ces produits chimiques. Les solvants usagés sont jetés dans des récipients spéciaux bien identifiés pour déchets de solvants chlorés et non chlorés.

### 5 MATERIAUX ET REACTIFS

#### 5.1 Matériaux

Balances (précision 0,01 g et 0,0001)

Flacon à fond arrondi (100 ml, 250 ml et 500 ml)

Dessiccateur

Evaporateur rotatif

Fours (130 °C)

Bocaux en verre

Seringue Hamilton (25 µL)

Réfrigérateur (4 °C)

Échantillonneur pour échantillonnage de l'air et des gaz de cheminée: tube adsorbant PUF ou XAD, filtre à particules de verre de 70mm et supports

Pompe à air

Granulés pour ébullition, lavés à l'acétone et au toluène

Verrerie Soxhlet et dispositif de chauffage électrique ou bain d'eau

Bain à ultrasons

Dispositif SPE

Tubes de prélèvement (20 ml)

Colonnes en verre fritté de 22 cm x 20 mm de diamètre intérieur (di)

Colonnes en verre pour gel de silice de 15 cm de long et 11 mm de diamètre intérieur

Laine de verre silanisé, J.T. Baker, Deventer, Pays-Bas

Pipettes Pasteur

Flacon en verre GC (2 ml)

Capsuleur/décapsuleur

Colonne capillaire, silice fondue DB-5MS, WCOT, 30 m x diamètre intérieur (di) 0.25 mm x Film 0.25  $\mu\text{m}$ , J&W, Folsom, Canada, États-Unis

Colonnes Cape Technology

## 5.2 Réactifs

Sulfate de sodium anhydre,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne

Potassium hydroxyde, KOH, Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne

Gel de silice, Grade 7731, taille de pore 60 Å, maille 70-230, Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne

Tetradecane, Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne

n-Hexane, Suprasolv, Merck, Darmstadt, Allemagne

Dichlorométhane, Fluka, Steinheim, Allemagne

Toluène, Fluka, Steinheim, Allemagne

Ethanol, 96% , Scharlau, Sentmenat, Espagne

Méthanol, Fluka, Steinheim, Allemagne, Carbopack, maille C 80/100, Supelco Analytical, Bellefonte, États-Unis

Célite 545, Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne

Alumine B, EcoChrom, MP Biomedicals, Eschwege, Allemagne

Acide sulfurique, 95-97%, Merck, Darmstadt, Allemagne

Disque de mousse de polyuréthane (PUF), 14 cm x 1.35 cm, aire de surface 365  $\text{cm}^2$ , masse 4.40 g, volume 207  $\text{cm}^3$ , Tisch Environmental, Cleves, OH, États-Unis

XAD-2 Adsorbent Tisch Environmental, Cleves, OH, États-Unis

Azote gazeux

Solution PCDD/PCDF (Wellington, Ontario, Canada et Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, États-Unis)

Solutions d'étalonnage (cf. Section 8.3.)

### 5.3 Instrumentation

GC-HRMS avec une résolution supérieure à 10,000. GC est fabriqué par Agilent, Santa Clara, CA, États-Unis. MS fabriqué par Waters, Milford, MA, États-Unis:

GC: 6890N

Injecteur: 7683B

MS: Instrument de secteur magnétique Autospec

Logiciel pour intégration, gestion et stockage des données, MassLynx, Waters, Milford, MA, États-Unis

## 6 PREPARATION DES GELS DE SILICE

### 6.1 Gel de silice

#### 6.1.1 [Gel de silice neutre](#)

Couler le gel de silice 60, maille 70-230 (Merck) dans une grande colonne en verre avec laine de verre au fond. Laver le gel avec deux volumes de méthanol, puis deux volumes de dichlorométhane. Après l'évaporation des solvants, transférer le gel dans une grande bassine en verre et l'activer à 130°C pendant au moins 24 heures avant l'utilisation. Stocker le gel à 130°C.

#### 6.1.2 [40 pour cent \(%\) d'acide sulfurique – gel de silice](#)

Ajouter 150 g de gel de silice activé et 100 g d'acide sulfurique (Merck, p.a.) dans un bocal. Couvrir le bocal et le secouer jusqu'à siccité du gel. Stocker le gel à température ambiante.

#### 6.1.3 [20 pour cent \(%\) d'acide sulfurique – gel de silice](#)

Ajouter 200 g de gel de silice activé et 50 g d'acide sulfurique (Merck, p.a.) dans un bocal. Couvrir le bocal et le secouer jusqu'à siccité du gel. Stocker le gel à température ambiante.

#### 6.1.4 [Potassium hydroxyde – gel de silice](#)

Dissoudre complètement 84 g de potassium hydroxyde dans 400 ml de méthanol, dans une fiole à fond arrondi de 2000 ml. Ajouter 150 g de gel de silice non lavé, maille 70-230 (Merck). Placer la fiole dans un évaporateur rotatif avec un bain d'eau à 55°C. Ne pas faire le vide. Après 90 minutes, transférer le gel à une colonne. Laver le gel avec deux volumes de méthanol et deux volumes de dichlorométhane. Après l'évaporation des solvants, transférer le gel dans un bocal couvert. Stocker le gel à température ambiante.

### 6.2 Mélange de carbone activé - célite

Mélanger 3.6 g de carbone (Carbopack C maille 80-100, Supelco) à 16.4 g de célite (545, Fluka) en agitant vigoureusement dans une fiole Erlenmayer de 250 ml. Conserver le mélange dans un dessiccateur à température ambiante.

## 7 MANIPULATION DES ECHANTILLONS

Il est important que les méthodes d'extraction et de nettoyage soient adaptées afin de minimiser la dégradation thermique et photolytique. Pour éviter la dégradation photolytique, toutes les préparations doivent être soigneusement effectuées. Utiliser du verre ambré de couleur et/ou couvrir les flacons en verre avec du papier d'aluminium.

### 7.1 Homogénéisation

#### 7.1.1 Echantillon biologique

Peser et homogénéiser les échantillons au sulfate de sodium sans eau ( $\text{NaSO}_4$ , Fluka), rapport 1 + 5. Pour manipuler de plus grandes quantités (plus de 10g), utiliser un mélangeur, mais pour homogénéiser de faibles quantités, il suffit d'un mortier. Tout l'équipement utilisé entre un échantillon et le suivant doit être rincé, dans l'ordre, à l'éthanol, au n-hexane et au dichlorométhane. Le poids de tous les échantillon doit être enregistré sur un protocole de laboratoire. Les échantillons homogénéisés doivent être stockés au congélateur jusqu'à l'extraction.

#### 7.1.2 Plasma

Avant l'extraction, effectuer une homogénéisation complète du sérum en retournant plusieurs fois l'échantillon jusqu'à ce qu'il soit considéré comme homogène.

### 7.2 Détermination de la teneur en matières grasses

#### 7.2.1 Tissus biologiques

Pour les échantillons de faible niveau, par exemple, la graisse de globicéphale:  
Préparer une colonne de 50 ml en appliquant un petit bouchon de laine de verre au fond. Transférer environ 25 g-30 g de l'échantillon homogénéisé à la colonne de la pipette. Eluer la graisse avec 4 volumes d'hexane/dichlorométhane (1/1) dans la fiole à fond arrondi préalablement pesée (peser la fiole avant le lavage). Laisser évaporer le solvant (en utilisant de l'azote) et peser la fiole jusqu'à atteindre un poids constant. La teneur en matières grasses est calculée comme suit:

Teneur en matières grasses (%) =  $100 \times \text{poids de la graisse} / \text{poids de l'échantillon}$

## 8 PROCEDURE

### 8.1 Enrichissement

Les  $^{13}\text{C}$  Etalons internes (IS), les  $^{13}\text{C}$  Etalons de récupération (RS) et les  $^{12}\text{C}$  Etalons de quantification (QS) sont utilisés dans cette méthode. La méthode se fonde sur l'hypothèse selon laquelle l'étalon marqué (IS) et l'analyte présentent un comportement physique et chimique identique au cours de toutes les étapes de l'analyse, ce qui est généralement vrai pour le nettoyage, mais pas nécessairement pour l'extraction. Les étalons internes (IS) sont ajoutés à l'échantillon avant l'extraction et le nettoyage, et les étalons de récupération (RS) sont ajoutés directement dans la fiole GC. En comparant les niveaux IS et RS, il est possible de compenser les éventuelles erreurs des utilisateurs. Les étalons de quantification (QS) sont utilisés pour quantifier les niveaux des échantillons.

## 8.2 Manipulation des étalons et observation des protocoles de poids

Il existe pour chaque étalon un protocole qui prévoit l'enregistrement de l'étalon à sa dernière utilisation. A la prochaine utilisation de l'étalon, il faudra vérifier si le poids correspond à celui du dernier étalon spécifié. Si le solvant (habituellement le toluène) s'évapore, rajouter du solvant jusqu'à obtention du poids correct. Si les poids étaient supérieurs au dernier poids spécifié, il faut faire évaporer le solvant. Cela peut être aisément fait en soufflant de l'air avec une pipette Pasteur sur l'étalon, jusqu'à obtention du poids souhaité. La différence entre le dernier poids spécifié et le nouveau poids maximum vérifié devrait être au maximum de  $\pm 0,0002$  g. Il faut utiliser une nouvelle pipette Pasteur pour chaque nouvel étalon.

L'enrichissement des échantillons se fait à l'aide de seringues Hamilton. Il existe des seringues différentes pour chacun des étalons différents. Avant et après l'utilisation d'une seringue, il faut la laver au n-hexane et au toluène (10 fois chacun). Après avoir utilisé les seringues, cette procédure doit être répétée avant de placer les seringues dans leurs conteneurs et de les stocker dans l'armoire.

Il faut préparer un étalon tous les dix échantillons. Les étalons comprennent l'étalon interne (IS) des analytes ciblés, l'étalon de récupération (RS) des analytes ciblés, et un mélange natif des analytes ciblés.

Le tétradécane est utilisé en tant que «keeper» des étalons et des extraits d'échantillons. La concentration et le volume des étalons à utiliser sont déterminés par le chimiste sur la base des niveaux prévus dans chaque projet.

Les étalons peuvent varier suivant les matrices, les niveaux et l'objectif de l'analyse. La figure suivante propose différentes possibilités d'utilisation des IS, RS et QS.

Tableau 3: Exemples d'utilisation des étalons internes (IS), de récupération (RS) et de quantification (QS).

Groupe de POP	IS	RS	QS
dl-PCB	IS dl-PCB # 77, 126, 169 Conc.: 10 pg/μL	RS PCDD/PCDF (EN1948) 1,2,3,4-TCDD 1,2,3,7,8,9-HxCDD Conc.: 2 pg/μL	dl-PCB #77, 126, 169, 81, 105, 114, 118, 123, 156, 157, 167, 189 Conc 1-10 pg/μL
PCDD/PCDF faibles concentrations	IS PCDD/PCDF (EN1948) 2,3,7,8-TCDD 1,2,3,7,8-PnCDD 1,2,3,4,7,8-HxCDD 1,2,3,6,7,8-HxCDD 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD OCDD 2,3,7,8-TCDF 2,3,4,7,8-PnCDF 1,2,3,4,7,8-HxCDF 1,2,3,6,7,8-HxCDF 2,3,4,6,7,8-HxCDF 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF OCDF Conc.: 2-4 pg/ μl	RS PCDD/PCDF (EN1948) 1,2,3,4-TCDD 1,2,3,7,8,9-HxCDD Conc 2 pg/μL	EPA-8290STN 2,3,7,8-TCDD 1,2,3,7,8-PnCDD 1,2,3,4,7,8-HxCDD 1,2,3,6,7,8-HxCDD 1,2,3,7,8,9-HxCDD 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD OCDD 2,3,7,8-TCDF 1,2,3,7,8-PnCDF 2,3,4,7,8-PnCDF 1,2,3,4,7,8-HxCDF 1,2,3,6,7,8-HxCDF 1,2,3,7,8,9-HxCDF 2,3,4,6,7,8-HxCDF 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF OCDF Conc.: 2.5-12.5 pg/μl
PCDD/PCDF fortes concentrations	IS PCDD/PCDF (EN1948) 2,3,7,8-TCDD 1,2,3,7,8-PnCDD 1,2,3,4,7,8-HxCDD 1,2,3,6,7,8-HxCDD 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD OCDD 2,3,7,8-TCDF 2,3,4,7,8-PnCDF 1,2,3,4,7,8-HxCDF 1,2,3,6,7,8-HxCDF 2,3,4,6,7,8-HxCDF 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF OCDF Conc.: 20-40 pg/ μL	RS PCDD/PCDF (EN1948) 1,2,3,4-TCDD 1,2,3,7,8,9-HxCDD Conc 20 pg/μL	EPA-8290STN 2,3,7,8-TCDD 1,2,3,7,8-PnCDD 1,2,3,4,7,8-HxCDD 1,2,3,6,7,8-HxCDD 1,2,3,7,8,9-HxCDD 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD OCDD 2,3,7,8-TCDF 1,2,3,7,8-PnCDF 2,3,4,7,8-PnCDF 1,2,3,4,7,8-HxCDF 1,2,3,6,7,8-HxCDF 1,2,3,7,8,9-HxCDF 2,3,4,6,7,8-HxCDF 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF OCDF Conc.: 25-125 pg/μL

### 8.3 Fabricant des étalons

PCDD/PCDF QS: EPA-8290STN, Wellington Laboratories, Ontario, Canada

PCDD/S IS: EN-1948ES, Wellington Laboratories, Ontario, Canada

PCDD/PCDF RS: EPA-1613 Internal Standard

dl-PCB: Wellington Laboratories, Ontario, Canada  
IS dl-PCB: MBP-CP, Wellington Laboratories, Ontario, Canada

Des étalons équivalents sont également disponibles aux Cambridge Isotopes Laboratories, Anover, MA, États-Unis.

## 8.4 Extraction

Choisir la méthode d'extraction appropriée, en fonction du type de matrice.

### 8.4.1 Extraction en phase solide colonne ouverte – adaptée par exemple aux tissus adipeux

Pour les échantillons de faible niveau, par exemple, la graisse de globicéphale:  
Préparer une colonne de 50 ml en appliquant un petit bouchon de laine de verre au fond. Transférer environ 25-30 g de l'échantillon homogénéisé à la colonne. Eluer la graisse avec 4 volumes d'hexane / dichlorométhane (1:1) dans la fiole à fond arrondi préalablement pesée (peser la fiole avant le lavage). Laisser évaporer le solvant (en utilisant l'évaporateur rotatif et de l'azote) et peser la fiole jusqu'à atteindre un poids constant.

### 8.4.2 Extraction Soxhlet – adaptée en particulier à la suie de l'air et aux sédiments

Charger l'opération de prélavage:

Laver la fiole et les parties Soxhlet à l'éthanol, au n-hexane et au dichlorométhane, dans cet ordre. Remplir la fiole de toluène, mettre la cartouche dans l'extracteur Soxhlet et installer la fiole et l'extracteur. Couvrir la fiole de papier d'aluminium. Démarrer l'eau de refroidissement et l'appareil de chauffage Soxhlet, et laisser le système fonctionner pendant 24 heures.

Arrêter l'opération de prélavage:

Eteindre le système chauffage, mais laisser couler l'eau de refroidissement. Laisser la verrerie et le toluène refroidir avant de vider le toluène (de la fiole et de l'extracteur) dans la poubelle.

Charger les échantillons:

Utiliser une nouvelle fiole à fond rond, mais réutiliser la cartouche prélavée. Charger l'échantillon dans la cartouche enrichie avec l'étalon interne (IS), et ajouter du nouveau toluène. Pour analyser l'air, charger la cartouche avec l'adsorbant XAD-2 conjointement avec le filtre à particules. Installer la fiole et l'extracteur, couvrir de papier d'aluminium. Démarrer l'eau de refroidissement et l'appareil de chauffage Soxhlet.

Arrêter l'opération de l'échantillon:

Arrêter l'appareil de chauffage, laissez couler l'eau de refroidissement et laisser refroidir la verrerie et le toluène. Verser le toluène de l'extracteur dans la fiole à fond rond et laisser évaporer le toluène.

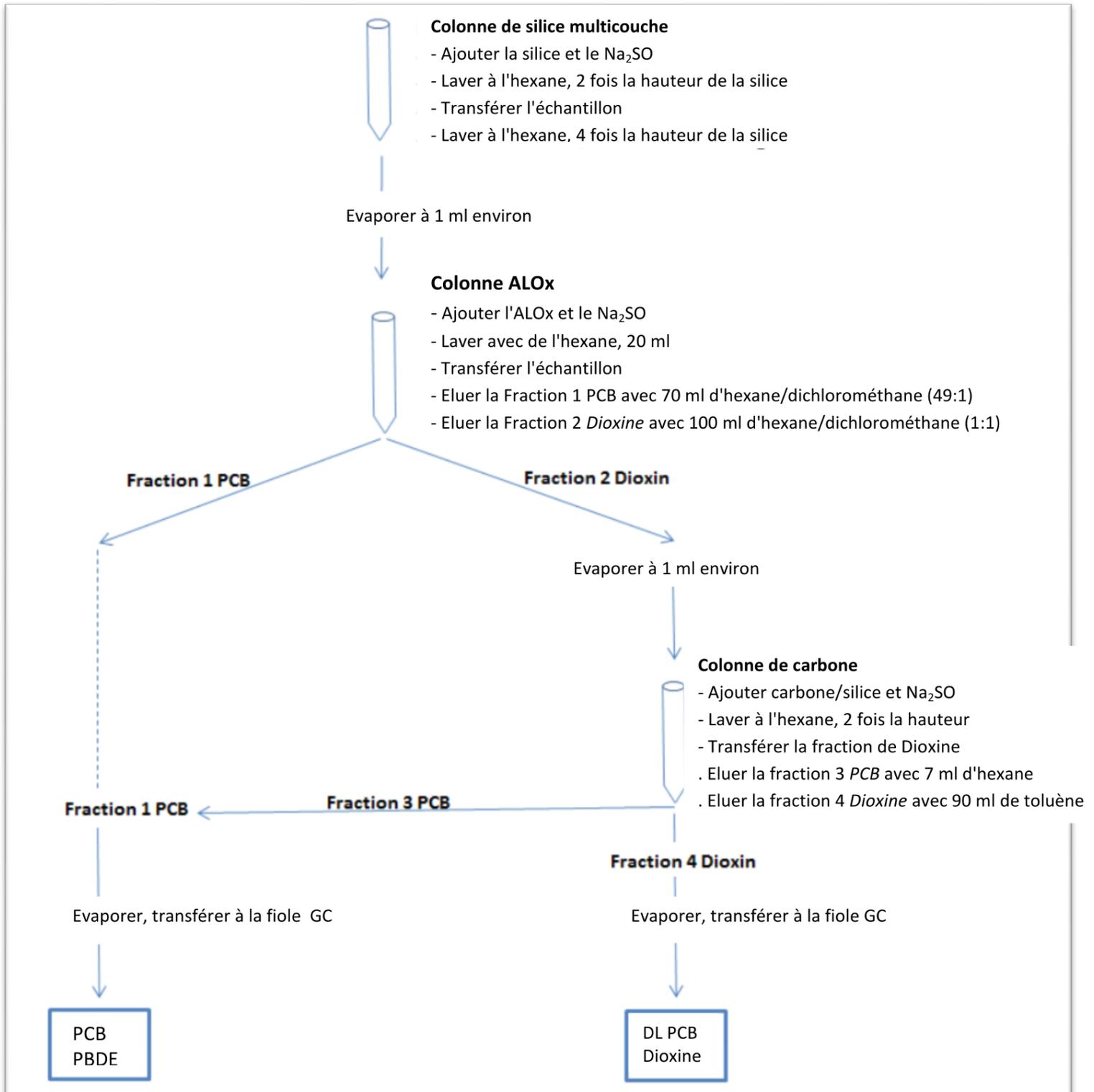
### 8.4.3 Extraction liquide-liquide, adaptée, par exemple, au lait

Préparer un mélange de 50 ml  $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$  dans une solution saturée d'éthanol.

Préparer 675 ml d'éther diéthylique /*n*-hexane 7/10 (472.5 ml d'éther diéthylique et 202.5 ml de *n*-hexane).

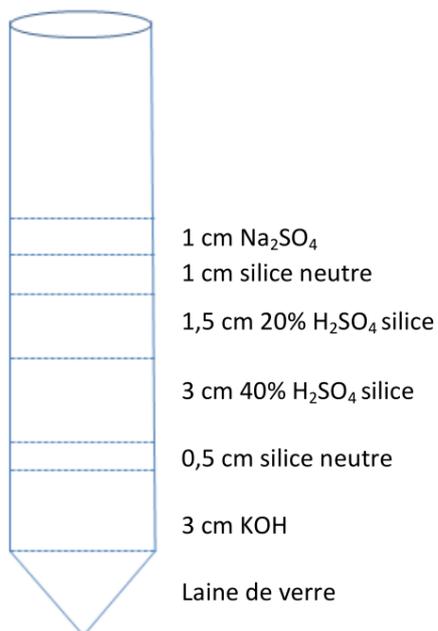
- Verser 150 ml de lait dans l'ampoule à décanter, ajouter 50 ml de Na<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> dans l'éthanol et mélanger.
- Ajouter l'étalon interne IS dans le lait ou la graisse après l'extraction.
- Ajouter 225 ml d'éther diéthylique /hexane, mélanger et laisser reposer pendant 30 min.
- Laisser s'écouler la phase aqueuse dans le bécher, et la phase organique dans une fiole à fond rond préalablement pesée.
- Laisser s'écouler la phase aqueuse dans l'ampoule à décanter, ajouter 225 ml d'éther diéthylique /hexane, mélanger et laisser reposer pendant 30 min.
- Laisser s'écouler la phase aqueuse dans le bécher et la phase organique dans une fiole à fond rond préalablement pesée (même opération que ci-dessus).
- Verser la phase aqueuse dans l'ampoule à décanter, ajouter 225 ml d'éther diéthylique /hexane, mélanger et laisser reposer pendant 30 min.
- Laisser s'écouler la phase aqueuse dans le bécher.
- Laisser s'écouler la phase organique dans une fiole à fond rond préalablement pesée (même opération que ci-dessus)
- Evaporer jusqu'à siccité en utilisant un évaporateur rotatif et ensuite de l'azote.
- Evaporer afin d'obtenir le poids constant de la graisse.
- Dissoudre la graisse dans 1-2 ml d'hexane, ensuite la transférer à la silice multicouche.

## 8.5 Nettoyage

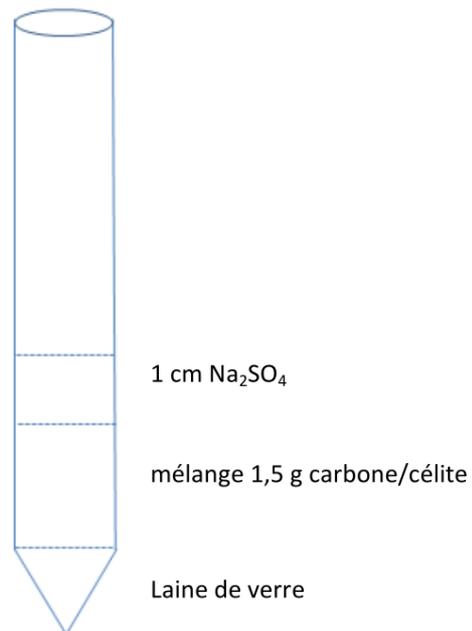
8.5.1 Aperçu schématique du nettoyage

### 8.5.2 Aperçu schématique des colonnes ouvertes

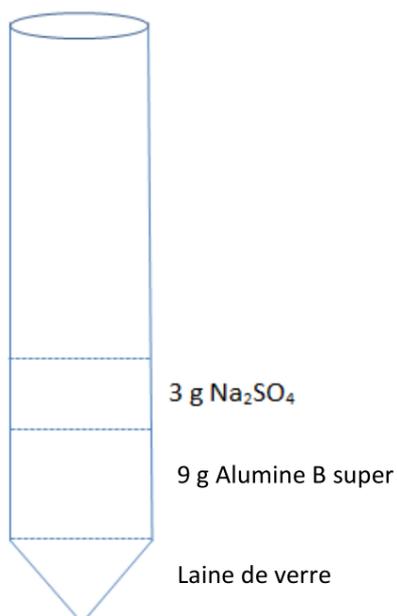
Silice multicouche  
Colonne de 50 ml ou 100 ml



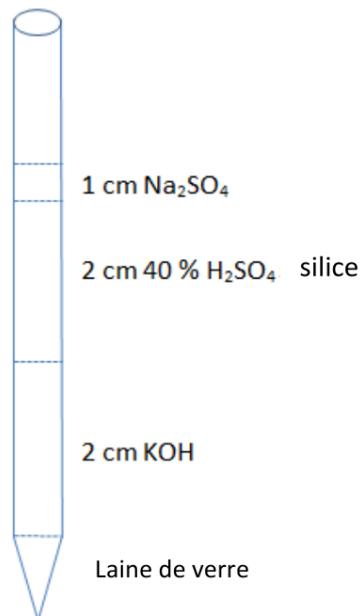
Colonne de carbone  
Colonne de 25 ml



Colonne ALOx  
Colonne de 50 ml



Mini-silice  
Pipette Pasteur



### 8.5.3 Colonne de silice multicouche acide/de base – Silice multicouche

Le type d'échantillons définit le type de colonne à utiliser, soit 50 ml, soit 100 ml. Si l'échantillon contient plus de 1 g de matière grasse ou est censé consommer une grande quantité de silice en fonction de sa composition, utiliser la colonne de 100 ml. En cas contraire, utiliser la colonne 50 ml.

#### Élution des échantillons homogénéisés

Utiliser une colonne en verre dont la taille est déterminée par celle de l'échantillon. Placer une petite quantité de laine de verre au fond de la colonne qui doit ensuite être lavée à l'éthanol, au *n*-hexane et au dichlorométhane, dans cet ordre. Ensuite, ajouter l'échantillon homogénéisé à la colonne. Tous les dix échantillons extraits, il faut extraire un échantillon blanc et un échantillon de référence de la même matrice. Dans l'échantillon blanc, l'homogénéat est remplacé par la quantité correspondante de sulfate de sodium. Il faut traiter l'échantillon blanc et l'échantillon de référence de la même manière que les échantillons réels. Après avoir enrichi/ ajouté l'étalon interne (voir paragraphe suivant), les graisses / lipides doivent être élués, en extrayant l'homogénéat à l'aide de *n*-hexane/dichlorométhane (1:1), quatre fois la hauteur de la colonne. Recueillir l'éluat dans les flacons en verre pré-pesés. Après évaporation du solvant et obtention du poids constant entre les différentes mesures, la graisse peut être déterminée en pesant la quantité de graisse.

Les échantillons sont enrichis au  $^{13}\text{C}$  étalons internes (IS). Pour l'analyse des PCB, ajouter le mélange  $^{13}\text{C}$  PCB-IS et pour l'analyse des PCDD/PCDF, ajouter le mélange  $^{13}\text{C}$  PCDD/PCDF-IS. Si les deux PCB et PCDD/PCDF sont à analyser, ajouter les étalons internes aux échantillons homogénéisés. La concentration et le volume des étalons internes ajoutés sont déterminés par le chimiste et dépendent des niveaux prévus dans les échantillons. Les congénères à analyser sont décidés par le client d'un commun accord avec le chimiste.

#### Emballage de la colonne multicouche

Utiliser une colonne en verre dont la taille est déterminée par celle de l'échantillon. Placer d'abord une petite quantité de laine de verre au fond de la colonne pour retenir les gels. Laver les colonnes avec de la laine de verre à l'éthanol, au *n*-hexane et au dichlorométhane, dans cet ordre. Remplir la colonne de 3 cm d'hydroxyde de potassium-gel de silice (KOH), de 0,5 cm de gel de silice neutre et de 3 cm de 40% d'acide sulfurique-gel de silice, de 1,5 cm de 20% d'acide sulfurique-gel de silice, de 1 cm de gel de silice neutre et de 1 cm de sulfate de sodium anhydre. La colonne ainsi préparée est lavée à l'aide de *n*-hexane avec un volume deux fois supérieur à la hauteur de la colonne. Ensuite, l'extrait pur obtenu à partir de la détermination de la graisse est dissous dans environ 5 ml de *n*-hexane et ajouté à la colonne.

#### Elution

Les analytes sont extraits par un volume de *n*-hexane 4 fois supérieur à la hauteur de la colonne dans une fiole en verre.

#### Évaporation

Les extraits sont ensuite évaporés dans l'évaporateur rotatif jusqu'à ce que 1 ml de l'extrait persiste. Si l'extrait est destiné à l'analyse des PCB, il est transféré à des flacons ambrés de 8 ml et évaporé sous azote jusqu'à ce qu'il n'en reste que 25 l  $\mu$ . Après l'évaporation, les extraits sont transférés à des flacons GC contenant un mélange de PCB étalon de récupération marqué au Carbone 13. Voir la DL

MI 1g pour des instructions détaillées concernant l'enrichissement des échantillons et la pesée des étalons. Les flacons doivent être stockés dans un congélateur avant l'analyse.

#### 8.5.4 Colonne d'oxyde d'aluminium (colonne AlOx)

Pour le nettoyage des fractions PCB et PCDD/PCDF.

Préparation des colonnes  
L'Alumina, l'Alumina B Super 1, ICN, est utilisé comme adsorbant dans la colonne en verre de 50 ml. Placer d'abord une petite quantité de laine de verre au fond de la colonne afin de retenir l'adsorbant. Ensuite, laver les colonnes à l'éthanol, au *n*-hexane et au dichlorométhane, dans cet ordre, et remplir avec 9 g d'oxyde d'aluminium et 3 g de sulfate de sodium anhydre sur le dessus. Les colonnes remplies sont ensuite lavées avec 20 ml de *n*-hexane. L'extrait à purifier est chargé sur la colonne. Rincer et laver le récipient de l'échantillon avec 3 pipettes *n*-hexane, et charger la "solution de nettoyage" dans la colonne.

#### Élution

Éluer la fraction PCB planaire avec 70 ml de *n*-hexane/dichlorométhane (49:1) dans une autre fiole en verre. Ajouter 25 µl de tétradécane dans la fiole recevant la fraction PCB planaire avant l'élution des composés cibles et garder le ballon contenant la fraction PCB scellé par un bouchon en verre. Les dioxines sont éluées avec 100 ml de *n*-hexane /dichlorométhane (1:1) dans une autre fiole en verre.

#### Évaporation

La fraction de dioxine est évaporée à 1 ml à l'aide d'un évaporateur rotatif. L'extrait concentré est ensuite ajouté à la colonne de carbone pour un meilleur nettoyage.

#### 8.5.5 Colonne de carbone

Pour une séparation supplémentaire de la fraction planaire et non planaire:

Utiliser des colonnes en verre de 25 ml au diamètre intérieur d'environ 14mm. Placer une petite quantité de laine de verre au fond de la colonne afin de retenir le mélange de carbone. La colonne en verre avec la laine de verre est rincée à l'éthanol, au *n*-hexane et au dichlorométhane, en séries. Remplir la colonne d'un mélange de 1,5 grammes de carbone-célite et ajouter 1 cm environ de sulfate de sodium anhydre au-dessus. La colonne de carbone doit être préparée juste avant l'utilisation. Il faut la rincer au *n*-hexane correspondant à deux fois la hauteur de la colonne de carbone, avant l'utilisation. Il est maintenant possible d'ajouter l'échantillon (de préférence, dans du *n*-hexane)

Pour éluer le PCB non planaire, utiliser 7 ml de *n*-hexane (si on a appliqué beaucoup *n*-hexane sur l'échantillon, utiliser un peu moins de volume, essayer de rincer le flacon avec environ 3 ml de *n*-hexane et éluer avec les 7 ml résiduels). Pour éluer les PCDD/PCDF, ajouter 90 ml de toluène.

#### 8.5.6 Évaporateur rotatif

Respecter les paramètres suivants pour l'évaporation des solvants:

Solvant	Température	Pression
Dichlorométhane	39 °C	1000 mbar
<i>n</i> -hexane	45 °C	340 mbar

Toluène	45 °C	80 mbar
---------	-------	---------

### 8.5.7 Description de la méthode alternative–Cape Technologies

- Utiliser une colonne de silice par échantillon. Lever les scellés aux deux extrémités, puis fixer la colonne à l'un des supports. Ajouter 10 ml de dichlorométhane à la colonne, suivis de 30 ml d'hexane, et laissez s'écouler à travers la colonne.
- Lorsque l'hexane s'écoule de la colonne, rincer la partie extérieure de l'extrémité la colonne avec de l'hexane pour la nettoyer.
- Retirer la colonne de carbone, maintenir la surface droite de coupe vers le haut et remplir d'hexane la colonne de carbone. Fixer la colonne de carbone sur la pointe de la colonne de silice. ATTENTION! Les bulles d'air ne sont pas autorisées dans le système!
- Ajouter quelques ml d'hexane à la colonne de silice pour être absolument sûr que la silice soit couverte d'hexane. ATTENTION! La silice ne doit jamais être sèche!
- Mettre le système sous pression de 0,5 bar à 0,7 bar environ. L'hexane va alors s'écouler dans le système à une vitesse de 0,5 à 2 ml / min. Relâchez la pression lorsque l'hexane est d'environ 1 cm au-dessus de la silice.
- Retirer l'équipement de pressurisation.
- Rincer l'intérieur de la colonne de silice avec environ 2 ml d'hexane. Transférer l'échantillon à la colonne de silice. Rincer à nouveau l'intérieur de la colonne de silice avec environ 2 ml d'hexane.
- Mettre le système sous pression et forcer l'échantillon et l'hexane dans la silice. Relâcher la pression lorsque l'hexane est juste au-dessus de la surface de la silice. ATTENTION! La silice ne doit jamais sécher! Si elle sèche, la mettre aux déchets!
- Ajouter 10 ml d'hexane à la colonne de silice. Mettre le système sous pression. ATTENTION! La silice ne doit jamais être sèche! Ajouter une nouvelle dose de 10 ml d'hexane à la colonne de silice. Mettre le système sous pression. ATTENTION! La silice ne doit jamais sécher!
- Ajouter 10 ml d'hexane à la colonne de silice. Mettre le système sous pression. Continuer jusqu'à ce que le niveau d'hexane atteigne la silice neutre, 1-2 cm environ au-dessus. ATTENTION! L'hexane doit passer à travers la silice acide, mais la colonne de carbone ne doit pas sécher! Fraction 1 (mettre aux déchets ou analyses PCB)
- Déplacer la colonne de carbone et la fixer avec la coupe droite vers le haut sur une colonne vide et propre.
- Ajouter 5 ml d'hexane et mettre le système sous pression. Fraction 1 PCB ou mettre aux déchets. Ajouter 5 ml d'hexane: dichlorométhane (15:85) et mettre le système sous pression. Fraction 1 PCB ou mettre aux déchets. Laisser le niveau baisser juste au-dessus de l'extrémité supérieure de la colonne vide. ATTENTION! La colonne de carbone ne doit pas sécher!
- Retirer la colonne de carbone et tourner l'incision oblique vers le haut et fixer à nouveau sur la colonne vide.
- Ajouter 50 ml de toluène et mettre le système sous pression. Fraction 2 (PCDD/PCDF et dl-PCB)

## 9 ANALYSES INSTRUMENTALES

Prière de noter que les paramètres de gradient et de MS dépendent du système GC-MS et du type de colonnes utilisé. Ces paramètres doivent être optimisés pour les instruments et les colonnes internes.

- Installer la colonne d'analyse;
- Régler le MS. Si le réglage ne fonctionne pas, la source doit être nettoyée;
- Vérifier le système en effectuant un contrôle signal-bruit pour chaque PCDD/PCDF et dl-PCB en injectant la solution d'étalonnage avec la plus faible concentration;
- Elaborer une méthode dans le logiciel pour analyser les PCDD/PCDF et les dl-PCB. Les paramètres d'identification et de détection sur un CGHR/HRMS figurent au tableau 2;
- Placer tous les flacons contenant les extraits, les blancs et les solutions d'étalonnage dans le plateau de l'échantillonneur automatique;
- Préparer une séquence dans l'ordinateur; les solutions d'étalonnage, le blanc, le matériel de référence; et les échantillons;
- Commencer la séquence.

Tableau 4: Paramètres d'analyse des PCDD/PCDF et dl-PCB sur un HRGC/HRMS

Colonne:	Colonne capillaire, 30 m (0.25 mm i.d., 25 $\mu$ m) DB-5MS colonne (Agilent J&W Scientific; Folsom, CA, États-Unis ).
Volume d'injection:	1 $\mu$ L
Mode d'injection:	Splitless
Gaz porteur:	Hélium
Débit initial nominal:	1.0 ml/min

## 10 QUANTIFICATION

Pour analyser les PCDD / PCDF, on utilise normalement la chromatographie en phase gazeuse à haute résolution et les techniques de spectrométrie de masse à haute résolution. Ces techniques sont utilisées car elles assurent une sélectivité suffisante pour distinguer les PBDD/PCDF d'autres composés halogénés. L'OMS (1998) résume les critères proposés pour la détection et la quantification des PCDD/ PCDF comme suit:

- Le temps de rétention /RI doit être correct pour cet analyte (les étalons sont nécessaires).
- La récupération de l'étalon "de substitution" doit se situer dans une fourchette de 40% à 120%.
- Tous les m/z examinés pour un analyte donné doivent être maximisés simultanément à  $\pm 1$  seconde, avec pour chacun un rapport signal-bruit supérieur ou égal à 2,5. Le cluster  $M^{+*}$  est relativement intense pour l'ensemble des congénères. Pour confirmation, il faudrait suivre deux ions additionnels (m/z) en spectrométrie de surveillance de masse de l'impact des électrons sur des ions sélectionnés (EI-SIM-MS).
- Le ratio entre les deux ions du cluster  $M^{+*}$  doit se situer dans les 20% (relatifs) du ratio théorique.

Pour l'identification et la quantification, il existe des logiciels disponibles, notamment MassLynx, Chemstation, Masshunter, etc.

Utiliser le logiciel pour identifier les pics cibles des chromatogrammes GC/MS sur la base du temps de rétention (TR) et de la transition  $m/z$  (voir Tableau 5 pour les paramètres de détection et quantification des PCDD/PCDF et dl-PCB et après la séparation).

Utiliser les surfaces des pics de ces pics dans les solutions d'étalonnage pour dessiner une courbe d'étalonnage de chacun des composés cibles. Comparer les surfaces des pics et les temps de rétention des pics dans la solution d'étalonnage avec ceux des pics dans les échantillons et calculer les concentrations.

Tableau 5: Paramètres GC/MS pour séparation PCDD/PCDF et dl-PCB dans une colonne Agilent DB-5MS.

Composé	Description	Cible m/z	Qualificatif m/z	Utilisation numéro IS	
2,3,7,8-TCDD	Composé cible	319.8965	321.894	9	
1,2,3,7,8-PnCDD	Composé cible	355.8546	353.8576	10	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	Composé cible	389.816	391.813	11	
1,2,3,6,7,8-HxCDD	Composé cible	389.816	391.813	11	
1,2,3,7,8,9-HxCDD	Composé cible	389.816	391.813	12	
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	Composé cible	423.777	425.774	13	
OCDD	Composé cible	457.738	459.735	1	
2,3,7,8-TCDF	Composé cible	303.9016	305.899	2	
1,2,3,7,8-PnCDF	Composé cible	339.860	341.857	2	
2,3,4,7,8-PnCDF	Composé cible	339.860	341.857	3	
1,2,3,4,7,8-HxCDF	Composé cible	373.821	375.818	4	
1,2,3,6,7,8-HxCDF	Composé cible	373.821	375.818	5	
2,3,4,6,7,8-HxCDF	Composé cible	373.821	375.818	5	
1,2,3,7,8,9-HxCDF	Composé cible	373.821	375.818	6	
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	Composé cible	407.782	409.779	6	
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	Composé cible	407.782	409.779	7	
OCDF	Composé cible	441.743	443.740	7	
Composé	Description	Cible m/z	Qualificatif m/z	Numéro IS	Utilisation numéro IS
2,3,7,8-TCDD	IS	333.9339	331.9368	8	RS1
1,2,3,7,8-PnCDD	IS	367.895	369.8919	9	RS1
1,2,3,4,7,8-HxCDD	IS	401.856	403.853	10	RS2
1,2,3,6,7,8-HxCDD	IS	401.856	403.853	11	RS2
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	IS	435.817	437.814	12	RS2
OCDD	IS	469.778	471.775	13	RS2
2,3,7,8-TCDF	IS	317.9389	333.9339	1	RS1
2,3,4,7,8-PeCDF	IS	351.900	353.8970	2	RS1
1,2,3,4,7,8-HxCDF	IS	385.8610	383.8639	3	RS2
1,2,3,6,7,8-HxCDF	IS	385.8610	383.8639	4	RS2
2,3,4,6,7,8-HxCDF	IS	385.8610	383.8639	5	RS2
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	IS	419.8220	417.8250	6	RS2
OCDF	IS	455.7801	453.7830	7	RS2
Composé	Description	Cible m/z	Qualificatif m/z	Numéro RS	
1,2,3,4-TCDD	RS	333.9339	331.9368	RS1	
1,2,3,7,8,9-HxCDD	RS	401.856	403.853	RS2	

Composé	Description	Cible m/z	Qualificatif m/z
PCB 81	Composé cible	291.9194	289.9224
PCB 77	Composé cible	291.9194	289.9224
PCB 105	Composé cible	325.8804	327.8775
PCB 114	Composé cible	325.8804	327.8775
PCB 118	Composé cible	325.8804	327.8775
PCB 123	Composé cible	325.8804	327.8775
PCB 126	Composé cible	325.8804	327.8775
PCB 156	Composé cible	359.8415	361.8385
PCB 157	Composé cible	359.8415	361.8385
PCB 167	Composé cible	359.8415	361.8385
PCB 169	Composé cible	359.8415	361.8385
PCB 189	Composé cible	393.8025	395.7995
PCB 77	IS	303.9597	301.9626
PCB 126	IS	337.9207	339.9178
PCB 169	IS	371.8817	373.8788
1,2,3,4-TCDD	RS	333.9339	331.9368
1,2,3,7,8,9-HxCDD	RS	401.856	403.853

## 11 ASSURANCE QUALITE (AQ)/CONTROLE DE QUALITE (CQ)

Pour des raisons de contrôle de la qualité, inclure un blanc, un double de l'échantillon et un matériau de référence interne pour chaque série de 12 échantillons maximum. Il est vivement recommandé de participer régulièrement à des études inter-laboratoires et d'analyser les matériaux de référence certifiés (MRC) afin d'assurer la qualité des analyses.

## 12 REFERENCES

PNUE (2013): Document d'orientation sur le Plan mondial de suivi sur les polluants organiques persistants. PNUE/POPS/COP.6/INF/31, 4 février, accessible au site [www.pops.int](http://www.pops.int)

EPA 1613 accessible au site <http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/organics/dioxins/index.cfm>

EPA 1668 accessible au site

[http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/bioindicators/upload/2009\\_01\\_07\\_methods\\_méthode\\_1668.pdf](http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/bioindicators/upload/2009_01_07_methods_méthode_1668.pdf),

EN 1948 accessible au site

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/analscisp/17icas/0/17icas\\_0\\_i551/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/analscisp/17icas/0/17icas_0_i551/_pdf)

Cape Technologies Method <http://www.dioxin20xx.org/pdfs/2010/10-1694.pdf>