

ANALYSE DE SUBSTANCES PRIORITAIRES DANS LES EAUX

EVALUATION DES POSSIBILITES DE LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE COUPLEE A
LA SPECTROMETRIE DE MASSE EN TANDEM ASSOCIEE A DIFFERENTES TECHNIQUES
D'EXTRACTION POUR L'ANALYSE DES ALKYLPHENOLS, ALKYLPHENOLS POLYETHOXYLES
A COURTES CHAINES, BISPHENOL A ET TRICLOSAN

Action I-A-02 : Amélioration des méthodes d'analyses

O. Diago, F. Lestremau
Janvier 2011

Programme scientifique et technique
Année 2010

Document final

Contexte de programmation et de réalisation

Ce rapport a été réalisé dans le cadre du programme d'activité AQUAREF pour l'année 2010 dans le cadre du partenariat ONEMA - Aquaref 2010, au titre de l'action 11-2.

Auteur(s) :

Olivier Diago
INERIS
olivier.diago@ineris.fr

François Lestremau
INERIS
francois.lestremau@ineris.fr

Vérification du document :

Séverine Schiavone
Cemagref
severine.schiavone@cemagref.fr

Sophie Lardy-Fontan
LNE
sophie.lardy-fontan@lne.fr

Les correspondants

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

Référence du document : François Lestremau, Olivier Diago - évaluation des possibilités de la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem associée à différentes techniques d'extraction pour l'analyse des alkylphénols, alkylphénols polyéthoxylés à courtes chaînes, bisphénol a et triclosan - Rapport AQUAREF 2010 - 24p.

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

1. GLOSSAIRE	8
2. CONTEXTE	8
3. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE SUR L'ANALYSE DES COMPOSÉS CIBLES PAR LC/MS	9
3.1 Alkylphénols et éthoxylats d'alkylphénols (AP et APEO)	9
3.2 Bisphénol A	10
3.3 Tétrabromobisphénol A (TBBPA)	10
3.4 Triclosan	10
3.5 SPE en ligne	11
4. OBJECTIF	11
5. MATÉRIELS ET MÉTHODES	12
5.1 Composés cibles et échantillons	12
5.2 Instrumentation chromatographique	13
5.3 Analyse par injection LC/MS ²	13
5.4 Analyse par SPE en ligne-LC/MS ²	14
6. RESULTATS	14
6.1 Optimisation des paramètres d'ionisation et de collision des composés étudiés.....	14
6.2 Caractérisation de la méthode LC/MS ² avec injection directe.....	15
6.3 Caractérisation de la méthode SPE en ligne LC/MS ²	17
6.4 Comparaison des méthodes analytiques et perspectives	19
7. CONCLUSION - PERSPECTIVES	21
8. LISTE DES ANNEXES	24

Liste des annexes :

- Annexe 1 : Structure chimique des composés cibles,
Annexe 2 : Paramètres d'acquisition du spectromètre de masse,
Annexe 3 : Conditions chromatographiques en injection directe,
Annexe 4 : Principe du système de pré concentration en ligne SPE,
Annexe 5 : Méthode chromatographique par injection avec préconcentration SPE,
Annexe 6 : Exemples de droites d'étalonnage en injection directe-LC/MS²,
Annexe 7 : Exemple de droites d'étalonnage des composés cibles par préconcentration SPE en ligne-LC/MS²,
Annexe 8 : Données brutes des droites d'étalonnage des composés cibles par préconcentration SPE en ligne-LC/MS².

EVALUATION DES POSSIBILITES DE LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE EN TANDEM ASSOCIEE A DIFFERENTES TECHNIQUES D'EXTRACTION POUR L'ANALYSE DES ALKYPHENOLS, ALKYLPHENOLS POLYETHOXYLES A COURTES CHAINES, BISPHENOL A ET TRICLOSAN

F. LESTREMAU

RESUME

La possibilité d'analyser par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (triple quadrupôle = LC/MS/MS) les alkylphénols (APs), éthoxylats d'alkylphénols (APEOs), bisphénol A (BPA) et triclosan a été étudiée. L'étude visait à évaluer les limites de quantification atteignables en injection directe afin d'éviter l'étape d'extraction/concentration/dérivation d'échantillon nécessaire à l'analyse par chromatographie en phase gazeuse.

Afin de pouvoir atteindre des niveaux de quantification plus performants, un dispositif comprenant une SPE en ligne couplée à la LC/MS/MS a été utilisé. Les résultats déterminés indiquent que les limites de quantification obtenues par cette approche sont insuffisantes par comparaison à celles de la norme ISO 18857-2 : 2009 par extraction SPE associée à la GC/MS.

Mots clés (thématique et géographique) :

alkylphénols ; alkylphénols polyéthoxylés ; bisphénol A ; triclosan ; LC/MS ; SPE en ligne; limite de quantification ;

FEASIBILITY OF USING LIQUID CHROMATOGRAPHY COUPLED TO QUADRUPOLE MASS SPECTROMETRY FOR THE ANALYSIS OF NONYLPHENOL AND RELATED COMPONENTS (NONYLPHENOL (NP)/ NONYLPHENOL ETHOXYLATES (NPOE), BISPHENOL A, TRICLOSAN)

F. LESTREMAU

ABSTRACTS

The evaluation of analysing nonylphenol and related components (alkylphenol (AP)/ alkylphenol ethoxylates (APOE), bisphenol A, Triclosan) by liquid chromatography coupled with quadrupole mass spectrometry (LC/MS/MS) has been carried out. This study aimed to establish the quantification limit that could be reached with direct sample injection to avoid the extraction/concentration/derivatisation step required to complete the analysis by gas chromatography.

To obtain better detection level of target compounds, on-line SPE directly coupled to the LC/MS/MS was used. Determined results indicate quantification limits obtained by this approach could not reached those achieved with norme ISO 18857-2:2009 using SPE extraction and GC/MS analysis.

Key words (thematic and geographical area) :

alkylphenol,alkylphenol polyethoxylates, bisphenol A, triclosan, LC/MS, on-line SPE, LQ

PRÉAMBULE




Le présent rapport a été établi sur la base des informations fournies à l'INERIS, des données (scientifiques ou techniques) disponibles et objectives et de la réglementation en vigueur.

La responsabilité de l'INERIS ne pourra être engagée si les informations qui lui ont été communiquées sont incomplètes ou erronées.

Les avis, recommandations, préconisations ou équivalent qui seraient portés par l'INERIS dans le cadre des prestations qui lui sont confiées, peuvent aider à la prise de décision. Etant donné la mission qui incombe à l'INERIS de par son décret de création, l'INERIS n'intervient pas dans la prise de décision proprement dite. La responsabilité de l'INERIS ne peut donc se substituer à celle du décideur.

Le destinataire utilisera les résultats inclus dans le présent rapport intégralement ou sinon de manière objective. Son utilisation sous forme d'extraits ou de notes de synthèse sera faite sous la seule et entière responsabilité du destinataire. Il en est de même pour toute modification qui y serait apportée.

L'INERIS dégage toute responsabilité pour chaque utilisation du rapport en dehors de la destination de la prestation.

	Rédaction	Vérification	Approbation
NOM	F. LESTREMAU	M.P. STRUB	N. ALSAC
Qualité	Ingénieur à l'Unité « Innovation pour la mesure » Direction des Risques Chroniques	Ingénieur au Pôle « Caractérisation de l'Environnement » Direction des Risques Chroniques	Responsable du Pôle « Caractérisation de l'Environnement » Direction des Risques Chroniques
Visa			

1. Glossaire

AP :	Alkylphénols
APCI :	Ionisation chimique à pression atmosphérique (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation)
APEO :	Ethoxylats d'alkylphénols
BPA :	Bisphénol A
ESI :	Ionisation par électrospray
ES+ :	Ionisation par électrospray en mode positif
ES- :	Ionisation par électrospray en mode négatif
GC/MS :	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
HPLC/MS :	Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse
HPLC/MS/MS :	Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
LAS :	Alkylbenzènesulfonate à chaîne linéaire (Linear Alkyl Sulfonates)
LD :	Limite de détection
LQ :	Limite de quantification
MRM :	Suivi d'ions multiples (Multiple Reaction Monitoring)
NP :	4-nonylphénol technique
NPEO	Nonylphénols éthoxylates
NP ₁ EO :	4-nonylphénol monoéthoxylate technique
NP ₂ EO :	4-nonylphénol diéthoxylate technique
OP :	4-tert-octylphénol
OP ₁ EO :	4-tert-octylphénol monoéthoxylate
SPE :	Extraction sur phase solide (Solid Phase Extraction)
TBBPA :	Tétrabromobisphénol A

2. Contexte

Ces substances (nonylphénol (NP)/ éthoxylats de nonylphénol (NPEO)/ 4-tert-octylphénol/bisphénol A (BPA)/ tétrabromobisphénol A TBBPA/ triclosan), toutes de la famille des phénols, sont largement répandues dans les produits de consommation et sont, pour certaines, l'objet d'une attention médiatique particulière : le bisphénol A comme additifs de certaines matières plastiques, le triclosan, très utilisé dans les produits d'hygiène corporelle et souligné dans une étude bibliographique de 2009 [1].

Les nonylphénols mais essentiellement les éthoxylats de nonylphénols sont utilisés dans de très nombreux secteurs d'activité : fabrication de résines, de polymères, de peintures, de composants électriques et électroniques, de produits phytosanitaires, vétérinaires, activités diverses de formulation,... Les nonylphénols et les éthoxylats de nonylphénol ont fait l'objet d'une interdiction d'emploi et de mise sur le marché pour certains de leur usage (directive 2003/53/Ce du 18 juin 2003). Cependant, les éthoxylats de nonylphénol ont encore, comme les LAS, des applications industrielles (détergence, émulsions...). Leur caractère tensio-actif laisse supposer leur présence dans plusieurs compartiments (eaux (fraction dissoute et MES), boues, sédiments), où ils constituent un réservoir de nonylphénols libérés par dégradation biotique et abiotique de la chaîne éthoxylée.

Les 4-nonylphénols et 4-tert-octylphénol ont été classés substances prioritaires selon la DCE.

Pour plus d'informations, l'INERIS a publié un rapport de données technico-économiques sur les nonylphénols et éthoxylats de nonylphénols [2].

Le bisphénol A est une substance exclusivement anthropique. Il est utilisé comme monomère dans la production des polycarbonates ou précurseur pour la fabrication d'autres polymères. Ces polycarbonates sont utilisés pour des produits de consommation courante notamment biberon et matériaux plastiques. Le bisphénol A est, de ce fait, fréquemment retrouvé dans l'environnement et reconnu comme perturbateur endocrinien. A ce jour, il n'est cependant pas réglementé au niveau de l'environnement.

Le triclosan est utilisé comme agent fongicide ou bactérien et retrouvé dans des produits de consommation comme le savon, les déodorants et les dentifrices. Il est également soupçonné d'être un perturbateur endocrinien.

Enfin, le tetrabromobisphénol A (TBBPA), et ses dérivés sont principalement utilisés dans l'industrie de l'électronique (principalement dans les cartes de circuits imprimés) et dans les polymères de styrène. Le TBBPA représente environ la moitié de la consommation de tous les retardateurs de flamme. Bien que non réglementé à l'heure actuelle, le TBBPA fait l'objet d'une évaluation des risques conformément au règlement (CEE) no 793/93, pour laquelle il est inscrit sur la quatrième liste prioritaire. De plus, sa dégradation peut générer du bisphénol A.

3. Synthèse bibliographique sur l'analyse des composés cibles par LC/MS

3.1 Alkylphénols et éthoxylats d'alkylphénols (AP et APEO)

Une synthèse bibliographique a été rédigée récemment dans le cadre du programme d'activité AQUAREF et du partenariat ONEMA – Cemagref sur les méthodes d'analyse de l'octylphénol et du nonylphénol dans les biotes et les sédiments [3]. Concernant les techniques chromatographiques, il apparaît que le GC/MS a été employé 12 fois sur 17 sur les sédiments (3 pour la LC/MS/MS) et 10 fois sur 15 sur l'analyse des biotes (3 LC/MS et 1 LC/MS/MS).

Quelques revues ont été consacrées à l'analyse des nonylphénols et des éthoxylates notamment dans l'eau [4,5]. L'analyse en LC/MS ou LC/MS/MS est ainsi particulièrement répandue pour les éthoxylats. Cette observation doit être cependant pondérée car la popularité des analyses en LC/MS peut être notamment attribuée au fait que des éthoxylats avec plus de 4 unités éthoxys étaient analysés simultanément. Au delà de ce niveau de groupe éthoxys, les éthoxylats ne sont plus suffisamment volatils et ne peuvent donc plus être analysés de manière fiable par GC/MS, la LC devenant ainsi, par défaut, la seule technique chromatographique réellement envisageable.

Pour l'analyse des alkylphénols et de leurs éthoxylats avec seulement 1 ou 2 unités éthoxys, l'analyse par GC/MS semble la plus répandue.

En chromatographie en phase liquide, la séparation des alkylphénols (AP) et leurs éthoxylates (AP_nEO_s) est généralement réalisée en phase inverse avec une colonne hydrophobe (type C_{18}) et du méthanol en tant que solvant. Par cette technique, la séparation des AP et des $AP_{1-2}EO$ est généralement satisfaisante [5].

Un large pic est obtenu par famille de composés (1 pic unique pour les NP, 1 pour les NP₁EO,..) car les techniques analytiques employées ne permettent pas la séparation individuelle des nombreux isomères présents dans un même échantillon. La LC peut cependant être suffisamment résolutive pour séparer l'isomère linéaire des isomères ramifiés ce qui peut être important dans le contexte de surveillance.

Le séparation chromatographique est importante car c'est un prérequis à la qualité de l'analyse notamment par si on considère les effets matrices qui peuvent survenir au niveau de l'ionisation en LC/MS. La coelution de pic d'intérêt n'est cependant pas totalement limitative lorsque des détecteurs spécifiques de types MS sont utilisés car des ions caractéristiques peuvent être identifiés et suivis pour la détection et quantification d'un composé particulier.

Une étude exhaustive a été consacrée à l'ionisation de ces composés par LC/MS/MS [6]. Dans ces travaux, NP et OP produisent des ions [M-H]⁻ en mode négatif. En LC/MS, les NP_nEO se recombinaient souvent avec des ions sodium (fréquemment présent en tant que « contamination » dans les systèmes chromatographiques et dans la verrerie) pour former des adduits [M+Na]⁺. Des études [7,8] ont ainsi suggéré l'ajout de sels de sodium pour les analyses quantitatives afin de favoriser une formation stable d'ion [M+Na]⁺, due à l'affinité des NP_nEO_s pour ce cation. Dans tous les cas il est déconseillé de travailler sur des adduits sodium pour les mesures quantitatives, la stabilité de ces ions étant telle que très peu de fragmentation est obtenue dans la cellule de collision, et donc des transitions peu intenses. Pour les analyses par détection en mode MS/MS, les sels d'ammonium sont donc généralement préférés pour ce mode d'analyse car des adduits [M+NH₄]⁺ seront produits, plus labiles et qui conduiront aussi à une fragmentation très reproductible [5].

Des comparaisons entre différents modes d'ionisation ont démontré que, pour les NP₁₋₂EO, des intensités de signal supérieures à 25% étaient obtenues avec une ionisation par electrospray (ESI) par rapport à une ionisation en pression atmosphérique (APCI) [9].

3.2 Bisphénol A

Une revue a été consacrée à l'analyse du bisphénol A [10]. En résumé des études dédiées à ce composé, l'analyse du bisphénol A s'effectue préférentiellement en mode négatif par ESI car une meilleure sensibilité est obtenue par rapport à l'ionisation en APCI. L'ion [M-H]⁻ est le plus abondant et utilisé pour la quantification. L'usage de méthanol permet d'obtenir une réponse supérieure à celle obtenue en présence d'acétonitrile.

3.3 Tétrabromobisphénol A (TBBPA)

Une revue s'est également intéressée aux récents développements dans l'analyse des retardateurs de flamme et une section de cet article est consacrée en particulier au TBBPA [11]. Comme pour les autres composés phénoliques suivis dans cette étude, l'utilisation de méthanol couplée avec de l'acétate d'ammonium semble donner les meilleurs résultats en terme de stabilité des ions et de sensibilité. L'utilisation en mode négatif avec une ionisation ESI génère des réponses 40 fois supérieures au mode APCI [11].

3.4 Triclosan

L'analyse du triclosan dans les matrices environnementales a été détaillée dans une revue [12]. Selon cette source, l'analyse en GC-MS est plus sensible que l'analyse en LC/MS, elle-même donnant de meilleurs résultats que la LC/MS/MS.

3.5 SPE en ligne

L'extraction par phase solide (SPE) est une méthode de pré-concentration d'échantillon. Les composés cibles contenus dans l'échantillon sont piégés sur une cartouche contenant un adsorbant. Ils sont ensuite élués par un solvant approprié avant d'être injecté dans l'appareil chromatographique. Cette dernière étape nécessite ainsi de rediluer les substances captées sur la SPE. Ainsi, seulement un faible pourcentage (généralement quelques μL sur le 1 mL d'extrait obtenu) est injecté.

La SPE en ligne permet de connecter directement la SPE à un chromatographe en phase liquide. Les composés sont piégés sur une cartouche et élués directement par la phase mobile. Ce montage évite de rediluer l'extrait car tous les polluants captés sont injectés dans la colonne LC. De plus, il peut être entièrement automatisé ce qui permet de réduire les nombreuses étapes de préparation d'échantillon effectuées en SPE (classique).

L'application de la SPE en ligne est relativement récente pour les matrices environnementales comme l'a souligné une revue dédiée à ce sujet [13]. L'analyse des nonylphénols dans l'eau avec SPE en ligne a déjà été reportée dans une étude, la détection étant cependant réalisée par ultraviolet [14].

4. Objectif

L'analyse des alkylphénols et de leurs éthoxylats s'effectue généralement en GC/MS. Deux normes relatives à la qualité de l'eau, NF EN ISO 18857-1 [15] (qui s'applique aux alkylphénols) et ISO 18857-2 [16] (qui inclut également leurs éthoxylats ainsi que le bisphénol A), adoptent également l'analyse par GC/MS.

Les limites de quantification décrites dans la norme ISO 18857-2 :2009 relatives à la détermination des alkylphénols, de leur éthoxylats et du bisphénol A par GC /MS pour les eaux de surface sont présentées ci-dessous.

Tableau 1. LQ définies dans la norme ISO 18857-2 :2009 pour les eaux de surface

facteur de concentration : 5000, volume d'injection : 1 μL

Molécules Cibles	LQ ($\mu\text{g/L}$)
4-nonylphénol technique	0,03
4-nonylphénol technique monoéthoxylate	0,03
4-nonylphénol technique diéthoxylate	0,03
4-tert-octylphénol	0,005
4-tert-octylphénol monoéthoxylate	0,005
Bisphénol A	0,05
Tétrabromobisphénol A	nd
Triclosan	nd

nd : non défini dans la norme

Les analyses en GC (selon la norme ISO 18857-2 : 2009) nécessitent cependant une étape de préparation d'échantillon car les composés doivent d'abord être extraits sur cartouche SPE avant d'être concentrés puis dérivés avant injection dans le système chromatographique.

Le but de l'étude consistait à effectuer des tests de faisabilité pour l'analyse des molécules sélectionnées en injection directe par chromatographie en phase liquide couplée avec une détection en spectrométrie de masse (MS), particulièrement en mode MS/MS, ceci afin de s'affranchir des étapes fastidieuses de préconcentration d'échantillon.

Plus précisément, l'objectif principal était de déterminer si de meilleures performances que celles obtenues en GC/MS (présentées dans le tableau ci-dessus) pouvaient être atteintes. De plus, l'objectif secondaire était de déterminer si les exigences de la directive QA/QC concernant les limites de quantification à NQE/3 pour les polluants prioritaires de la DCE pouvaient être satisfaites.

Tableau 2. NQE et NQE/3 définis en eaux de surface pour certains composés cibles

Molécules Cibles	NQE (µg/L)	NQE/3 (µg/L)
4-nonylphénol technique	0,3	0,1
4-tert-octylphénol	0,1	0,03

5. Matériels et méthodes

5.1 Composés cibles et échantillons

Huit composés ou familles de composés ont été choisis comme composés cibles. Ils ont tous en commun de posséder des groupements phénols (tableau 3).

Tableau 3. Listes des composés considérés

	Formule	Acronyme	N° Cas	Code Sandre
4-nonylphénol technique	C15H24O	NP	84852-15	1958
4-nonylphénol monoéthoxylate technique	C17H28O2	NP1EO	26027-38-3	6366
4-nonylphénol diéthoxylate technique	C19H32O3	NP2EO	15609-10-8	2875
4-tert-octylphénol	C14H22O	OP	140-66-9	1959
4-tert-octylphénol monoéthoxylate	C16H26O2	OP1OE	2315-67-5	6370
Bisphénol A	C15H16O2	BPA	80-05-7	2766
Tétrabromobisphénol A	C15H16 Br4O2	TBBPA	79-94-7	6657
Triclosan	C12H7 Cl3O2		3380-34-5	5430

Une solution technique désigne un mélange d'isomères de position et de ramification de la chaîne carbonée.

La structure chimique de ces composés peut être retrouvée en annexe 1

Une solution mère contenant tous les nonylphénols et certains composés apparentés à une concentration de 1 µg/mL dans l'acétone pour les OP, OP₁OE, BPA et 5 µg/mL pour le NP, NP1EO, NP2EO (fournie par Sigma Aldrich) a été utilisée. Les solutions de TBBPA et de triclosan ont été préparées par gravimétrie à partir d'étalons individuel sous format poudre (Sigma Aldrich) (concentration solutions mères : 1g/L dans l'eau).

Pour les injections directes, chaque solution fille était préparée par dilution appropriée de la solution mère avec de l'eau MilliQ (non tamponnée).

Pour les analyses avec SPE en ligne, les solutions filles étaient préparées par dilution dans l'eau d'Evian®.

5.2 Instrumentation chromatographique

Toutes les analyses ont été effectuées en utilisant un chromatographe en phase liquide Alliance HT 2795 (Waters) équipé d'une pompe quaternaire, d'un injecteur avec une boucle d'injection de 20 µl et d'un four. Les analytes étaient détectés par un spectromètre de masse triple quadrupôle TQD Acquity® (Waters) équipé d'une vanne 4-positions et d'un pousse seringue permettant d'effectuer des infusions. Toutes les expériences ont été effectuées avec une source ESI (electrospray), l'étude bibliographique ayant souligné que de meilleures performances étaient obtenues par ce mode d'ionisation par rapport au mode APCI.

L'appareil chromatographique et le détecteur étaient contrôlés par le logiciel Masslynx® (Waters).

Les paramètres de fonctionnement détaillés du spectromètre de masse peuvent être retrouvés en annexe 2.

5.3 Analyse par injection LC/MS²

D'après la littérature [5,10,11,12], ces différents composés sont analysés avec des conditions chromatographiques proches. Généralement, une colonne chromatographique hydrophobe de type C18 est utilisée, la majorité des composés étant dotés de longues chaînes alcanes. Ceci entraîne beaucoup d'interactions (et une forte rétention) avec ce type de phase stationnaire. La phase mobile était constituée de méthanol et d'ammonium acétate qui favorise la détection des éthoxylats d'alkylphénols notamment par la formation d'adduits ammonium.

La séparation chromatographique entre les différents composés étudiés doit accepter certains compromis : en effet, la plupart des analytes sont des mélanges techniques. Une optimisation de la séparation permettra d'éluer les différents composants d'un mélange technique. Pour prendre un exemple, un gradient spécifiquement développé sur un mélange technique de nonylphénol permettra d'obtenir une empreinte avec les différents isomères partiellement séparés (une trace généralement observée en GC/MS).

Le désavantage de cette élution réside dans l'élargissement de la trace chromatographique, abaissant ainsi la hauteur des pics et réduisant les limites de détection.

Une « mauvaise » séparation de ces isomères permet d'obtenir un pic unique et peut ainsi potentiellement conduire à une limite de détection améliorée.

Le gradient a ainsi été développé dans cette optique en privilégiant une élution chromatographique en pic unique pour les mélanges isomères. La séparation des mélanges techniques étudiés est donc partiellement accomplie, ce qui peut être avantageux par rapport à une analyse par GC/MS où les isomères sont eux, partiellement séparés. Dans ce dernier cas, l'intégration doit s'effectuer sur un ensemble de pics souvent difficiles à distinguer du bruit de fond aux valeurs de LQ ou avec des interférences matricielles importantes, ce qui nécessite une certaine expertise).

Les OP, OP₁OE, BPA, TBBPA et le triclosan éluent en pic unique et sont donc aisément intégrables.

Les conditions chromatographiques sont détaillées en annexe 3.

5.4 Analyse par SPE en ligne-LC/MS²

En vue d'améliorer les limites de quantification, une méthode de pré-concentration SPE en ligne a été employée. Cette méthode implique l'utilisation de 2 vannes 6-positions (modèle EV700®, Waters) disposées entre l'injecteur et la colonne chromatographique ainsi que d'une pompe isocratique (type 515® (Waters)) pour l'équilibrage de la colonne chromatographique aux conditions initiales du gradient. La cartouche SPE utilisée était une LiChrospher C8® (Merck).

Le dispositif expérimental est schématisé en annexe 4.

Les conditions d'injection et de chromatographie sont détaillées en annexe 5.

6. Résultats

6.1 Optimisation des paramètres d'ionisation et de collision des composés étudiés

Afin de déterminer les paramètres d'ionisation et d'acquisition, des tests d'infusion ont été effectués avec des solutions individuelles de 10 à 50 µg/mL préparé dans un éluant 1/1 (v/v) MeOH avec 2mM acétate d'ammonium / eau avec 2mM acétate d'ammonium pour chaque composé ou familles de composés. La vitesse du pousse seringue était de 50 µL/min.

Pour chaque composé étudié, des optimisations ont été menées pour déterminer une tension de cône optimale permettant d'obtenir une sensibilité maximale. Les ions caractéristiques de chaque composé ont été identifiés en sortie du premier quadropole.

La mise au point a été poursuivie, en mode SIM sur les ions parents déterminés précédemment, par l'optimisation des tensions de collision et le choix des ions fils générés dans le deuxième quadropole.

Comme décrit dans la littérature, une meilleure sensibilité était obtenue en mode négatif pour le NP, OP, le bisphénol A, le tétrabromobisphénol A et le triclosan.

Pour les alkylphénols éthoxylés, le mode positif a donné de meilleurs résultats, ce qui peut être expliqué, comme décrit dans la partie bibliographique, par une réaction avec l'ammonium pour donner des adduits $[M+NH_4]^+$ plus stables.

2 transitions spécifiques à chacun des composés ont été considérées, une pour un ion quantifiant (MRM 1) et l'autre pour un ion qualifiant (MRM 2).

L'appareil MS employé autorise le basculement entre les modes d'ionisation ESI positif et négatif ce qui permet l'analyse simultanée dans un même run de tous les composés considérés dans cette étude.

Tableau 4. Optimisation des paramètres d'ionisation et de collision des composés cibles

Molécules Cibles		Mode d'ionisation	Ion Père	Ion Fils	Tension de cône (V)	Tension de collision (V)
4-nonylphénol technique	MRM 1	ES-	219	148	35	15
	MRM 2	ES-	219	133	45	38
4-nonylphénol technique monoéthoxylate	MRM 1	ES+	282	71	14	15
	MRM 2	ES+	282	127	14	10
4-nonylphénol technique diéthoxylate	MRM 1	ES+	326	121	20	10
	MRM 2	ES+	326	183	20	10
4-tert-octylphénol	MRM1	ES-	205	133	49	31
	MRM 2	/	/	/	/	/
4-tert-octylphénol monoéthoxylate	MRM 1	ES+	268	113	15	10
	MRM 2	/	/	/	/	/
Bisphénol A	MRM 1	ES-	227	133	29	26
	MRM 2	ES-	227	212	24	20
Tétrabromobisphénol A	MRM 1	ES-	543	446	46	31
	MRM 2	ES-	543	448	46	31
Triclosan	MRM 1	ES-	287	35	20	10
	MRM 2	ES-	289	35	20	10

Pour le 4-tert-octylphénol et le 4-tert-octylphénol monoéthoxylate, une seule transition a pu être déterminée.

6.2 Caractérisation de la méthode LC/MS² avec injection directe

Les matrices naturelles sont dans la grande majorité des cas, contaminées en alkylphénols. Dès lors, la détermination de limite de quantification en matrice s'avère un exercice difficile dans de telles conditions.

Afin de pouvoir déterminer des niveaux de sensibilité dans le milieu aqueux, les essais préliminaires ont été effectués dans l'eau MilliQ. Les limites de quantification instrumentales ont été ainsi déterminées.

Des gammes de concentrations croissantes de chaque composé comprenant des solutions en mélange allant de 8,5 à 420 µg/L pour les 4-tert-octylphénol, 4-tert-octylphénol monoéthoxylate, bisphénol A, tétrabromobisphénol A, Triclosan et de 40 à 2100 µg/L pour le 4-nonylphénol technique, le 4-nonylphénol technique monoéthoxylate, le 4-nonylphénol technique diéthoxylate ont été injectées (20 µL) et analysés avec les paramètres décrits ci-dessus. Ces injections ont été effectuées avec une gamme d'étalon diluée dans l'eau MilliQ.

Les limites de quantification et domaine de linéarité obtenues sont décrits dans le tableau 5. Les coefficients de variation à la LQ calculés sur 10 injections dans des conditions de répétabilité sont également indiqués (5 préparations différentes injectées 2 fois).

Tableau 5. Limites de quantification et domaine de linéarité en injection directe (µg/L)

Molécules Cibles	LQ	Coefficient Variation à la LQ (%)	Domaine de linéarité jusqu'à
4-nonylphénol technique	175	26	2100
4-nonylphénol technique monoéthoxylate	43	28	2100
4-nonylphénol technique diéthoxylate	53	21	2100
4-tert-octylphénol	82	36	420
4-tert-octylphénol monoéthoxylate	19	27	420
Bisphénol A	8,5	34	420
Tétrabromobisphénol A	35	35	420
Triclosan	24	45	420

Les domaines de linéarité s'étendent de la LQ déterminées pour chaque composé jusqu'aux points de gammes hauts injectés. Des exemples de droite d'étalonnage peuvent être retrouvés en annexe 6.

Dans le cas de la norme ISO 18857-2 :2009, 1 L d'échantillon est utilisé et préconcentré. Une extraction en SPE est ainsi effectuée ce qui permet de concentrer tous les composés cibles sur le support solide. La norme préconise d'éluer les composés, d'évaporer le solvant et de les reprendre dans 200 µL de solvant (1 µL est ensuite injecté en analyse GC). Un facteur de concentration de l'échantillon de 5000 est ainsi opéré (en faisant l'hypothèse que l'on obtient 100 % de récupération pour la phase extraction).

En considérant ce facteur de concentration par rapport aux valeurs déterminées en injection directe (tableau 5), les valeurs qui pourraient être obtenues s'établissent comme dans le tableau 6.

Tableau 6. Limites de quantification calculées sur la base d'une préconcentration d'un facteur 5000 des résultats en injection directe décrits dans le tableau 5

Molécules Cibles	LQ LC/MS/MS (µg/L) (estimée)	LQ GC/MS (Cf. Tableau 1) (µg/L)
4-nonylphénol technique	0,035	0,03
4-nonylphénol technique monoéthoxylate	0,009	0,03
4-nonylphénol technique diéthoxylate	0,011	0,03
4-tert-octylphénol	0,016	0,005
4-tert-octylphénol monoéthoxylate	0,004	0,005
Bisphénol A	0,002	0,05
Tétrabromobisphénol A	0,007	nd
Triclosan	0,005	nd

nd : non défini dans la norme

Même dans les cas les plus favorables, les limites de quantification en LC/MS/MS sont au mieux identiques à celles qui peuvent être obtenus en GC/MS.

Dès lors, la détection des nonylphénols et composés apparentés par LC/MS/MS avec injection directe apparaît d'un intérêt relativement limité si elle doit nécessiter l'acquisition par le laboratoire d'un couplage LC/MS/MS, car cela n'apporterait pas d'amélioration en termes de performance.

6.3 Caractérisation de la méthode SPE en ligne LC/MS²

L'analyse par SPE en ligne associée à la LC/MS/MS présente l'avantage de pouvoir automatiser complètement la préparation d'échantillon et d'apporter un gain de sensibilité grâce à la pré-concentration des composés cibles sur cartouche SPE.

Ainsi, 1,5 mL d'échantillon est directement prélevé d'un vial du passeur d'échantillon du système chromatographique et extrait sur la cartouche SPE, ce volume étant le maximum qui pouvait être utilisé sur notre système.

Les essais en SPE en ligne ont été effectués avec des échantillons préparés dans de l'eau d'Evian® afin d'obtenir dans un premier temps des données sur une matrice d'eau naturelle exempte de MES.

Des gammes de concentrations différentes de chaque composé comprenant des solutions :

de 0,047 à 4,6 µg/L pour les 4-tert-octylphénol, 4-tert-octylphénol monoéthoxylate , bisphénol A , tétrabromobisphénol A, Triclosan et de 0,23 à 23 µg/L pour le 4-nonylphénol technique, le 4-nonylphénol technique monoéthoxylate, le 4-nonylphénol technique diéthoxylate ont été utilisées. Ces solutions étaient préparées dans l'eau d'Evian®, concentrées sur cartouche SPE en ligne et analysées suivant les conditions optimisées décrites ci-dessus. Les résultats présentés sont des moyennes de 6 injections de solutions préparées indépendamment dans des conditions de répétabilité.

Tableau 7. Limites de quantification et domaine de linéarité des composés cibles avec pré-concentration SPE en ligne LC MS2 (concentrations en µg/L)

Molécules Cibles	LQ	Coefficient Variation à la LQ (%)	Borne supérieure du domaine linéarité	penne
4-nonylphénol technique	2,5	32	22,7	0,006
4-nonylphénol technique monoéthoxylate	0,9	30	22,9	0,330
4-nonylphénol technique diéthoxylate	1,5	55	23,0	11,60
4-tert-octylphénol	0,3	14	4,6	0,035
4-tert-octylphénol monoéthoxylate	0,09	19	4,6	1,206
Bisphénol A	0,09	20	4,6	0,280
Tétrabromobisphénol A	/	/	/	/
Triclosan	0,5	23	4,4	0,058

Des exemples de droites d'étalonnage et certaines valeurs brutes sont présentés en annexe 7 et 8.

Par rapport aux injections effectuées avec des boucles de 20 µl, des facteurs de sensibilité 75 fois supérieurs (1500 µL/20 µL) sont effectivement obtenus.

A l'exception du bisphénol A, ces valeurs sont cependant bien supérieures à celles qui sont revendiquées par la norme ISO 18857-2 ou par rapport aux limites de quantification requises pour atteindre les NQE/3.

Pour le tétrabromobisphénol A, aucun pic n'est observé ce qui peut suggérer que ce composé est soit entièrement capté, et non élué du support SPE ou soit pas retenu par ce support.

Des pentes très différentes peuvent également être observées entre les droites d'étalonnages des différents composés. Ainsi, la droite du nonylphénol technique présente une pente très faible ce qui signifie qu'une augmentation de la concentration va entraîner un très faible accroissement du signal spectrométrique obtenu. Ainsi, l'intégration des pics chromatographiques doit ainsi être particulièrement homogène pour permettre la quantification fiable de ce composé.

Des remarques similaires s'appliquent pour les composés cibles détectés avec une ionisation négative. A l'inverse, des pentes très importantes sont généralement retrouvés pour les composés détectés en mode positif.

6.4 Comparaison des méthodes analytiques et perspectives

Considérons l'hypothèse d'un échantillon d'1 litre qui contient une quantité X de polluants. Les différentes techniques peuvent être comparées ainsi en termes de recouvrement.

Tableau 8. Comparaison théorique de méthodes d'analyse

Technique d'injection	Volume d'échantillon (mL)	Quantité de polluant (μg)	Volume pré concentration (mL)	Volume injecté (mL)	Quantité de polluant injectée (μg)	% de polluant initial injecté
SPE-GC/MS	1000	X	0,2	0,001	X/200	0,5
SPE-LC/MS/MS	1000	X	0,2	0,02	X/10	10
SPEligne/LC/MS/MS	1000	X	/	1,5	1,5X/1000	0,15
SPEligne/LC/MS/MS	1,5	Y	/	1,5	1,5Y/1,5	100

SPE= traitement d'échantillon par SPE off line

SPEligne= traitement d'échantillon par SPE en ligne

Y : quantité de polluant contenu dans 1,5 mL d'échantillon

Ce tableau permet de mettre en évidence que, pour des injections en GC, seulement 0,5% de polluant contenu dans 1 L d'échantillon est injecté dans le système chromatographique. En injectant 10% de l'échantillon en LC/MS/MS (donc 20 fois plus en quantité qu'en GC/MS), des limites de quantification à peu près équivalentes devraient être obtenues.

La SPEligne/LC/MS/MS est en partie limitée, avec notre système, par le volume qui peut être injecté (1,5 mL) ce qui n'autorise que l'injection de 0,15 % de polluant si l'on considère un volume d'échantillon de 1 L (par comparaison aux autres techniques utilisées). Cependant, par ce système de SPE en ligne, la totalité des micropolluants étudiés contenu dans l'échantillon (donc dans 1,5 mL) est injectée dans le système chromatographique (comme le souligne la dernière ligne du tableau 8, et à la condition d'un recouvrement de 100% sur la cartouche SPE).

Ainsi, pour améliorer les limites de quantification par SPE en ligne/LC/MS/MS, des quantités plus importantes pourraient être passées sur la cartouche. Notre système ne nous autorise qu'un passage maximum de 1,5 mL (taille de la boucle et des vials) mais certains systèmes peuvent permettre des volumes d'injections plus importantes.

Ainsi, pour obtenir des valeurs correspondantes aux NQE/3 (0,1 $\mu\text{g/L}$ pour les nonylphénols), un facteur d'à peu près 30 devrait être gagné avec la SPE en ligne ce qui correspondrait à un volume de 45 mL passé sur la cartouche.

Pour atteindre, des niveaux comparables en GC, 100 mL devrait être passé en SPE en ligne.

Cela pourrait également permettre de réduire le volume d'échantillon nécessaire car seulement 100 mL permettrait d'atteindre une sensibilité obtenus avec 1000 mL par GC/MS/MS.

Cependant, avec un tel volume d'échantillon, les risques d'encrassement de la cartouche ou d'interférence de la matrice seraient toutefois considérablement augmentés.

De plus, dans un tel cas, le temps de passage de l'échantillon sur la cartouche SPE (30 min pour un volume de 60 mL) pourrait représenter une limitation significative car pendant ce temps, l'appareil chromatographique (les pompes) est occupé par le chargement de la cartouche et ne peut pas effectuer des analyses. Cependant, certains systèmes sont équipés de pompes dédiées aux chargements de la cartouche SPE ce qui permet d'opérer en parallèle la SPE et l'analyse chromatographique.

Pour l'analyse de ce type de composés, il est également délicat d'obtenir des blancs « propres ». S'il existe un risque de contamination des cartouches, ce système est cependant avantageux car il permet de limiter les nombreuses étapes de manipulation requises pour l'analyse décrites selon les conditions de la norme 18857 :2 et ainsi, de réduire le risque de contamination lors de l'analyse.

Enfin, cette approche semble limitée aux échantillons ne contenant pas de particules en suspensions, surtout en considérant des larges volumes d'échantillons. Les particules en suspension pourraient en effet colmater la cartouche, particulièrement après le passage de plusieurs échantillons et endommager le système d'injection. De plus, la désorption des composés cibles contenus sur les MES ne s'effectuerait pas forcément aux mêmes pourcentages de solvant que pour la cartouche SPE.

En effet, une cartouche SPE présente une phase stationnaire solide très homogène et relativement reproductible ce qui n'est pas le cas des matières en suspensions.

Afin de pouvoir obtenir une information globale sur la quantité de polluants présents dans une eau brute et se placer dans la cadre de la DCE, l'échantillon devra être filtré et le traitement des MES devra être accompli séparément. L'extrait des polluants élués des MES pourrait être ensuite rajouté à l'échantillon filtré et traité par le mode SPE en ligne.

7. Conclusion - perspectives

Conclusion

Cette étude visait à tester l'applicabilité de la détection de certains composés possédant un groupement phénol (nonylphénol (NP)/ éthoxylats de nonylphénol (NPOE)/OP/OP₁EO/ bisphénol A (BPA)/ TBBPA/ triclosan) par LC/MS/MS.

Après optimisation des paramètres d'ionisation, ces travaux ont démontré que l'injection directe de ces composés, préparés dans l'eau MilliQ, permettait d'attendre des seuils de quantification allant de 8 µg/L pour le bisphénol A à 175 µg/L pour le 4-nonylphénol technique. Ces taux sont cependant loin de satisfaire aux exigences réglementaires en matière de sensibilité dans les milieux naturels.

En pré-concentrant l'échantillon au préalable sur une cartouche SPE en ligne avec le système LC/MS/MS, les seuils de quantification peuvent être sensiblement abaissés car 1,5 mL d'échantillon peut être injecté au lieu de 20 µL. Cependant, même en effectuant ces tests sur une matrice propre, les valeurs obtenues restent bien supérieures à celles revendiquées par la norme ISO 18857-2 concernant les analyses avec pré-concentrations d'échantillon et analyse par GC/MS ou par rapport aux exigences de la directive QA/QC (en particulier sur les LQ qui doivent être au moins égales à la NQE/3).

Globalement, pour des performances optimales et une analyse simultanée des nonylphénols et des composés éthoxylés apparentés, il apparaît ainsi préférable d'effectuer la détection et quantification de ces composés par GC-MS. L'analyse des nonylphénols et composés apparentés par LC/MS/MS peut s'effectuer pour des gammes de concentrations plus élevées et peut s'avérer attractive pour des analyses multi-résidus lorsque d'autres composés non-volatils sont considérés (ou pour des nonylphénols éthoxylés de haut poids moléculaires).

La SPE en ligne LC/MS/MS, pour des raisons pratiques (voir discussion en 6.4) est limitée aux eaux ne contenant pas de matières en suspensions ou aux eaux filtrées.

Perspectives

En considérant une étape de préconcentration par SPE (off-line) (identique à celle pratiquées pour les analyses en GC/MS), il semblerait que des limites de quantification LC/MS/MS équivalentes à celles obtenues par GC/MS pourraient être obtenues.

Cette étude s'est entièrement focalisée sur la détermination des limites de quantification en LC/MS/MS dans une matrice propre. Cependant, la composition de l'échantillon et en particulier la charge matricielle pourrait induire une influence significative sur les performances obtenues. Si l'on considère les analyses en GC/MS, des interférences peuvent également survenir. Mais suivant la nature des composés, nonylphénols, éthoxylats de nonylphénols, bisphénol A, ..., des interférences différentes pourraient intervenir suivant le mode analytique utilisé (GC ou LC) (interférences de dérivation, chromatographiques, encrassement du liner GC, de la colonne GC ou LC, de la source MS, extinction/accroissement du signal MS). Une comparaison plus détaillée entre ces 2 modes de couplage par rapport aux interférences engendrées par différents types de matrices et de composés pourrait être entreprise.

De plus, les nonylphénols et composés éthoxylés sont des mélanges techniques. Différents fabricants proposent ces mélanges qui ne sont pas forcément identiques. Une étude pourrait ainsi s'intéresser à déterminer si des réponses différentes sont obtenues suivant l'origine (et la composition) des mélanges nonylphénols ou éthoxylés technique.

Une analyse par détection GC/MS/MS pourrait également amener un gain de sélectivité et permettre d'obtenir une analyse plus sensible. Pour ce type de détection, également, il devrait être contrôlé si une fragmentation semblable est retrouvée pour différents mélanges de nonylphénols technique (même remarque pour les mélanges techniques d'éthoxylés).

Hors du cadre actuel de la DCE et dans une perspective à plus long terme, on peut également souligner que les résultats obtenus dans la plupart des études toxicologiques se réfèrent à des substances ou solutions techniques de composition mal caractérisée (beaucoup utilise le NP linéaire qui n'est pas même pas présent dans l'environnement). Afin de pouvoir effectuer des études toxicologiques plus ciblées, il serait envisageable d'affiner les techniques analytiques en support, avec les évolutions technologiques récentes, pour différencier analytiquement les différents alkylphénols présents dans un mélange technique. En effet, les différents isomères d'un tel mélange technique ne présentent pas des niveaux de toxicité identiques. Dans ces conditions, une séparation plus accomplie des isomères devrait être établie. Les isomères ayant une masse moléculaire identique, une telle distinction ne pourrait être parachevée qu'au cours de l'étude séparative de la méthode. Ceci pourrait, par conséquent, être évalué avec la GC*GC (qui permet également un gain de sensibilité par rapport aux analyses en GC) dont quelques applications concernant les nonylphénols peuvent être retrouvés dans la littérature [17].

Références

- [1] Rapport Aquaref : « les substances émergentes dans l'environnement : note de synthèse sur l'état de l'art concernant les produits pharmaceutiques, les cosmétiques et les produits d'hygiène corporelle », Dulio V., Morin A., Staub P.F., Octobre 2009
- [2] I N E R I S - Données technico-économiques sur les substances chimiques en France NONYLPHENOLS ET ETHOXYLATES, J.M. Brignon, Mai 2005,
- [3] Schiavone S., Coquery M. Synthèse bibliographique : méthodes d'analyse de l'octylphénol et du nonylphénol dans les sédiments et les organismes biologiques. Cemagref, 2010, 32 p.
- [4] Lee H.B., Water Qual. Res. J. Canada, 1999, 34, 3-35
- [5] Vega Morales T., Torres Padron M.R., Sosa Ferrera Z., Santana Rodriguez J.J., Trends Anal. Chem., 2009, 28, 1186-1200
- [6] Loyo-Rosales J.E., Schmitz-Afonso I., Rice C.P., Torrens A., Anal. Chem., 2003, 75, 4811-4817
- [7] Ferguson P.L., Iden C.R., Brownawell B.J., J. chromatogr. A, 2001, 938, 79-91
- [8] Shang D.Y., Ikonomou M.G., MacDonald R.W., J. Chromatogr. A , 1999, 849, 467-482
- [9] Petrovic M, Barcelo D., J. Mass Spectrom., 2001, 36 ,1173-1185
- [10] Ballesteros-Gomez A., Rubio S., Perez-Bendito D., J. Chromatogr.A, 2009, 1216, 449-469
- [11] Covaci A., Voorspoels S., Ramos L., Neels H., Blust R., J. Chromatogr. A, 2007, 1153, 145-171
- [12] Peck A. M., Anal. Bioanal. Chem., 2006, 386, 907-939
- [12] Rodriguez-Mozaz S., Lopez de Alda M.J., Barcelo D., J. Chromatography A, 2007, 1152, 97-155
- [14] Careri M., Elviri L., Mangia A., J. AOAC Int. , 2001, 5, 1383-1392
- [15] Norme NF EN ISO 18857-1 : 2006 « Qualité de l'eau - Dosage d'alkylphénols sélectionnés - Partie 1 : méthode pour échantillons non filtrés par extraction en phase liquide-liquide et chromatographie en phase gazeuse avec détection sélective de masse »
- [16] Norme ISO 18857-2 :2009, « Water quality,- Determination of selected alkylphenols- Part :2 Gas chromatographic-mass spectrometric determination of alkylphenols, their ethoxylates ad bisphenol A in non-filtered samples following solid-phase extraction and derivatisation »
- [17] Panic O., Gorecki T., Anal. Bioanal. Chem., 2006, 386, 1013-1023

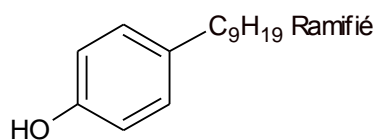
8. Liste des annexes

Annexes	Désignation
Annexe 1	Structure chimique des composés cibles
Annexe 2	Paramètres d'acquisition du spectromètre de masse
Annexe 3	Conditions chromatographiques en injection directe
Annexe 4	Principe du système de pré concentration en ligne SPE
Annexe 5	Méthode chromatographique par injection avec préconcentration SPE
Annexe 6	Exemples de droites d'étalonnage en injection directe-LC/MS2
Annexe 7	Exemple de droites d'étalonnage des composés cibles par préconcentration SPE en ligne-LC/MS2
Annexe 8	Données brutes des droites d'étalonnage des composés cibles par préconcentration SPE en ligne-LC/MS2

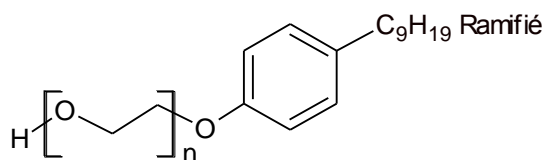
Annexe 1

Structure des composés cibles

4-Nonylphénol



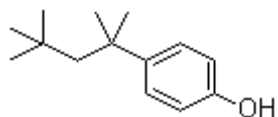
4-Nonylphénol éthoxylates



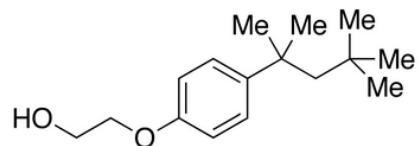
n=1 pour monoéthoxylate (NP₁EO)

n=2 pour diéthoxylate (NP₂EO)

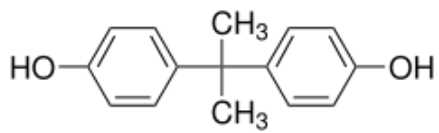
4-tert-octylphénol



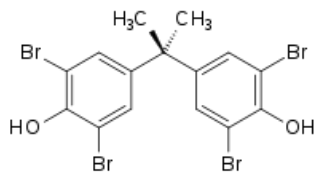
4-tert- octylphénol monoéthoxylate



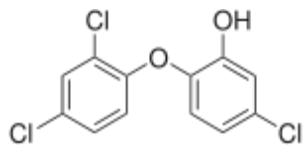
Bisphénol A



Tétrabromobisphénol A



Triclosan



Annexe 2

Paramètres de fonctionnement du spectromètre de masse

Polarité ES+

Capillaire (kV)	2,80
Extracteur (V)	3,00
RF (V)	0,10
Temperature Source (°C)	150
Désolvation Temperature (°C)	400
Débit Gaz Cone (L/Hr)	50
Débit Gaz Désolvation (L/Hr)	800
Débit Gas Collision (mL/Min)	0,20

Polarité ES-

Capillaire (kV)	2,80
Extracteur (V)	3,00
RF (V)	0,10
Temperature Source (°C)	150
Désolvation Temperature (°C)	400
Débit Gaz Cone (L/Hr)	50
Débit Gaz Désolvation (L/Hr)	800
Débit Gas Collision (mL/Min)	0,20

Annexe 3

Conditions chromatographiques en injection directe

Colonne : X-Bridge C18 2,5 μm , 2,1 *50 mm (Waters)

Phases mobiles :

Solvant : Méthanol 2mM Acétate d'ammonium

Phase Aqueuse : Eau 2mM Acétate d'ammonium

Température du four : 40°C

Débit : 0,3 mL/min

Volume d'injection : 20 μL

Gradient :

Tableau 9. Gradient chromatographique en injection directe

Temps en min.	Eau 2 mM Acétate d'ammonium	Méthanol 2 mM Acétate d'ammonium
0	50 %	50 %
10	50 %	50 %
20	0 %	100 %
25,1	50 %	50 %
30	50 %	50 %

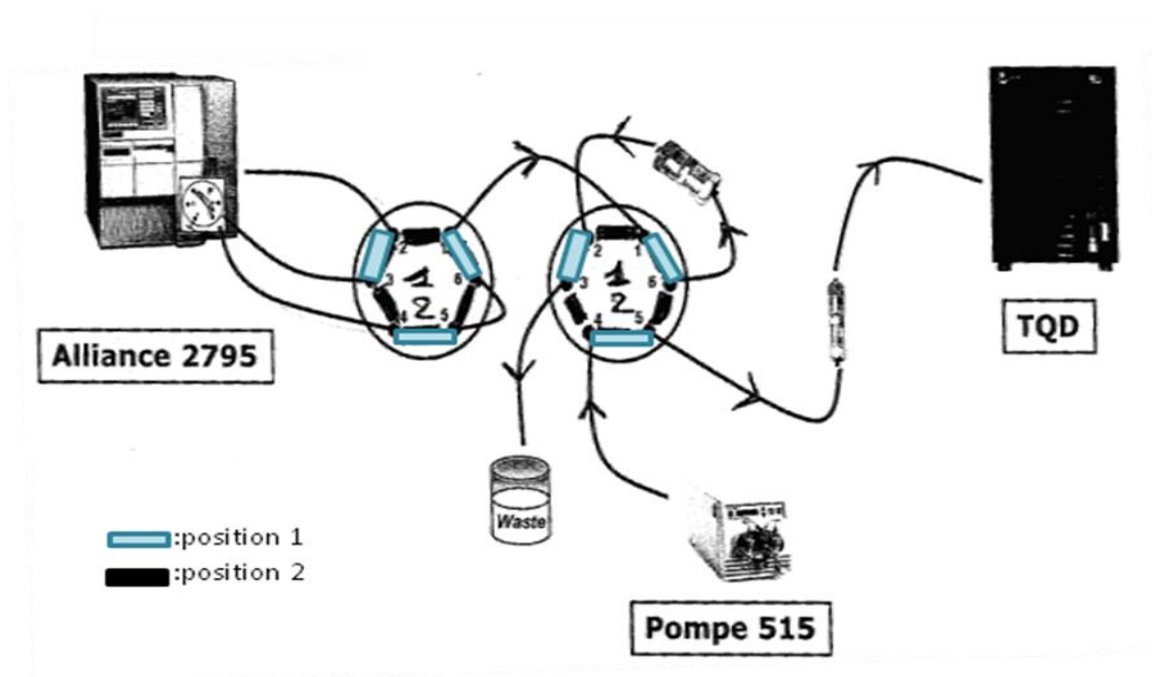
Annexe 4

Système de pré concentration SPE en ligne

Fonctionnement du système SPE en ligne:

En position 1 (vannes avec section bleu clair sur le schéma en annexe 4), l'échantillon est transféré sur la cartouche SPE. Avec le système utilisé, un volume de 1,5 mL (correspondant au volume d'un vial) était échantillonné. Le volume normal d'injection en mesure directe (sans SPE en ligne) était de 20 μ l. Une pré-concentration d'un facteur 75 est donc obtenue par ce biais par rapport à une injection sans SPE en ligne. Pendant le temps du chargement, la colonne chromatographique est équilibrée aux conditions initiales de phase mobile par la pompe additionnelle.

En position 2 (vannes avec section noire), les 2 vannes basculent simultanément. La pompe du système chromatographique est directement reliée à la cartouche SPE et élue les composés piégés en backflush, en fonction du gradient, directement vers la colonne chromatographique.



PS : Le four a été omis sur ce dessin. Dans le montage expérimental, la colonne chromatographique est placée dans le four thermostaté à 40°C.

Annexe 5

Méthode chromatographique par injection directe avec préconcentration SPE en ligne LC/MS2

Colonne SPE : LiChrospher C₈ 25 µm, 25 * 4 mm (Merck)

Volume d'injection dans la colonne SPE : 1,5mL

Colonne : Altima C18 3 µm, 3,0 * 150 mm (Grace)

Débit : 0,3 mL/min

Phases mobiles :

Solvant : Méthanol 2mM Acétate d'ammonium

Phase Aqueuse : Eau 2mM Acétate d'ammonium

Température du four : 40°C

Gradient :

Tableau 10. Gradient chromatographique avec injection SPE

Temps en min.	Eau 2 mM Acétate d'ammonium	Méthanol 2 mM Acétate d'ammonium	Débit en ml/min
0	100 %	0 %	2
2	100%	0 %	2
2,1	50 %	50 %	0,3
4,6	50 %	50 %	0,3
20	0 %	100 %	0,3
25	0 %	100 %	0,3
25,1	50 %	50%	0,3
30	50 %	50%	0,3
30,1	100 %	0%	2
33	100%	0%	2

Annexe 6

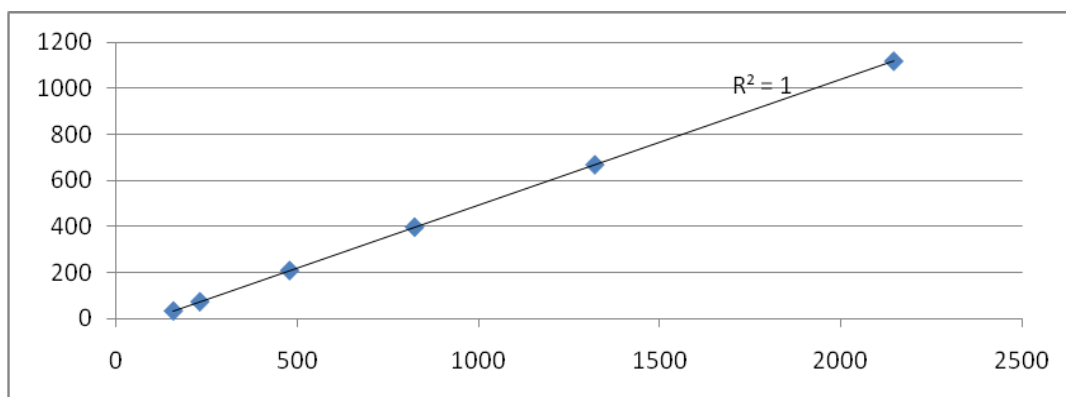
Exemples de droite d'étalonnage en injection directe-LC/MS2

Unité :

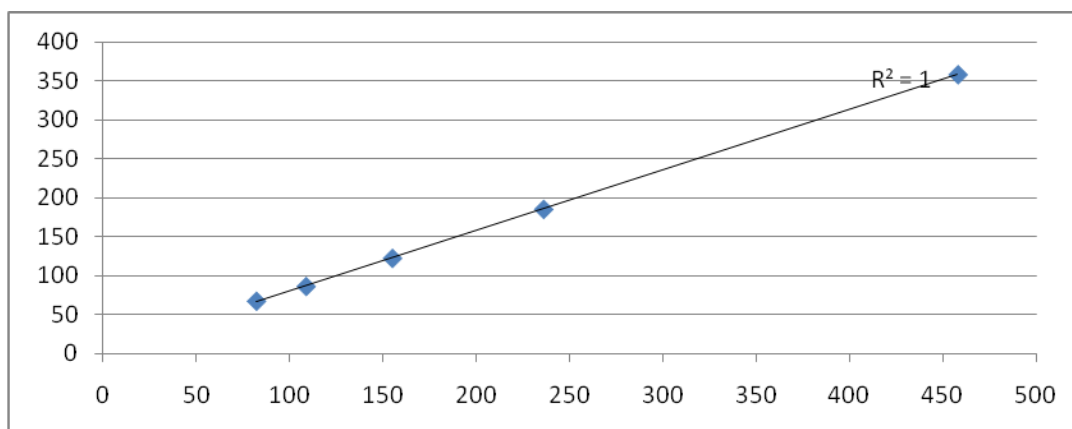
Abscisses : concentration ($\mu\text{g/L}$)

Ordonnées : Aire du signal

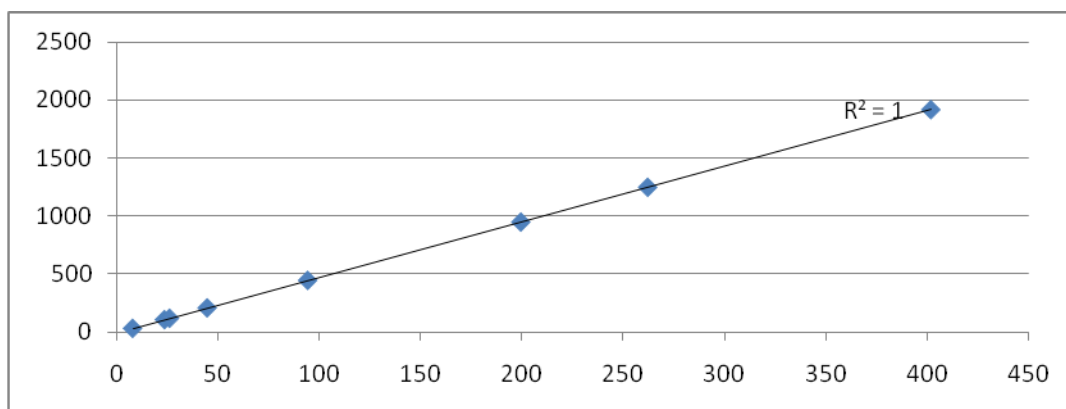
a) Nonylphénol technique



b) 4-tert-octylphénol



c) Bisphénol A

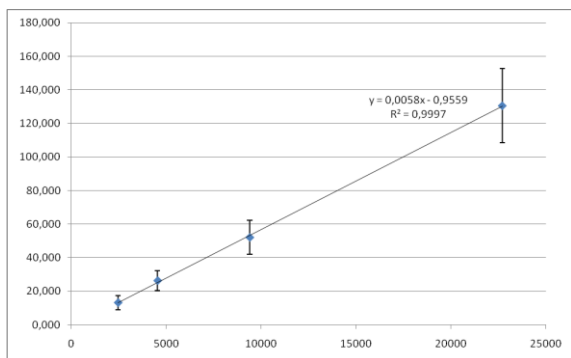


Annexe 7

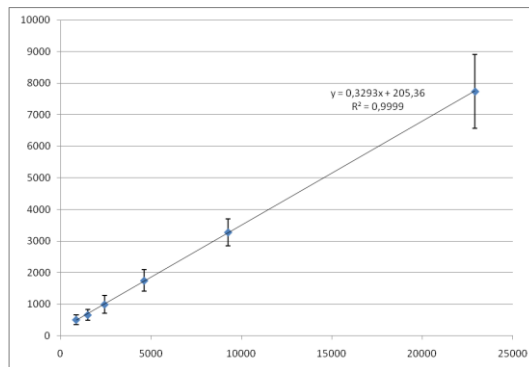
Exemple des droites d'étalonnage des composés cibles par préconcentration SPE en ligne

Unité des abscisses : concentration (ng/L) ; ordonnées : aire

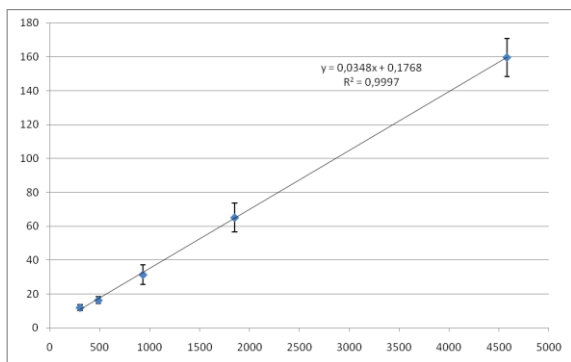
a) Nonylphénol technique



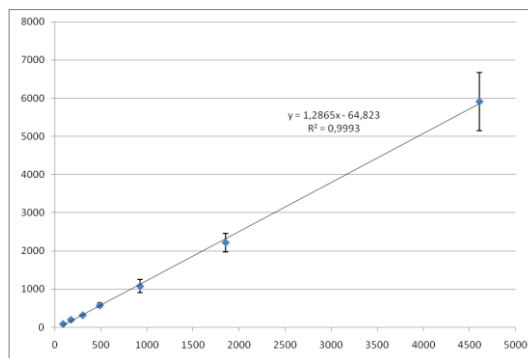
b) Nonylphénol monoéthoxylate



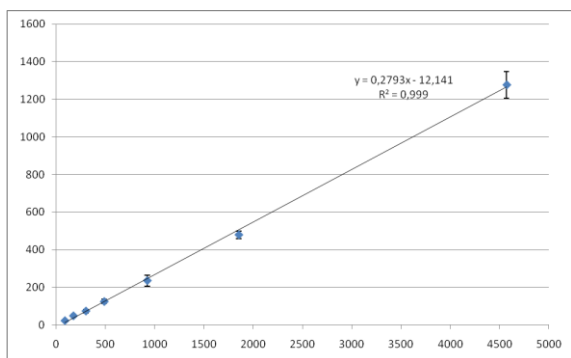
c) 4-tert-octylphénol



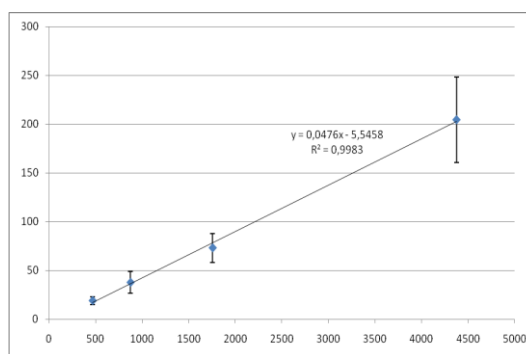
d) 4-tert-octylphénol monoéthoxylate



e) Bisphénol A



f) Triclosan



Annexe 8

Données brutes des droites d'étalonnage des composés cibles par préconcentration SPE en ligne-LC/MS2 (moyenne de 6 échantillons différents injectés dans des conditions de répétabilité)

4-Nonyphénol

Concentration (ng/L)	2450	4540	9400	22700
Aire	13	26	52	131
Ecart type	4,2	5,8	10,1	22,2
Cvr	32%	22%	19%	17%

4-Nonylphénol monoéthoxylé

Concentration (ng/L)	870	1510	2440	4630	9270	22900
Aire	511	664	995	1749	3280	7739
Ecart type	154	169	281	345	426	1166
Cvr	30%	25%	28%	20%	13%	15%

Nonylphénol diéthoxylé

Concentration (ng/L)	870	1510	2440	4630	9270
Aire	9828	16126	27151	54077	106524
Ecart type	5383	3488	6444	10056	27007
Cvr	55%	22%	24%	19%	25%

Octylphénol technique

Concentration (ng/L)	300	480	930	1850	4580
Aire	12	16	31	65	160
Ecart type	1,7	2,1	5,9	8,6	11
Cvr	14%	13%	19%	13%	7%

Octylphénol monoéthoxylé

Concentration (ng/L)	89	174	302	488	925	1853	4600
Aire	93	201	322	580	1079	2219	5908
Ecart type	18	31	22	62	174	242	763,5
Cvr	19%	15%	7%	11%	16%	11%	13%

Bisphénol A

Concentration (ng/L)	90	175	300	490	925	1850	4570
Aire	23	49	74	125	236	479	1276
Ecart type	5	8	9	12	30	21	70
Cvr	20%	17%	12%	10%	13%	4%	5%

Triclosan

Concentration (ng/L)	470	875	1760	4380
Aire	19	38	73	204
Ecart type	4	11	15	44
Cvr	23%	29%	20%	21%